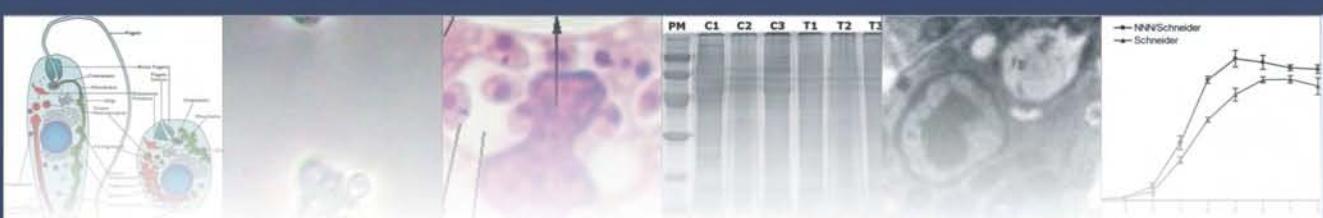


**Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
Prof. Delby Fernandes de Medeiros**

Amely Branquinho Martins



“Avaliação do potencial antileishmania dos compostos naturais isolados ácido úsnico, cumarina, quercetina e reserpina sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania chagasi*”



**João Pessoa-PB
2008**

AMELY BRANQUINHO MARTINS

**"AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTILEISHMANIA DOS COMPOSTOS NATURAIS
ISOLADOS ÁCIDO ÚSNICO, CUMARINA, QUERCETINA E RESERPINA SOBRE AS
FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA CHAGASI*"**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos – Área de concentração:
Farmacologia – Universidade Federal
da Paraíba, como parte integrante
dos pré-requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos.

ORIENTADOR: PROF. DR. DEMETRIUS ANTONIO MACHADO DE ARAÚJO

**João Pessoa – PB
2008**

M386a Martins, Amely Branquinho.

“Avaliação do potencial antileishmania dos compostos naturais isolados ácido úsnico, cumarina, quercetina e reserpina sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania Chagasi*” / Amely Branquinho Martins.-
João Pessoa, 2010.

122f. : il.

Orientador: Demetrius Antonio Machado de Araújo.
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS.

1. Farmacologia. 2. Leishmania chagasi. 3. Amastigotas axênicas. 4. Ácido úsnico.
5. Cumarina. 6. Quercetina. 7. Reserpina.

AMELY BRANQUINHO MARTINS

**"AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTILEISHMANIA DOS COMPOSTOS NATURAIS
ISOLADOS ÁCIDO ÚSNICO, CUMARINA, QUERCETINA E RESERPINA SOBRE AS
FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA CHAGASI*"**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos - Área de concentração:
Farmacologia - Universidade Federal
da Paraíba, como parte integrante
dos pré-requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos.

Data da aprovação ____/____/____

Banca Examinadora

Demetrius Antônio Machado de Araújo (Orientador)

(Departamento de Biologia Molecular – UFPB)

Prof. Dr. Luis Fernando Marques dos Santos (Membro)

(Departamento de Biologia Molecular – UFPB)

Profa. Dra. Hélida Monteiro de Andrade (Membro)

(Laboratório de Imunoparasitologia - UFMG)

Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezan (Suplente)

(Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – UFPB)

A Mathews Laumeano, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à inteligência suprema e causa primeira de todas as coisas, geratriz e consciência universal, além dos amigos de todas as dimensões.

À Mathens Laureano, pela dedicação, amor, carinho, compreensão e principalmente pelo incentivo sempre presente em minhas atividades acadêmicas, nos momentos de desânimo e nas incertezas.

Aos meus amigos e pais, Neide e Donizeti, pelo amor sempre presente, por me incentivarem, desde a tenra idade, aos estudos que tem me proporcionado tantas realizações e conquistas pessoais e profissionais, a eles agradeço pelo que sou.

Aos meus amigos e irmãos, Denis, Alice e Angélica, pelo companheirismo, amor e amizade que sempre me ajudaram a crescer.

À todos os familiares que me incentivaram e estiveram presentes nos momentos alegres ou tristes.

Ao meu orientador, prof. Dr. Demetrios Antônio Machado de Araujo, pelo importante acompanhamento em meu trabalho acadêmico, sendo responsável por grande parte da minha formação profissional. Agradeço a confiança e o incentivo sempre presentes, por acreditar em mim e me incentivar a seguir em frente mesmo nos momentos de grande desespero e desilusão e, além disto, pela amizade que ultrapassa as barreiras acadêmicas.

À profa. Dra. Hélida Monteiro de Andrade, pela orientação e acompanhamento na etapa desenvolvida em Belo Horizonte, pela amizade, carinho e sinceridade na acolhida e nos ensinamentos que foram tão importantes para minha formação.

À todos os estagiários e funcionários do Laboratório de Immunoparasitologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, à Louise, Jader e Dariyy pela receptividade e auxílios prestados em Belo Horizonte.

Aos amigos Mauro e Elizabeth e suas filhas Mariane e Júlia, pela acolhida, pela amizade, pelo carinho e, principalmente por me oferecer um lar, de maneira que eu realmente "me sentisse em casa" em Belo Horizonte. Agradeço também a Tia Zilda, Dona Izaltina e Néa pelo carinho na receptividade.

Ao amigo Rubens do Monte Neto pelos ensinamentos despidos de interesse e preconceito, pela força e incentivo no trabalho com as leishmanias, pela amizade e acolhida em Belo Horizonte.

Ao prof. Dr. José Maria Barbosa Filho por gentilmente ceder os compostos naturais utilizados no presente estudo.

Às amigas e técnicas de laboratório, Gláucia e Teresa Cristina (*T. crass*) por toda atenção, carinho e auxílios prestados não apenas na rotina de experimentos, mas também pela amizade, pelo incentivo e força dedicados em tantos momentos difíceis.

À todos os técnicos e funcionários do Departamento de Biologia Molecular que vibraram ou contribuíram de alguma forma com meu trabalho.

À Hélio Danny pelo companheirismo, por acreditar e compartilhar comigo as dividas, as incertezas, mas também os aprendizados e vitórias, agradeço por tantos finais de semana, tantas noites e feriados dedicados ao trabalho com as leishmanias, muito obrigada companheiro.

À Aretha Vieira por acreditar e acompanhar o trabalho realizado, pelo auxílio prestado em tantos momentos importantes, no laboratório e nos experimentos, muito obrigada pelo companheirismo no trabalho com as leishmanias.

Aos amigos do Laboratório de Bioinformática, Flávio, Hácio, João, Patricia, Renata, Thaís, Thibério, e todos os outros que já passaram por lá, pela amizade, pela troca de experiências e auxílio mútuo no crescimento profissional.

Aos amigos(as) e colegas de laboratório Aletéia, Andréia, Aron, Bruno, Juan, Marilene, Micheline, Thalita e todos aqueles que contribuiram de alguma forma ou torceram por mim. Agradeço pelos bons momentos de descontração e aprendizado em nossa convivência.

À Marcos (Marcão) pela disponibilidade e pelo auxílio nas estatísticas.

À Crispim, técnico do biotério Thomas George, pelo apoio na manutenção dos animais e na coleta de material biológico.

À secretária Tânia pelo apoio nas questões burocráticas do mestrado.

À Sócrates Golyo pela amizade e apoio no LTF.

À Laura Ney Marcelino Passerat de Silans, do Núcleo de Entomologia da Secretaria de Saúde do Estado, pelas informações referentes à epidemiologia da leishmaniose visceral na Paraíba.

À Marcelo Marcelino, chefe do Centro de Proteção de Primatas Brasileiros (CPB/ICMBio) pelo apoio e pela disponibilização de tempo, fatores que foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Aos colegas do CPB pelo apoio e amizade.

À todos que contribuiram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho ou para a manutenção da minha sanidade mental e estabilidade emocional durante os percalços do tortuoso, porém importante, caminho acadêmico.

RESUMO

As leishmanioses constituem-se por um complexo de doenças infecto-parasitárias, causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, e apresentam um espectro de sintomas variando de simples lesões cutâneas de cicatrização espontânea a lesões viscerais letais. A leishmaniose visceral, causada pela espécie *Leishmania chagasi*, no Brasil infecta cerca de duas mil pessoas por ano, sendo cerca de 90% dos casos no Nordeste. Os tratamentos atuais são baseados em compostos antimônias pentavalentes, ou na utilização de outras drogas como a anfotericina B e a pentamidina. A toxicidade desses agentes, com efeitos colaterais graves, o alto custo dos tratamentos, as dificuldades de administração e o surgimento de resistência são grandes desvantagens, tornando essencial a busca por novos agentes leishmanicidas, como a identificação de compostos naturais isolados, que podem fornecer novos modelos terapêuticos no tratamento das leishmanioses. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar comparativamente o potencial antileishmania de compostos naturais isolados sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania chagasi*, estabelecendo o ciclo do parasito *in vitro*. Os compostos naturais ensaiados, ácido úsnico, cumarina, quercetina e reserpina apresentaram significativa atividade antileishmania sobre as formas promastigotas de *Leishmania chagasi*, com IC_{50} igual a 0,0417; 1,07; 0,271 e 1,7 mM respectivamente. Nas condições de cultivo padronizadas no presente estudo foi possível estabelecer o ciclo de vida *in vitro* dos parasitos, com passagem destes pelas duas principais formas de vida: promastigotas e amastigotas. O ciclo *in vitro* foi caracterizado pelo cultivo das promastigotas com estabelecimento: 1) das fases: lag (inicial), log ou exponencial e estacionária dos parasitos; 2) transformação das formas promastigotas em amastigotas intracelulares, pela infecção de macrófagos murinos, o que favoreceu a infectividade das promastigotas; e 3) pelo isolamento das formas amastigotas e transformação destas em promastigotas novamente, completando o ciclo. Além disto, foi também possível estabelecer a transformação *in vitro* das promastigotas em amastigotas axênicas de *L. chagasi* e o cultivo das formas axênicas para ensaios de ação antileishmania sobre essa forma. Nesse caso, o composto natural isolado ácido úsnico apresentou atividade antileishmania sobre amastigotas axênicas de *L. chagasi*, com IC_{50} igual a 1,16 mM. Não foi observada similaridade da IC_{50} na atividade antileishmania do ácido úsnico e da pentamidina entre as formas amastigotas axênicas e promastigotas, o que demonstra a importância de caracterizar a ação dos compostos sobre cada forma de vida dos parasitos. Conclui-se que os compostos isolados têm atividade antileishmania sobre as formas promastigotas e o ácido úsnico sobre as formas amastigotas axênicas de *L. chagasi*.

Palavras-Chave: *Leishmania chagasi*, amastigotas axênicas, ácido úsnico, cumarina, quercetina e reserpina.

ABSTRACT

Leishmaniases are a complex of infectious parasitic diseases caused by species of the *Leishmania* genus. These diseases comprise a large spectrum of manifestations ranging from localized self-healing cutaneous lesions to fatal visceral infections. In Brazil, the visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania chagasi* which affects ca. 2 million people every year with estimated 90% of cases occurring in Northeastern. Current treatments of leishmaniasis are based on first line pentavalent antimonials or other drugs like amphotericin B and pentamidine. Toxicity of those drugs, their high side-effects, besides the high cost of treatment, difficulty for administering them and the surge of resistance are their great drawbacks. These aspects have stimulated the search for new leishmanicide agents, like the isolation and identification of natural compounds which could provide new therapeutic models for the treatment of leishmaniases. It was aimed in the present work a comparative evaluation of potentially antileishmania natural isolate compounds and their action on promastigote and amastigote forms of *Leishmania chagasi* by observing the cycle of this parasite *in vitro*. Assays were carried out with usnic acid, coumarin, quercetin, and reserpine which showed to have significant antileishmanial activity on promastigote forms of *Leishmania chagasi*, presenting IC_{50} equal to 0.0417; 1.07; 0.271 and 1.7 mM, respectively. It was possible in our experimental conditions of standardized cultivation of parasites, to establish their life cycle *in vitro*, by observing their metamorphosis from promastigote to mastigote. The *in vitro* life cycle was characterized by parasite cultivations with establishment of: 1) lag (initial), log or exponential and stationary stages of promastigotes; 2) transformation of promastigotes to intracellular amastigotes by infection of murine macrophages; this step favoured the promastigotes infectivity; and 3) amastigote isolation and transformation to promastigotes completing the cycle. Furthermore, it was also possible to establish the *in vitro* transformation of promastigotes in axenic amastigotes of *Leishmania chagasi* and its use for the evaluation of antileishmanial activity. In this case, the natural compound usnic acid exhibited antileishmanial activity against axenic amastigote forms with IC_{50} of 1,16 mM. It was not observed any similarity of IC_{50} on antileishmanial activity of usnic acid and pentamidine between the axenic amastigote and promastigote forms. This demonstrates that it is important to characterize the action of compound on each life form of the parasites. It is concluded that all assayed compounds carried out in this work had antileishmanial activity on promastigote forms, mainly, and the effect of concentration was different between promastigote, of lower IC_{50} values, and axenic amastigotes forms, of greater IC_{50} values.

Key-words: *Leishmania chagasi*, axenic amastigotes, usnic acid, cumarine, quercetin, reserpine.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i> , demonstrando as espécies de cada complexo e ênfase na espécie alvo da presente pesquisa. Adaptado de Bañuls e colaboradores (2007)..... | 21 |
| Figura 2 – Imagem esquemática das formas amastigota e promastigota, agentes etiológicos das leishmanioses. Detalhe para o núcleo, o cinetoplasto de cada forma (Fonte: Besteiro et al., 2007)..... | 24 |
| Figura 3 – Fotomicrografia de uma cultura de <i>Leishmania chagasi</i> . Coloração hematológica por Hematoxilina e Eosina. Microscópio óptico com contraste de fase, aumento de 1000x..... | 25 |
| Figura 4 – Amastigotas em macrófagos de cultura corados por Giemsa. 1) macrófago; 2) Núcleo do macrófago; 3) Amastigota; 4) Fagolisossomo do macrófago; 5) Cinetoplasto; e 4) Núcleo da amastigota. Fonte: Carvalho e colaboradores (http://www.biof.ufrj.br/laminario.html)..... | 26 |
| Figura 5 – Imagem esquemática do ciclo de vida das espécies do gênero <i>Leishmania</i> . (Fonte: WHO, 2004) | 27 |
| Figura 6 - Número de casos e coeficiente de incidência de leishmaniose visceral no Brasil, no período de 1985 a 2002. (Fonte: Ministério da Saúde, 2003) | 29 |
| Figura 7 - Distribuição de casos autóctones de Leishmaniose Visceral no Brasil em 2002. (Fonte: Ministério da Saúde, 2003) | 31 |
| Figura 8 – Estrutura química do ácido úsnico | 43 |
| Figura 9 – Estrutura química da cumarina | 45 |
| Figura 10 – Estrutura química da quercetina..... | 47 |
| Figura 11 – Estrutura química da reserpina | 49 |
| Figura 12 – Esquema demonstrativo da etapa de isolamento de amastigotas extracelulares pelo método de filtragem com lã de vidro, onde 1) Lavagem da garrafa de cultivo celular; 2) Centrifugação; 3) Ressuspensão do pellet; 4) Filtragem em seringa com lã de vidro; 5) Contagem de células em câmara hermocinética de Neubauer | 62 |
| Figura 13 - Equação sigmoidal dose-resposta utilizada para calcular a IC ₅₀ dos compostos ensaiados. Y = Resposta; X = Logaritmo da concentração dos compostos; Máximo = efeito máximo (% máxima de inibição) e Mínimo = Efeito mínimo (% mínima de inibição, aqui igual ao controle com 0% de inibição) | 67 |
| Figura 14 – Macrófagos experimentalmente infectados com formas promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> , na proporção de 10 promastigotas por macrófago, e incubados a 37°C com atmosfera de 5% CO ₂ , após 48 horas de infecção. As setas indicam as regiões dos macrófagos com maior concentração de amastigotas e o triângulo indicam amastigotas em suspensão. Microscópio óptico com contraste de fase, aumento final de 400x | 72 |
| Figura 15 – Amastigotas em suspensão após rompimento dos macrófagos murinos infectados. Microscópio óptico com contraste de fase, aumento final de 400x mais zoom ótico da câmera digital de aproximadamente 3x | 73 |

Figura 16 – Resultados da diferenciação *in vitro* de promastigotas com mais de seis repiques, incubados a 24°C e pH 5,5. As setas indicam as formas arredondadas com a presença de flagelo externo e o triângulo indica a presença de formas promastigotas contaminantes78

Figura 17 – Amastigotas axenicas mantidas em cultivo *in vitro*. A) amastigotas diferenciadas *in vitro* a partir de promastigotas no 2º repique, após ciclo de vida *in vitro*, concentradas por centrifugação e coradas por hematoxilina e eosina, AF. 1000x; B) amastigotas diferenciadas *in vitro* a partir de promastigotas no 2º repique, após ciclo de vida *in vitro*, microscópio óptico com contraste de fase, AF. 400x; C) amastigota axenica isolada após infecção de macrófagos murinos peritoniais, microscópio óptico com contraste de fase, AF. 1000x mais zoom ótico da câmera digital de aproximadamente 3x; D) amastigotas axenicas isoladas após infecção de macrófagos murinos peritoniais, microscópio óptico com contraste de fase, AF. 400x. As setas indicam as regiões com núcleo e cinetoplasto82

GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Casos humanos de leishmaniose visceral registrados na Paraíba entre os anos de 1982 a 2007. (Fonte: FUNASA/SINAN – SES-PB).....32
- Gráfico 2** - Casos humanos de leishmaniose visceral registrados em João Pessoa entre os anos de 2000 a 2007. (Fonte: FUNASA/SINAN – SES-PB).....33
- Gráfico 3** - Curvas de crescimento das formas promastigotas de *L. chagasi* em meio NNN/Schneider e apenas em Schneider. O gráfico representa a média ± desvio padrão (DP) de dois experimentos independentes realizados em triplicata.....70
- Gráfico 4** - Curvas de crescimento das formas promastigotas de *L. chagasi* no 10º repique e das recém-repicadas na forma promastigota, após infecção de macrófagos murinos e cultivo sob a forma de amastigota intracelular (2º repique). O cultivo de ambas culturas foi realizado em meio NNN/Schneider. O gráfico representa a média ± DP de dois experimentos independentes realizados em triplicata74
- Gráfico 5** - Demonstração gráfica da estimativa do tempo de geração (período necessário para que a cultura duplique o número de células), onde as culturas com menor número de repiques (2º repique sob a forma promastigota, logo após a cultura sob a forma amastigota intracelular *in vitro*) apresentaram menor tempo de geração (16 horas), quando comparadas às culturas no 10º repique (22 horas e 30 minutos). $p < 0,001$ na comparação entre o tempo de geração do 10º e do 2º repiques.....75
- Gráfico 6** - Porcentagem de inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* na presença de diferentes concentrações do composto isolado ácido úsnico. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ em relação ao controle85
- Gráfico 7** - Curva concentração-resposta do composto ácido úsnico sobre promastigotas de *Leishmania chagasi* demonstrando o efeito do composto sobre o número de parasitos/mL. O ajuste da curva foi realizado de acordo com a equação sigmoidal dose-resposta detalhada no item 3.13. Os pontos representam a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata86
- Gráfico 8** - Porcentagem de inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* na presença de diferentes concentrações do composto isolado cumarina. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. ** $p < 0,001$ em relação ao controle87
- Gráfico 9** - Curva dose-resposta da cumarina sobre promastigotas de *Leishmania chagasi* demonstrando o efeito do composto sobre o número de parasitos/mL. O ajuste da curva foi realizado de acordo com a equação sigmoidal dose-resposta detalhada no item 3.13. Os pontos representam a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata88
- Gráfico 10** - Porcentagem de inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* na presença de diferentes concentrações do composto isolado quercetina. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ em relação ao controle89

| | |
|---|----|
| Gráfico 11 – Curva concentração-resposta do composto quercetina sobre promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> demonstrando o efeito do composto sobre o número de parasitos/mL. O ajuste da curva foi realizado de acordo com a equação sigmoidal dose-resposta detalhada no item 3.13 | 89 |
| Gráfico 12 - Porcentagem de inibição do crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> na presença de diferentes concentrações do composto isolado reserpina. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média e desvio padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$ em relação ao controle | 90 |
| Gráfico 13 – Curva dose-resposta da reserpina sobre promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> demonstrando o efeito do composto sobre o número de parasitos/mL. O ajuste da curva foi realizado de acordo com a equação sigmoidal dose-resposta detalhada no item 3.13. Os pontos representam a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata | 91 |
| Gráfico 14 - Porcentagem de inibição do crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> na presença de diferentes concentrações dos compostos ensaiados em comparação com a pentamidina. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ em relação à pentamidina | 92 |
| Gráfico 15 - Porcentagem de inibição do crescimento de formas amastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> na presença de diferentes concentrações do composto isolado ácido úsnico. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média e desvio padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ em relação ao controle..... | 96 |
| Gráfico 16 – Curva concentração-resposta do ácido úsnico sobre amastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> demonstrando o efeito do composto sobre o número de parasitos/mL. O ajuste da curva foi realizado de acordo com a equação sigmoidal dose-resposta detalhada no item 3.13. Os pontos representam a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata | 97 |
| Gráfico 17 - Porcentagem de inibição do crescimento de formas amastigotas e promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> na presença de diferentes concentrações do composto isolado ácido úsnico e da droga pentamidina. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. a – $p < 0,001$ em relação ao controle; b – $p < 0,001$ em relação às concentrações correspondentes de pentamidina sobre amastigotas; c – $p < 0,001$ em relação à pentamidina sobre amastigotas; d – $p < 0,001$ em relação à concentração correspondente de ácido úsnico sobre amastigotas; e – $p < 0,05$ em relação às concentrações correspondentes de ácido úsnico sobre amastigotas..... | 98 |

TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Quantitativo do número de casos de Leishmaniose Visceral registrados por Região do Brasil, evidenciando o número total de casos registrados no país e o número de casos da Paraíba. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003 | 28 |
| Tabela 2 - Experimentos para transformação extracelular direta em amastigotas axenicas | 63 |
| Tabela 3 - Experimentos para cultivo direto de amastigotas axenicas..... | 65 |
| Tabela 4 - Resultados para transformação extracelular direta em amastigotas axenicas, após 5 dias de incubação..... | 78 |
| Tabela 5 - Resultados para transformação a partir de promastigotas metacíclicas do 2º repique, após 5 dias de incubação | 80 |
| Tabela 6 - Resultados para o cultivo direto de amastigotas axenicas, após 5 dias de incubação | 81 |
| Tabela 7 – Atividade antileishmania <i>in vitro</i> de compostos naturais isolados contra promastigotas de <i>L. chagasi</i> | 93 |
| Tabela 8 – Concentração capaz de inibir 50% do crescimento (IC ₅₀) dos compostos ensaiados sobre <i>L. chagasi</i> | 93 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- CEPA** – Comitê de Ética em Pesquisa Animal
- CVE** – Coordenação de Vigilância Epidemiológica
- DBM** – Departamento de Biologia Molecular
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- LTF** – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
- NNN** – Meio sólido Novy, McNeal e Nicolle
- SBF** – Soro Bovino Fetal
- IC50** – Concentração inibitória de 50% do crescimento
- IFN-γ** – Interferon-gama
- IL** – Interleucina
- IUPAC** - União Internacional de Nomenclatura Química Pura e Aplicada
- LV** – Leishmaniose visceral
- LVA** – Leishmaniose visceral americana
- MHC** - Complexo Principal de Histocompatibilidade
- MS** – Ministerio da Saúde
- NK** – Natural Killer
- NO** – Óxido nítrico
- OMS** - Organização Mundial de Saúde
- PI** - Ponto isoelétrico
- Sb^V** - antimoniais pentavalentes
- SINAN** - Sistema de Informação de Agravos de Notificação
- Th1** – Linfócitos T helper tipo 1
- Th2** – Linfócitos T helper tipo 2
- TGF- β** – Fator de transformação de crescimento β
- TNF- α** - fator de necrose tumoral alfa
- WHO** – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

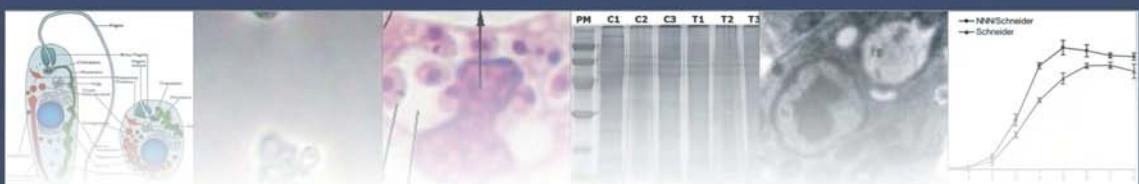
SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.1 Leishmanioses: Histórico e Visão Geral | 18 |
| 1.2 Ciclo de Vida..... | 23 |
| 1.3 A Leishmaniose Visceral: Quadro Epidemiológico Geral no Brasil, na Paraíba e em João Pessoa | 27 |
| 1.4 Cultivo de formas amastigotas <i>in vitro</i> | 33 |
| 1.5 Tratamento das leishmanioses | 36 |
| 1.6 Utilização de Fitoconstituíntes com Potencial Antileishmania | 40 |
| 1.7 Compostos utilizados neste estudo | 42 |
| 1.7.1 Ácido Úsnico | 42 |
| 1.7.2 Cumarina | 44 |
| 1.7.3 Quercetina | 46 |
| 1.7.4 Reserpina..... | 48 |
| 2 OBJETIVOS..... | 51 |
| 2.1 Objetivo Geral | 52 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 52 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 53 |
| 3.1 Compostos naturais isolados..... | 54 |
| 3.2 Preparo das soluções de estoque dos compostos | 54 |
| 3.3 Cepa de <i>L. chagasi</i> utilizada | 55 |
| 3.4 Cultivo e manutenção de promastigotas..... | 55 |
| 3.5 Avaliação do Perfil de Crescimento dos Parasitos..... | 56 |
| 3.6 Estabelecimento do Ciclo de Vida de <i>L. chagasi</i> <i>in vitro</i>..... | 57 |

| | |
|---|------------|
| 3.7 Infecção de Macrófagos Murinos com promastigotas de <i>L. chagasi</i>..... | 58 |
| 3.8 Isolamento de amastigotas extracelulares..... | 60 |
| 3.9 Transformação de Amastigotas | 62 |
| 3.9.1 Transformação extracelular direta | 63 |
| 3.9.2 Transformação a partir de promastigotas metacíclicas recém repicadas | 64 |
| 3.9.3 Isolamento e cultivo de amastigotas originadas pelo ciclo <i>in vitro</i> | 64 |
| 3.10 Avaliação da atividade anti-promastigota dos compostos naturais isolados..... | 65 |
| 3.11 Avaliação da atividade anti-amastigota do composto natural isolado Ácido Úsnico | 66 |
| 3.12 Utilização de Pentamidina como Referência | 67 |
| 3.13 Análise estatística | 67 |
| | |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 68 |
| 4.1 Avaliação do Perfil de Crescimento dos Parasitos..... | 69 |
| 4.2 Estabelecimento do Ciclo de Vida de <i>L. chagasi</i> <i>in vitro</i>..... | 71 |
| 4.3 Transformação de Amastigotas | 75 |
| 4.4 Avaliação da atividade anti-promastigota dos compostos naturais isolados..... | 84 |
| 4.5 Avaliação da atividade anti-amastigota do composto natural isolado Ácido Úsnico | 93 |
| | |
| 5 CONCLUSÕES | 100 |
| | |
| REFERÊNCIAS | 102 |



1 Introdução



1.1 Leishmanioses: Histórico e Visão Geral

Leishmania sp. é um protozoário parasita, agente etiológico das leishmanioses, um complexo de doenças infecto-parasitárias com espectro de sintomas variando de simples lesões cutâneas de cicatrização espontânea a lesões viscerais letais (ROBERTS et al., 2000). Assim como outras doenças parasitárias, as leishmanioses vêm acompanhando o desenvolvimento das civilizações humanas em um processo co-evolutivo (COX, 2002; LEBARBENCHON et al., 2008).

As mudanças nas atividades humanas podem influenciar as trajetórias evolutivas dos parasitos de diversas maneiras, seja por alterações no próprio hospedeiro bem como pelas alterações no meio ambiente provocadas pelo homem, visto que as populações humanas têm mudado constantemente seus hábitos alimentares, habitates, criado novas formas de viver, comer e, consequentemente, novas formas de contato e invasão de doenças nas comunidades. A evolução da resistência a drogas é um excelente exemplo de como o homem pode dirigir a evolução dos parasitos (LEBARBENCHON et al., 2008).

As alterações naturais e antrópicas do meio ambiente constituem fatores de risco que têm tornado as leishmanioses uma crescente preocupação na saúde pública em diversos países do mundo. Um dos fatores de risco mais importantes na atualidade é o aumento da urbanização e consequente formação de megalópoles com diversos problemas sanitários e de crescimento desordenado que criam condições cada vez maiores para transmissão de doenças como as leishmanioses (WHO, 2002).

A leishmaniose visceral foi noticiada pela primeira vez na Índia, em 1824, onde pacientes com febre foram tratados como se estivessem com malária e não responderam ao tratamento com quinina. Mas a descoberta do agente causador da doença, no caso *Leishmania donovani*, só veio acontecer muito mais tarde, pelos pesquisadores William

Leishman, médico do exército escocês, e Charles Donovan, Fisiologista da Universidade de Madras (Elliott, 1863).

Em 1900 William Boog Leishman, bacteriologista e patologista, identificou o parasita responsável pelo calazar ou febre negra como era conhecida na época. Seus resultados foram publicados em 1903 e as “estruturas ovóides” (amastigotas) passaram a ser chamadas de estruturas “Leishman-Donovan”, pois Charles Donovan havia chegado às mesmas conclusões de Leishman independentemente e publicado com poucos meses de diferença seus resultados. A doença é atualmente conhecida como Leishmaniose visceral (BIOGRAPHY OF COLONEL WILLIAM B. LEISHMAN).

Há uma antiga publicação do Jornal Americano de Saúde Pública, em 1926, informando que apesar de não ter sido William Leishman o primeiro a reconhecer o protozoário que leva seu nome, ele foi o primeiro a suspeitar da veracidade dessa observação, e por isso Ronald Ross sugere o nome *Leishmania* ao gênero e Leishmanioses ao grupo de doenças associadas à presença do protozoário (GENERAL SIR WILLIAM BOOG LEISHMAN, 1926).

Em 1936 já muitos estudiosos e membros do governo de vários países manifestavam preocupação com o aumento do número de casos de leishmanioses a cada ano em todo mediterrâneo, como notificado pelo secretário da Sociedade da Liga da Cruz Vermelha no Jornal Britânico de enfermagem em 1936 (LEISHMANIASIS, 1936).

Muito tempo após a descoberta dos parasitos agentes etiológicos das leishmanioses, em 1921, é que se conseguiu provas experimentais de que a transmissão da doença para humanos ocorria por meio de flebotomíneos, inicialmente descritos os pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, porém o conhecimento atual de como a picada de um flebótomo transmite o parasita só foi demonstrado por volta de 1941 (ADLER *et al*, 1941).

Inicialmente acreditava-se que as espécies de *Leishmania* do novo mundo e do velho mundo eram as mesmas, entretanto em 1911

Gaspar Vianna descobriu que existiam diferentes espécies na América do Sul, África e Índia, além de ter descrito a espécie *Leishmania braziliensis*. Desde então um grande número de novas espécies, exclusivas do novo mundo, têm sido descritas (VIANNA, 1911).

Atualmente, as leishmanioses infectam cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo e, a cada ano, estima-se que surjam dois milhões de novos casos de leishmanioses, com uma mortalidade de 5 a 15% dos afetados. Estes fatos levaram a Organização Mundial de Saúde - OMS a incluir as leishmanioses dentre as seis mais importantes endemias do mundo (HANDMAN, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

As espécies patogênicas do gênero *Leishmania*, protozoários unicelulares, são responsáveis por um amplo espectro de doenças no homem, denominadas de maneira geral como leishmanioses, que variam de sintomas e características clínicas de acordo com a espécie (PAN *et al*, 1993; WHO, 2000).

O gênero *Leishmania* é taxonomicamente classificado como: Reino - Protozoa; Infrareino - Excavata; Filo - Euglenozoa; Subfilo - Kinetoplasta; Ordem - Kinetoplastida; Sub-ordem - Kinetoplastina; Família - Trypanosomatidae. De acordo com características imunológicas, distribuição geográfica e aspectos clínicos da doença, o gênero *Leishmania* é dividido em dois sub-gêneros: *Leishmania* e *Viannia* (LAINSON e SHAW, 1987). Um esquema da classificação atual do gênero *Leishmania* é demonstrado na figura 1.

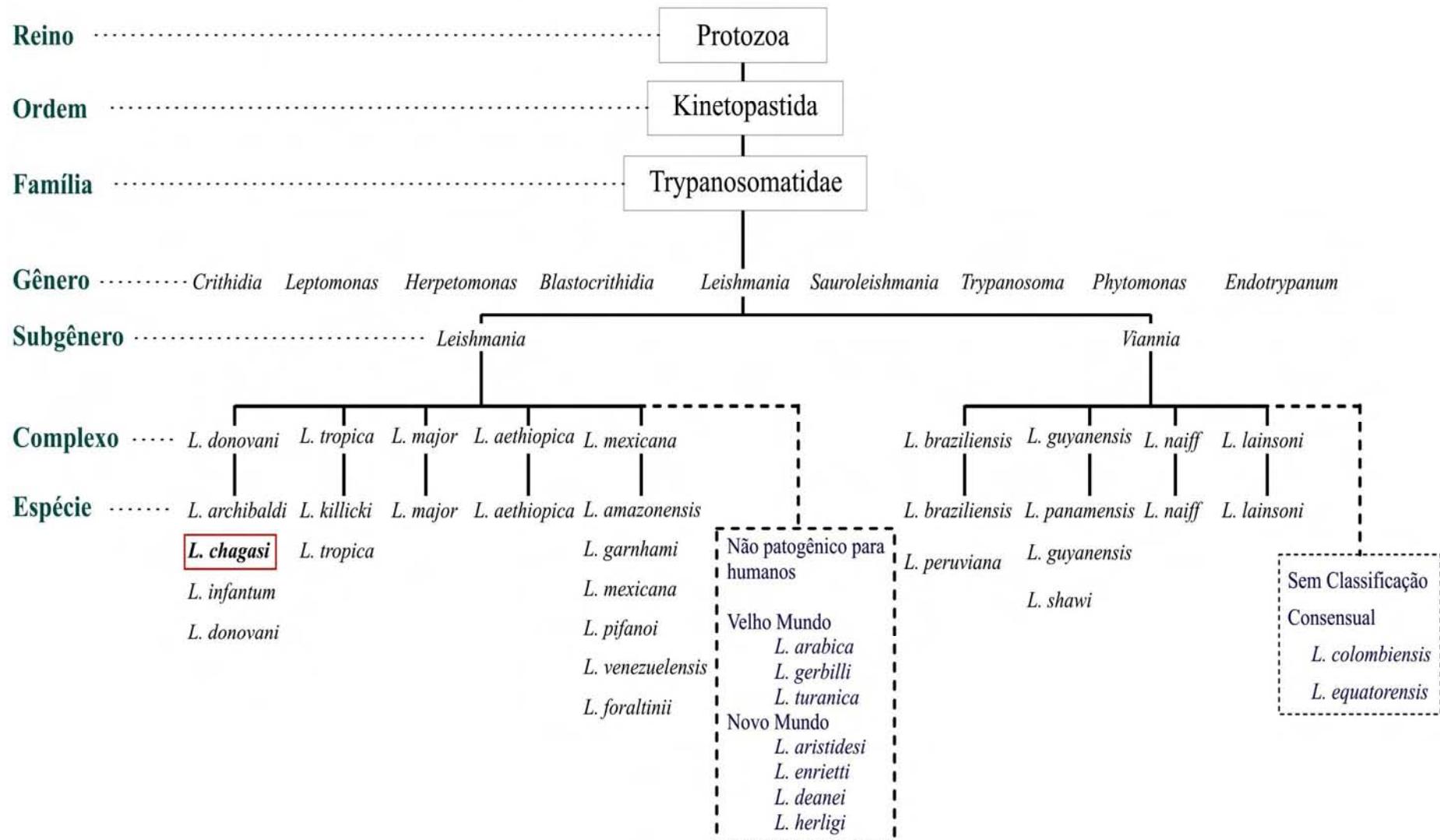


Figura 1 – Taxonomia do gênero *Leishmania*, demonstrando as espécies de cada complexo e ênfase na espécie alvo da presente pesquisa. Adaptado de Bañuls e colaboradores (2007).

As leishmanioses são, portanto, infecções parasitárias cujo agente patogênico são organismos do gênero *Leishmania*, transmitidos aos hospedeiros vertebrados pela picada das fêmeas de flebotomíneos infectadas. Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos como roedores, edentados, canídeos, marsupiais e primatas humanos e não-humanos.

As leishmanioses estão presentes em 88 países (4 continentes), sendo 66 no velho mundo e 22 no novo mundo, com uma estimativa de incidência de 1 a 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500 mil casos de leishmaniose visceral. A população que encontra-se em regiões de risco é estimada em 350 milhões de pessoas, e a prevalência mundial da doença é de 12 milhões de pessoas. Na Europa as infecções são encontradas em 16 países, incluindo França, Itália, Grécia, Espanha e Portugal, enquanto mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (DESJEUX, 1996; WHO, 2004).

Observa-se atualmente um aumento nos fatores de risco para as leishmanioses, sendo a maioria destes fatores antrópicos, como migração, desmatamento, urbanização ou mudanças na suscetibilidade dos hospedeiros humanos à infecção, como imunossupressão ou má nutrição. As infecções humanas com parasitas do gênero *Leishmania* dependem da relação ecológica entre as atividades humanas e os sistemas reservatórios da doença (ASHFORD, 2000).

Segundo Desjeux (2001) as leishmanioses incluem quatro entidades eco-epidemiológicas: leishmaniose visceral zoonótica e antrópica e leishmaniose cutânea zoonótica e antrópica. Nas formas antrópicas os humanos constituem a única fonte de infecção para o vetor, enquanto nos ciclos zoonóticos de transmissão, os animais constituem reservatórios que mantém e disseminam os parasitos.

Atualmente, as leishmanioses certamente têm uma distribuição geográfica mais ampla, visto que têm sido reportadas recentemente em

áreas previamente não-endêmicas como na região ocidental do Nilo ao sul do Sudão (DESJEUX, 2001).

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é causada por parasitas do complexo *Leishmania donovani*, apresentando três agentes etiológicos principais: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi*, sendo esta última endêmica ao Brasil. Essa doença tem atingido quase duas mil pessoas por ano no Brasil, sendo cerca de 90% dos casos no Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Ao contrário da leishmaniose cutânea, na leishmaniose visceral os parasitos podem ser encontrados em muitos tecidos, incluindo sangue, pulmões, rins, testículos, meninges e outros, e não apenas nos macrófagos da pele, sendo os principais centros de infecção as células fagocitárias do fígado, baço e medula óssea. Não há dados que justifiquem este tropismo dos parasitos na leishmaniose visceral, entretanto existem argumentos que se baseiam em sensibilidade a diferenças de temperatura, ou controle metabólico dos parasitos (CHANCE, 1981; MARZOCCHI et al.; 1994).

1.2 Ciclo de Vida

Os parasitos do gênero *Leishmania* são expostos a diferentes estresses e ambientes extra e intracelulares durante seu complexo ciclo de vida, o que caracteriza um modelo biológico genética e ecologicamente complexo. Uma das principais características destes parasitos é o fato de serem organismos ditos digenéticos por apresentarem dois estágios em seu ciclo de vida, sendo: a) um estágio extracelular, no vetor invertebrado (flebotomíneos hematófagos) – figura 3; e b) um estágio intracelular, no hospedeiro vertebrado – figura 4. Desta forma, os parasitos se apresentam basicamente sob duas formas morfológicas denominadas promastigotas, encontradas nos vetores invertebrados, e amastigotas,

encontradas nos hospedeiros vertebrados (SHAW, 1997; BATES et al., 2004; BAÑULS et al., 2007), como demonstrado na figura 2.

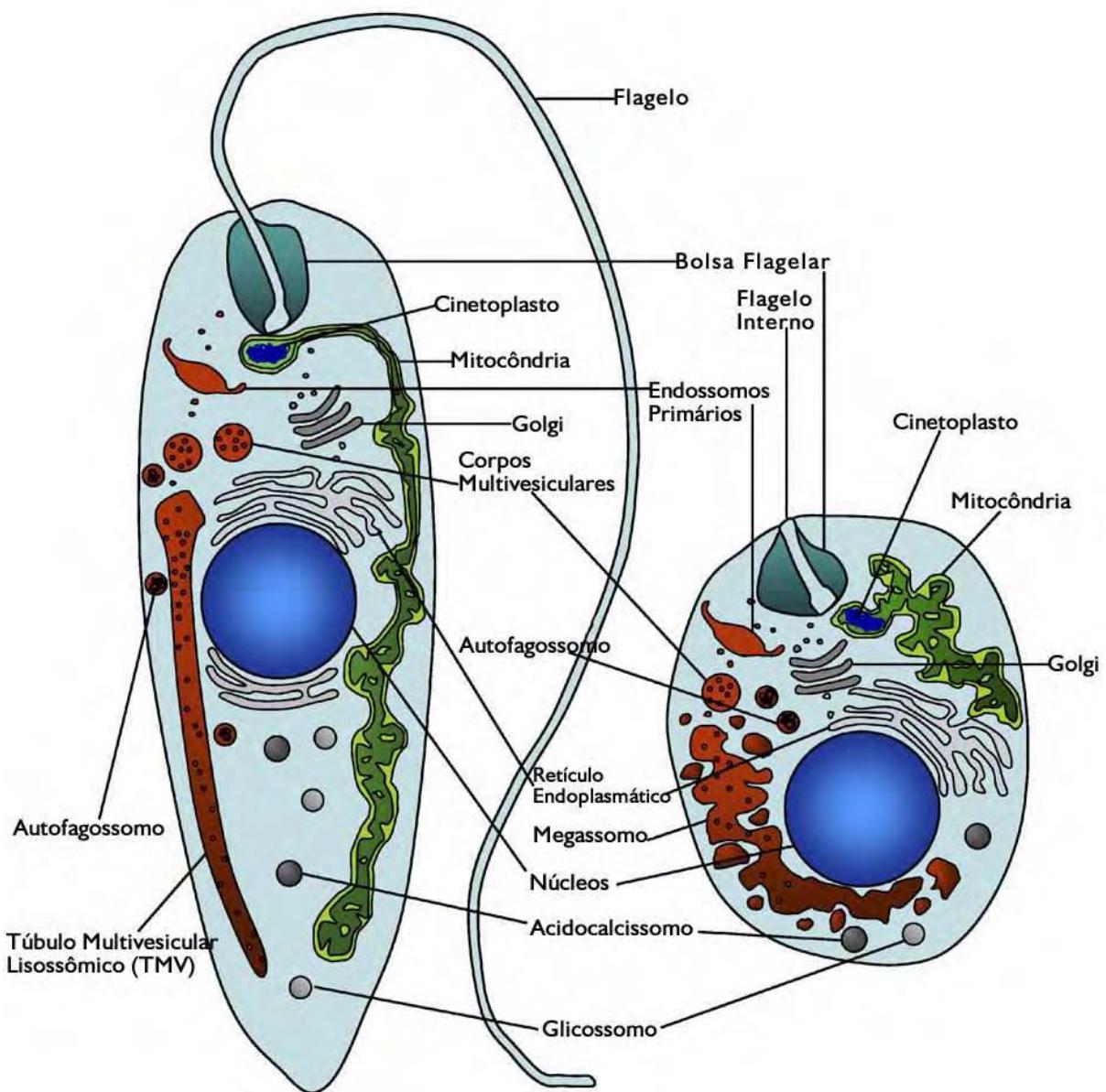


Figura 2 – Imagem esquemática das formas amastigota e promastigota, agentes etiológicos das leishmanioses. Detalhe para o núcleo, o cinetoplasto de cada forma (Fonte: Besteiro et al., 2007).

Os vetores invertebrados, pequenos insetos da ordem Diptera e sub-família Phlebotominae, são comumente denominados de flebotomíneos hematófagos. Dos seis gêneros de flebótomos descritos, apenas dois têm importância médica por serem vetores dos parasitos do

gênero *Leishmania*: *Phlebotomus*, encontrado no “Velho Mundo” com 12 sub-gêneros, e *Lutzomyia*, encontrado no “Novo Mundo” com 25 sub-gêneros (PIMENTA et al., 1994; KAMHAWI et al., 2000; BAÑULS et al., 2007).

O principal vetor para a *Leishmania chagasi*, agente etiológico da leishmaniose visceral na América Latina, é a espécie *Lutzomyia longipalpis*, provavelmente o vetor mais estudado nos últimos anos em regiões neotropicais. Entretanto, existem muitos pesquisadores que apontam para a existência de um complexo de espécies (BAUZER et al., 2007).

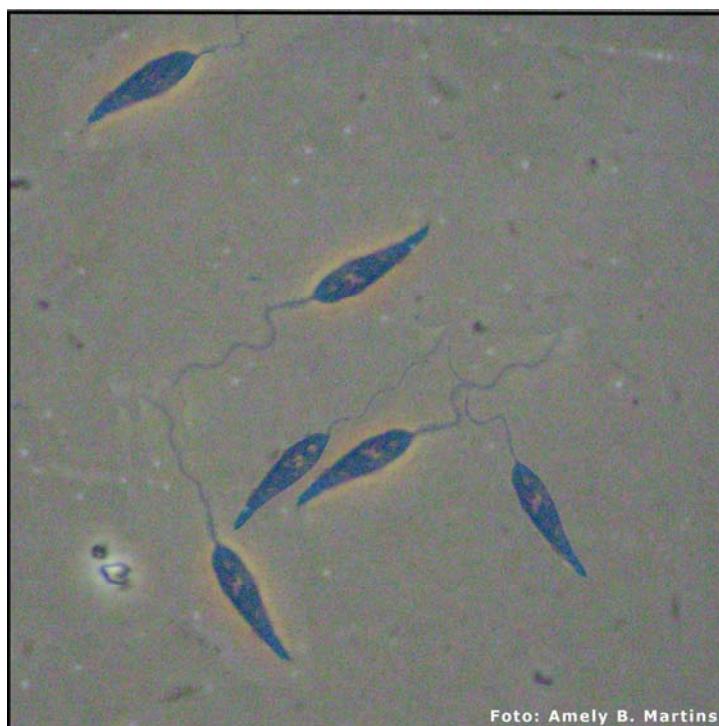


Foto: Amely B. Martins

Figura 3 – Fotomicrografia de uma cultura de formas promastigotas de *Leishmania chagasi*. Coloração hematológica por Hematoxilina e Eosina. Microscópio óptico com contraste de fase, aumento de 1000x.

Dentre os hospedeiros vertebrados encontram-se diferentes ordens de mamíferos: roedores, canídeos, edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados e primatas, sendo todos estes considerados potenciais reservatórios da doença. Humanos são também possíveis hospedeiros, mas na maioria dos casos são considerados hospedeiros acidentais (LAINSON e SHAW, 1987; DANTAS-TORRES, 2007).

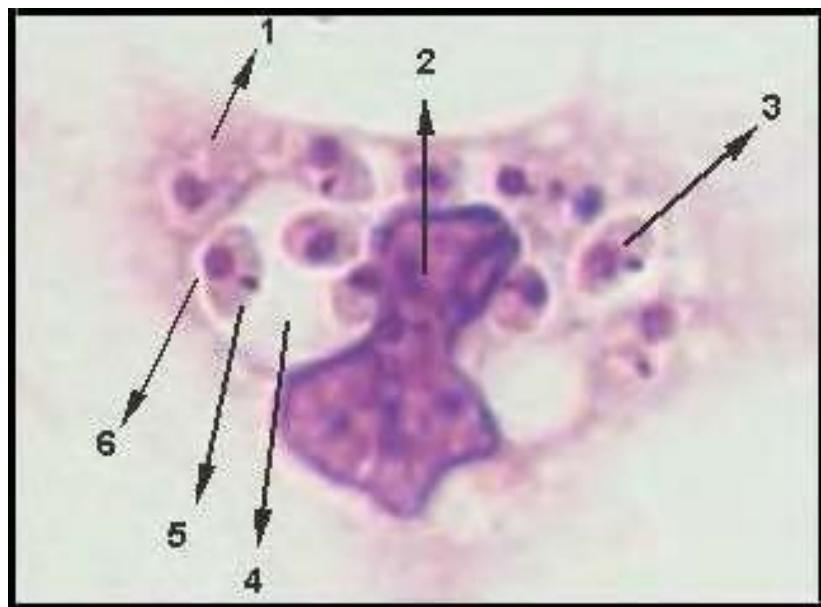


Figura 4 – Amastigotas em macrófagos de cultura corados por Giemsa. 1) macrófago; 2) Núcleo do macrófago; 3) Amastigota; 4) Fagolisossomo do macrófago; 5) Cinetoplasto; e 4) Núcleo da amastigota. Fonte: Carvalho e colaboradores (<http://www.biof.ufrj.br/laminario.html>).

O ciclo de vida (Figura 5) inicia-se quando uma fêmea de flebotomíneo contaminada suga o sangue do hospedeiro vertebrado e, enquanto se alimenta, promastigotas infectivas (metacíclicas) entram no hospedeiro vertebrado por meio da probóscide do inseto. As promastigotas são então fagocitadas pelos macrófagos do hospedeiro e no interior do fagolisossomo formado transformam-se em amastigotas que passam então a se reproduzir por fissão binária. As amastigotas aumentam de número dentro da célula até que esta seja rompida e passam a infectar outras células fagocíticas, dando continuidade ao ciclo (MARZOCHI *et al*, 1981).

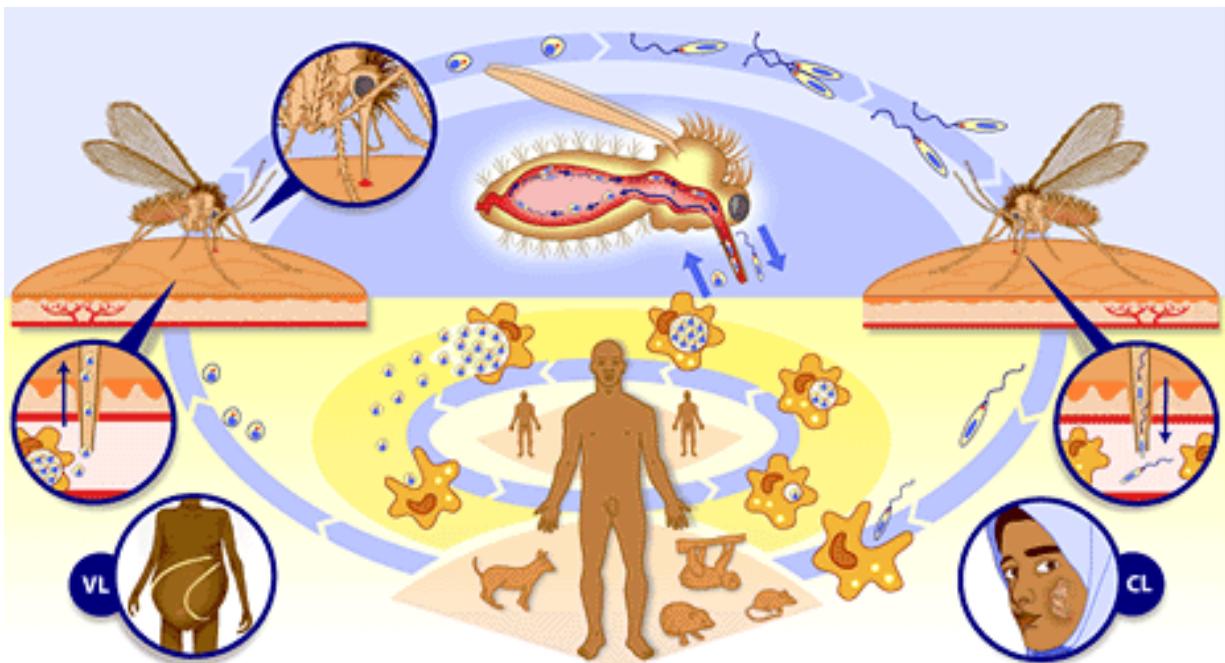


Figura 5 – Imagem esquemática do ciclo de vida das espécies do gênero *Leishmania*. (Fonte: WHO, 2004).

1.3 A Leishmaniose Visceral: Quadro Epidemiológico Geral no Brasil, na Paraíba e em João Pessoa

A leishmaniose visceral (LV) tem ampla distribuição mundial, ocorrendo na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas, onde também é denominada de Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ou calazar neo-tropical e, na América Latina a doença apesar de ocorrer em pelo menos 12 países apresenta cerca de 90% dos casos no Brasil, especialmente na Região Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Historicamente, data-se de 1913 o primeiro registro da leishmaniose visceral no Brasil, de paciente proveniente de Boa Esperança, Mato Grosso. Posteriormente, 41 casos positivos para a LV foram identificados em indivíduos provenientes das regiões Norte e Nordeste quando se pesquisava sobre a febre amarela (PENNA *et al*, 1934; ALENCAR *et al*, 1983).

No Brasil, a LV inicialmente tinha um caráter eminentemente rural, entretanto, recentemente a doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão e vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte. Atualmente, no Brasil a LV está registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, em aproximadamente 1.600 municípios (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos (1984-2002) os casos de LVA notificados somaram 48.455, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí, ou seja, com a assustadora maioria dos casos registrados no nordeste, como demonstrado na Tabela 1, a exemplo do ano de 2000, onde dentre um total de 4.858 casos registrados no Brasil 4.029 ocorreram na região Nordeste, o que representa 82,9% do número total de casos. Nos últimos dez anos, a média anual de casos no País foi de 3.156 casos, e a incidência de 2/100.000 hab., como demonstra a Figura 6 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste, entretanto, na medida em que a doença se expande para as outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, esta situação vem se modificando, a exemplo do período de 2000 a 2002, a Região Nordeste já representa uma redução na média dos casos para 77% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

**Tabela 1 – Número de casos de Leishmaniose Visceral por Região do Brasil
1991-2002**

| REGIÃO | 1991 | 1992 | 1993 | 1994 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Norte | 53 | 99 | 84 | 118 | 117 | 133 | 152 | 112 | 375 | 366 | 440 | 438 |
| Nordeste | 1.380 | 1.657 | 2.407 | 3.183 | 3.519 | 2.932 | 2.257 | 1.688 | 2.965 | 4.029 | 2.745 | 1.986 |
| Centro Oeste | 1 | 18 | 20 | 35 | 78 | 15 | 21 | 88 | 95 | 149 | 167 | 255 |
| Sudeste | 76 | 96 | 59 | 90 | 171 | 166 | 140 | 89 | 189 | 314 | 274 | 423 |
| ESTADO | | | | | | | | | | | | |
| Paraíba | 92 | 81 | 46 | 91 | 127 | 89 | 72 | 22 | 61 | 108 | 199 | 60 |
| TOTAL BRASIL | 1.510 | 1.870 | 2.570 | 3.426 | 3.885 | 3.246 | 2.570 | 1.977 | 3.624 | 4.858 | 3.646 | 3.102 |

Tabela 1: Quantitativo do número de casos de Leishmaniose Visceral registrados por Região do Brasil, evidenciando o número total de casos registrados no país e o número de casos da Paraíba. Fonte: Ministério da Saúde, 2003.

O Ministério da Saúde mantém o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) que é alimentado, principalmente, pela notificação e investigação de casos de doenças e agravos que constam da lista nacional de doenças de notificação compulsória, Portaria GM/MS Nº 5 de 21 de fevereiro de 2006, nesta portaria, publicada no Diário Oficial da União do dia 22 de fevereiro de 2006 – Seção I, encontram-se no anexo I a Leishmaniose Tegumentar Americana e a Leishmaniose Visceral, dentre outras.

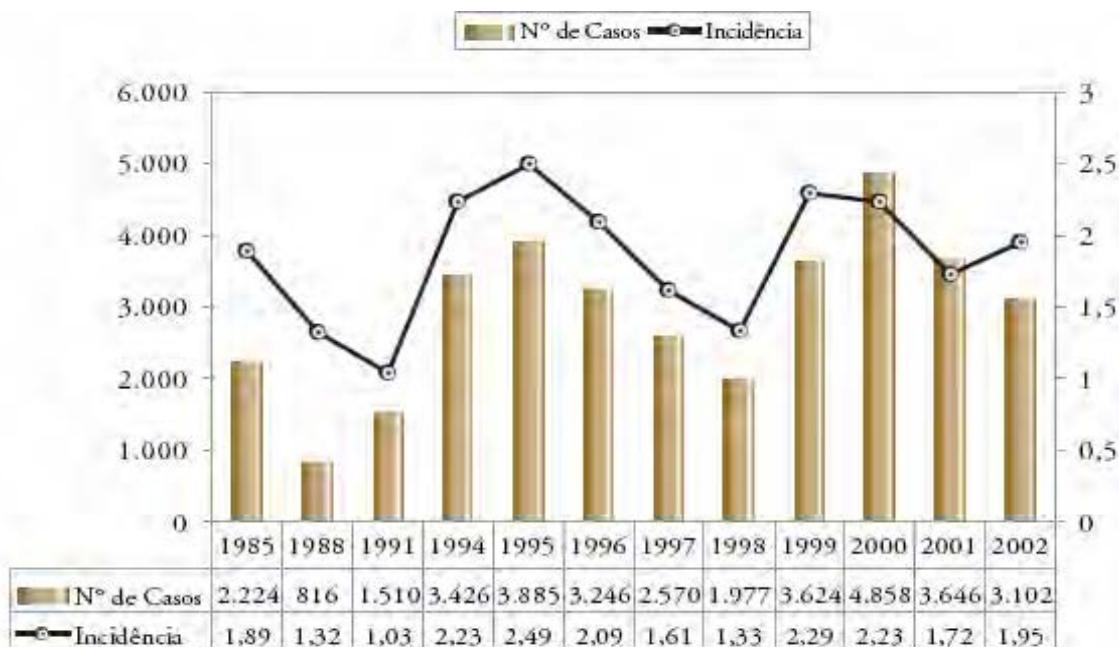


Figura 6 - Número de casos e coeficiente de incidência de leishmaniose visceral no Brasil, no período de 1985 a 2002. (Fonte: Ministério da Saúde, 2003).

O SINAN foi implantado no Brasil, no começo da década de 90, no entanto, esta implantação foi realizada de forma heterogênea nas Unidades Federadas e Municípios. A partir de 1998, o uso do SINAN foi regulamentado pela Portaria GM/MS nº 1882 de 18 de dezembro de 1997,

tornando obrigatória a alimentação regular da base de dados nacional pelos municípios, estados e Distrito Federal.

A utilização efetiva do SINAN permite a realização do diagnóstico dinâmico da ocorrência de doenças como as leishmanioses na população, podendo fornecer subsídios para explicações causais dos agravos de notificação compulsória, além de vir a indicar riscos aos quais as pessoas estão sujeitas, contribuindo assim, para a identificação da realidade epidemiológica de determinada área geográfica.

No Brasil, a LV apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste.

A urbanização e periurbanização da LVA vêm ocorrendo significativamente nos últimos dez anos, e este fato é evidenciado pelos dados epidemiológicos destes anos e em virtude dos surtos ocorridos em centros urbanos como Rio de Janeiro, RJ, Belo Horizonte, MG, Araçatuba, SP, Santarém, PA, Corumbá, MS, Teresina, PI, Natal, RN, São Luís, MA, Fortaleza, CE, Camaçari, BA, e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas, MS, Campo Grande, MS, e Palmas, TO (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). As áreas de transmissão da doença no Brasil estão representadas na Figura 7.

Com relação ao estado da Paraíba, de acordo com a Secretaria de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde do Estado (SES-PB) em 2007 foram notificados 39 casos e, nos últimos 5 anos há uma diminuição do número de casos notificados para o estado, entretanto, é importante ressaltar a dificuldade existente na divulgação dos números de casos em virtude da sub-notificação e da existência de diagnósticos imprecisos.

O gráfico 1 demonstra o número de casos de leishmaniose visceral notificados para o estado da Paraíba no período entre 1982 e 2007.

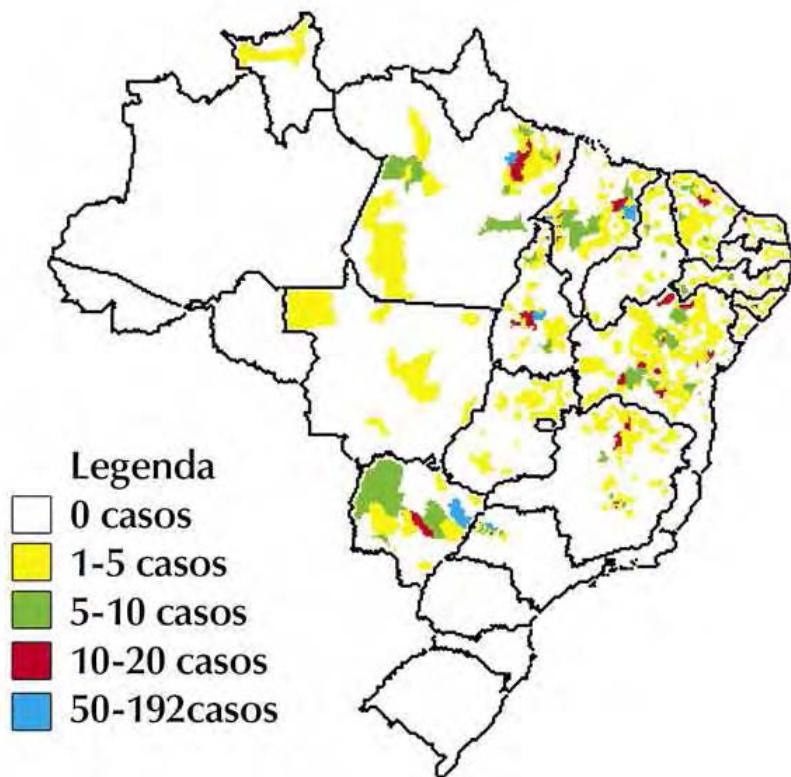


Figura 7 - Distribuição de casos autóctones de Leishmaniose Visceral no Brasil em 2002. (Fonte: Ministério da Saúde, 2003).

Atualmente o Estado conta com 139 municípios sem transmissão de leishmaniose visceral ou com casos silenciosos, 76 municípios com transmissão esporádica, seis municípios com transmissão moderada (Santa Rita, Conde, Barra de Santana, Campina Grande, Catolé do Rocha e Souza), e dois municípios com transmissão intensa (João Pessoa e Cajazeiras).

O gráfico 2 demonstra o número de casos de leishmaniose visceral notificados no período de 2000 a 2007 para a cidade de João Pessoa, evidenciando a mesma tendência de redução no número de casos notificados observada para o estado. Para 2008, até o mês de maio, já foram notificados 4 casos de leishmaniose visceral para a Capital do estado.

Leishmaniose Visceral na Paraíba

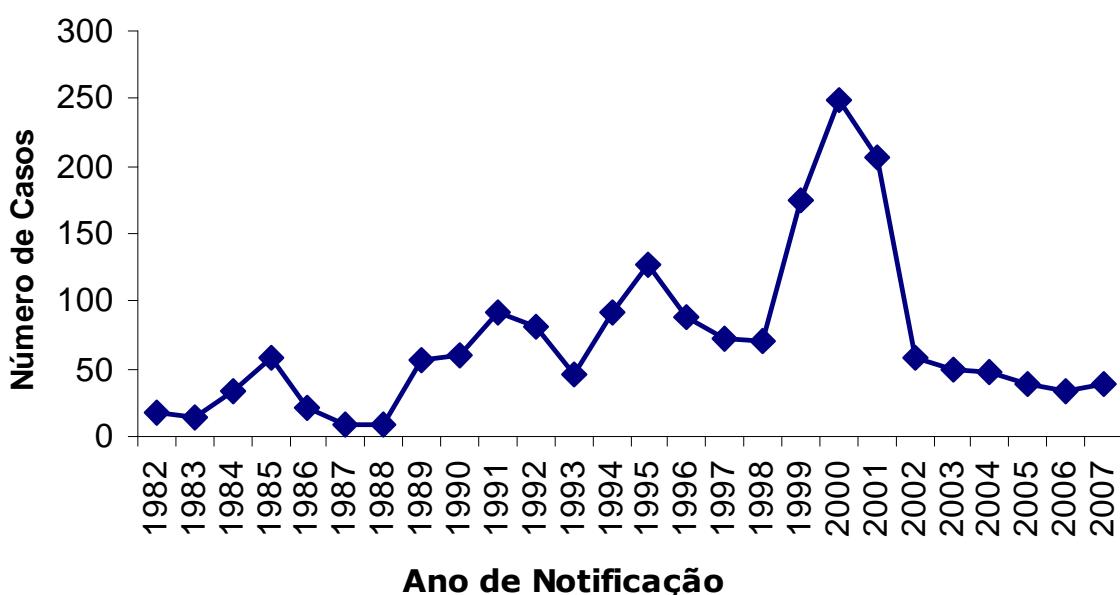


Gráfico 1 – Casos humanos de leishmaniose visceral registrados na Paraíba entre os anos de 1982 a 2007. (Fonte: FUNASA/SINAN – SES-PB).

Leishmaniose Visceral na Paraíba

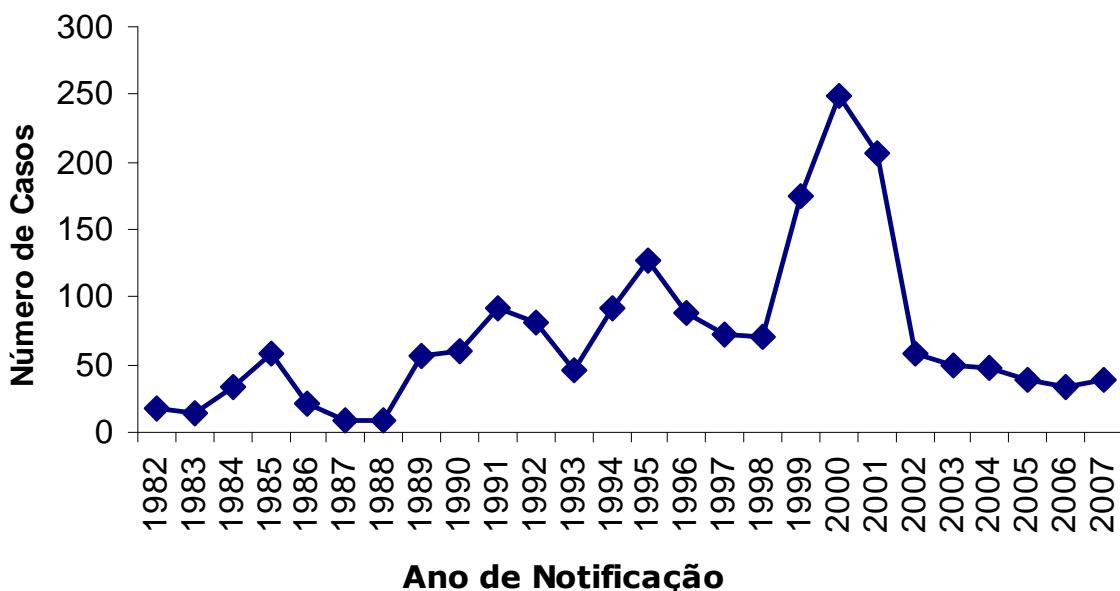


Gráfico 2 - Casos humanos de leishmaniose visceral registrados em João Pessoa entre os anos de 2000 a 2007. (Fonte: FUNASA/SINAN – SES-PB)

1.4 Cultivo de formas amastigotas *in vitro*

Uma importante etapa do ciclo da leishmaniose visceral, assim como de todas as leishmanioses, é a inoculação das formas promastigotas, flageladas e alongadas, no hospedeiro vertebrado e, logo após esta inoculação, a diferenciação destas em amastigotas imóveis, arredondadas e não-flageladas. Esta citodiferenciação certamente é essencial para o desenvolvimento da patogenicidade do parasito.

As amastigotas são responsáveis por todas as manifestações clínicas nos hospedeiros vertebrados, entretanto, a grande maioria das informações metabólicas, moleculares ou sobre a ação de agentes leishmanicidas dos parasitos do gênero *Leishmania* derivam de estudos

realizados com as formas promastigotas, principalmente pelo fato destas serem mais facilmente cultivadas *in vitro*.

Amastigotas têm sido obtidas a partir do cultivo de macrófagos murinos peritonais ou outras linhagens de macrófagos infectados, ou ainda a partir de tecidos infectados, porém apenas por um curto período de tempo (GUPTA et al., 2001). Apesar das limitações no cultivo das formas amastigotas, muitos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de padronizar modelos eficazes de cultivo *in vitro* dos parasitos sob esta forma.

Apesar das dificuldades, o cultivo de amastigotas *in vitro* constitui-se como uma importante ferramenta para estudos envolvendo avaliação da ação de drogas anti-leishmania, identificação de genes regulatórios e produção de vacinas.

A maioria das pesquisas publicadas envolvendo a transformação de promastigotas refere-se a espécies do Novo Mundo e, além disto, têm demonstrado que em muitos casos a alteração de temperatura e pH podem induzir a citodiferenciação em amastigotas (MOHAREB et al., 1996), entretanto, normalmente não se consegue manter esta cultura de amastigotas por um longo período. Muitos fatores parecem estar envolvidos na diferenciação e manutenção das culturas de amastigotas e, observando-se as pesquisas já realizadas neste sentido, percebe-se que cada espécie requer uma condição específica de temperatura, pH e nutrientes (CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998).

O primeiro relato de sucesso no cultivo *in vitro* das formas amastigotas, por um longo período de tempo, foi realizado com *Leishmania pifanoi* onde o aumento da temperatura foi considerado fator essencial para a transformação e cultivo das amastigotas (PAN et al., 1984). PAN e colaboradores (1993) demonstraram diversos métodos de adaptação (aumento da temperatura, diminuição do pH e alterações no meio de cultura) e também de caracterização das amastigotas cultivadas *in vitro* baseada em evidências biológicas, morfológicas, imunológicas e bioquímicas, demonstrando que estas amastigotas são muito similares às

encontradas em macrófagos ou tecidos contaminados, e que apresentam reação distinta das formas promastigotas quando expostas a diferentes tipos de estresses.

As amastigotas transformadas e cultivadas *in vitro* são denominadas de amastigotas axenicas, pois apesar de os testes (celulares, bioquímicos e moleculares) mais variados demonstrarem a intensa similaridade entre estas e as encontradas nos hospedeiros vertebrados tornou-se um consenso entre os pesquisadores da área adotar esta denominação para as transformadas e cultivadas *in vitro* (GUPTA et al., 2001).

Mohareb e colaboradores (1995) pesquisaram sobre a transformação de promastigotas de *L. tropica*, mantendo as culturas em três diferentes meios (Schneider, DMEM e RPMI-1640) e para cada tipo de meio foram avaliados os efeitos da elevação da temperatura para 34°C e da diminuição do pH para 5,8, sendo cada parâmetro observado separadamente e ambos ao mesmo tempo. Para este experimento conseguiram sucesso na transformação em Schneider e DMEM nas 3 condições avaliadas, sendo a maior taxa de transformação observada para o meio DMEM a 34°C e pH 5,8 no oitavo dia de cultivo. Entretanto as culturas de amastigotas axenicas não apresentaram êxito em repiques por longo período de tempo.

Em outra pesquisa, Mohareb e colaboradores (1996) demonstraram uma alta taxa de transformação das promastigotas de *L. major* quando inoculadas na presença de lisados celulares de macrófagos. Entretanto, esta técnica apresenta a desvantagem observada por outras técnicas de isolamento de amastigotas a partir de macrófagos ou tecidos infectados, a contaminação com células ou componentes celulares do hospedeiro vertebrado.

Outra pesquisa muito importante, realizada por Cysne-Finkelstein e colaboradores (1998), demonstrou a intensa relação entre a metaciclogênese (população de promastigotas no início da fase estacionária, pequenas, afiladas e com flagelo relativamente longo) e a

eficiência na transformação em amastigotas *in vitro* para *L. amazonensis*. Neste trabalho conseguiu-se a transformação de 100% das promastigotas em amastigotas quando pelo menos 73% da cultura inicial de promastigotas encontrava-se em fase de metacilogênese. As promastigotas metacíclicas *in vivo* encontram-se na válvula estomodeal dos flebotomíneos. Entretanto, estes autores demonstraram que para promastigotas cultivadas *in vitro* a maior quantidade de metacíclicas é encontrada entre o terceiro e quarto dias de cultivo em culturas de até 5 repiques.

Em virtude da dificuldade em se estabelecer modelos de infecção animal para *Leishmania chagasi* e, além disto, a necessidade de se minimizar o máximo possível a utilização de animais em laboratório, o estabelecimento de modelos que mimetizem o ciclo de vida destes parasitos é de grande importância para o desenvolvimento de diversas pesquisas.

1.5 Tratamento das leishmanioses

O tratamento usual para as leishmanioses (visceral e cutânea), desde a década de 60, é baseado no uso dos compostos antimoniais pentavalentes (Sb^V). Os principais representantes destes antimoniais são o estibogluconato de sódio e o antimoníato de meglumina (BERMAN, 1985; CROFT et al., 2006; SUNDAR et al., 2006).

No Brasil, os antimoniais pentavalentes ainda são a droga de primeira escolha no tratamento da leishmaniose visceral, sendo amplamente utilizado o antimoníato de meglumina sob denominação comercial de Glucantime®, enquanto em outras partes do mundo, como Índia, utilizam o estibogluconato de sódio sob denominação comercial de Pentostan® (FIGUEIREDO et al., 1999; RATH et al., 2003; CROFT et al., 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O mecanismo de ação destes fármacos não está ainda totalmente elucidado, mas sabe-se que eles apresentam elevada toxicidade e dificuldade de administração. Além disto, já é demonstrado que os antimoniais pentavalentes (Sb^V) são reduzidos a trivalentes (Sb^{III}) em fagolisossomos no interior dos macrófagos, e que estes Sb^{III} são mais tóxicos ao parasito por inibir a atividade glicolítica, a via de oxidação de ácidos graxos e a fosforilação da adenosina difosfato (ADP). Entretanto, os antimoniais pentavalentes são cerca de dez vezes menos tóxicos a mamíferos que os trivalentes, por isso não se faz a administração direta destes últimos (BERMAN et al., 1985; BERMAN et al., 1987; ROBERTS et al., 1995; EPHROS et al., 1999; OUELLETTE et al., 2004; SUNDAR et al., 2006).

Outros mecanismos de ação reportados para antimônios pentavalentes são: bloqueio não específico de proteínas de amastigotas, inibição da DNA Topoisomerase I, e aumento da suscetibilidade dos parasitos ao estresse oxidativo pelo aumento do efluxo de tióis, glutationa e tripanotiona em virtude da alteração do potencial tiol redox (WALKER et al., 2004; CHAKRABORTY et al., 1988).

Ao longo da última década drogas alternativas ou novas formulações das drogas padrões começaram a ser avaliadas e registradas para uso em diversos países, caracterizando a busca atual para vencer os novos desafios da quimioterapia da leishmaniose visceral, como a ampla resistência aos antimônios pentavalentes, a impossibilidade de aumentar as doses em virtude dos efeitos colaterais graves, o alto custo dos tratamentos e as co-infecções com HIV (CROFT et al., 2006; SUNDAR et al., 2006).

A Anfotericina B tem apresentado bons resultados no tratamento das leishmanioses. Trata-se de um antibiótico antifúngico isolado de *Streptomyces nodosus*, cuja atividade leishmanicida foi primeiramente descrita na década de 60 (SUNDAR et al., 2006).

A anfotericina B atua nas formas promastigotas e amastigotas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* e está indicada como primeira escolha em

pacientes com sinais de gravidade com idade inferior a 6 meses ou superior a 65 anos, desnutrição grave, co-morbidades, incluindo infecções bacterianas ou manifestações clínicas como icterícia, hemorragias e edema (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Atualmente, duas formas da anfotericina B estão disponíveis pelo Ministério da Saúde: o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal, com eficácia comparáveis, sendo que esta última apresenta menor toxicidade e custo mais elevado, o que pode dificultar o seu uso em saúde pública (OUELLETTE et al., 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A pentamidina, uma diamidina aromática, foi usada como segunda opção no tratamento da leishmaniose visceral em vários países, especialmente na Índia, entretanto devido à alta toxicidade e casos de diabetes dependentes de insulina relatados como efeitos colaterais teve o uso totalmente abolido na Índia (SUNDAR et al., 2006).

Existem atualmente diversas drogas sendo testadas já na fase clínica para prospecção de novos medicamentos visando o tratamento das leishmanioses (BERMAN, 1981; CROFT et al., 2006; SUNDAR et al., 2006), a exemplo de:

a) Paromomicina - um antibiótico aminoglicosídeo extraído de culturas de *Streptomyces rimosus* originalmente identificado como antileishmanicida na década de 1960, está em fase III de estudos clínicos;

b) Sitemaquina - um análogo oral da 8-aminoquinolina primeiramente descrito na década de 1970 por *Walter Reed Army Institute os Research* (WRAIR, <http://wrairwww.army.mil/>), no Brasil teve êxito em 67% dos pacientes infectados por *L. chagasi* tratados com dose diária de 2 mg/Kg por 28 dias, mas ainda está em fase II de estudos clínicos;

c) Imiquimode - um composto antiviral usado primariamente no tratamento do papilomavírus humano (HPV), é um imunomodulador estimulante da resposta imune no local de aplicação, além disto, induz a produção de citocinas e óxido nítrico pelos macrófagos, mas tem apresentado efeito apenas contra a leishmaniose cutânea;

d) Miltefosina – inicialmente estudada como droga antitumoral é a primeira droga oral sendo testada para o tratamento da leishmaniose visceral. Sua atividade antileishmania foi inicialmente demonstrada na década de 1980, atualmente está em fase IV de estudos clínicos e em 2002 foi aprovada na Índia para o tratamento oral da leishmaniose visceral e em 2005 na Colômbia para o tratamento da leishmaniose cutânea. Ainda apresenta limitações que tornam necessárias otimizações em sua estrutura, como teratogenicidade, meia-vida prolongada, indução a distúrbios intestinais e toxicidade renal.

Ao contrário das duas últimas décadas onde as únicas opções de tratamento das leishmanioses eram os antimônios pentavalentes, atualmente tem-se observado um considerável avanço nas pesquisas e no desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

Entretanto, a toxicidade desses agentes, o alto custo dos tratamentos, as dificuldades de administração, o surgimento de resistência às drogas utilizadas e a persistência dos efeitos colaterais, mesmo após alterações das doses e duração do tratamento, são grandes desvantagens ainda existentes. Não apenas os antimônios pentavalentes, mas drogas alternativas, como a anfotericina B e a pentamidina, também possuem efeitos colaterais desagradáveis (ROCHA et al., 2005; CARVALHO et al., 2001). Neste sentido, a procura contínua por novos agentes terapêuticos para as leishmanioses ainda é essencial.

O cenário da pesquisa em prol da quimioterapia ou prevenção das leishmanioses são animadores, entretanto, a falta de resposta aos medicamentos mais usuais, a toxicidade medicamentosa, os efeitos colaterais graves e o alto custo do tratamento tornam urgente a necessidade de drogas efetivas que reponham e/ou suplementem as de uso atual.

Uma alternativa pertinente seria a utilização de compostos vegetais isolados que podem fornecer novos modelos terapêuticos no tratamento de leishmanioses. De fato, plantas com propriedades terapêuticas são de grande relevância na medicina em todo o mundo,

principalmente nos países em desenvolvimento, onde as drogas são importadas, de alto custo e a maioria das vezes inacessíveis à grande parte da população (MINJA, 1994; ROCHA, et al. 2005).

1.6 Utilização de Fitoconstituíntes com Potencial Antileishmania

A falta de resposta aos medicamentos mais usuais, a toxicidade medicamentosa, os efeitos colaterais graves e o alto custo do tratamento tornam urgente a necessidade de drogas efetivas que reponham e/ou suplementem as de uso atual (MINJA, 1994). Uma alternativa pertinente seria a utilização de compostos vegetais isolados que podem fornecer novos modelos terapêuticos no tratamento de leishmanioses (ROCHA, et al. 2005).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos no intuito de se caracterizar a ação de compostos naturais isolados, extratos ou frações de origem vegetal sobre os parasitos do gênero *Leishmania*, como foi realizado no presente estudo.

O extrato fenólico da fibra da casca da palmeira *Cocos nucifera* a 10 µg/mL demonstrou-se significativamente leishmanicida sobre promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* (MENDONÇA-FILHO et al., 2004). Delorenzi e colaboradores (2001) demonstraram a ação antileishmania da fração clorofórmica e do alcalóide coronaridine, extraídos de *Peschiera australis* que ocorre no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai. A atividade antileishmania foi observada em promastigotas e amastigotas intracelulares em macrófagos murinos infectados.

Braga e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antileishmania de 24 extratos metanólicos oriundos de 20 diferentes espécies vegetais sobre *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Dentre todos os

extratos avaliados 10 tiveram IC_{50} menores que 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *L. amazonensis* sendo que a menor (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi observada para a espécie *Vernonia polyanthes* (nome comum: assa-peixe). Para a *Leishmania chagasi* apenas um extrato, oriundo das folhas da espécie *Ocimum gratissimum* (nome comum: alfavacão) demonstrou IC_{50} igual a 71 $\mu\text{g}/\text{mL}$, todos os outros demonstraram valores acima de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

As propriedades imunomodulatórias do alho (*Allium sativum*) foram avaliadas sobre camundongos infectados por *L. major*, indicando que o tratamento com alho é eficaz tanto isoladamente quanto em associação ao antimônio pentavalente Glucantime®, por desencadear uma resposta associada a citocinas relacionadas a linfócitos tipo TH1 (GHAZANFARI et al., 2000).

Outra forma de investigação da ação de fármacos *in vivo*, que tem se demonstrado bastante eficaz e que pode funcionar como uma alternativa para confirmação dos resultados prévios observados *in vitro*, ou como forma de minimizar a dificuldade que existe de fazer com que os compostos alcancem as amastigotas intracelulares, refere-se à utilização de polímeros biodegradáveis ou nanopartículas (como lectinas) que encapsulam os fármacos, de maneira que estes sejam fagocitados pelas células do sistema fagocítico mononuclear, como macrófagos, e alcancem os parasitos (TORRES-SANTOS et al., 1999; PIÑERO et al., 2006).

O composto 2',6'-Dihidroxi-4'-Metoxichalcona, isolado da espécie *Piper aduncun*, encapsulado por nanopartículas de poli(D,L-Lactida), apresentou maior atividade antileishmania sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, quando comparado ao composto não encapsulado (TORRES-SANTOS et al., 1999).

Em outro estudo, realizado por Piñero e colaboradores (2006), foi avaliada a ação de uma chalcona semi-sintética (*trans*-chalcona) sobre promastigotas de *L. braziliensis*, *L. tropica*, *L. infantum* e *L. amazonensis*, demonstrando potente efeito inibitório em todas as linhagens ensaiadas. Além disto, eles avaliaram a *trans*-chalcona encapsulada em polímeros de ácido polilático (PLA) ou ácido polilático/glicosado (PLGA) sobre

camundongos infectados por *L. amazonensis*, reduzindo as lesões em 31,25% para o composto encapsulado com PLGA e 10,75% para PLA, inibindo a patogenicidade do parasita *in vivo*.

A enorme potencialidade existente no uso de plantas medicinais ainda está longe de ser esgotada, principalmente em virtude da grande biodiversidade ainda inexplorada. Diversas possibilidades e soluções, para as atuais e futuras necessidades, certamente serão encontradas no reino vegetal, seja pela descoberta e desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica, novas aplicações na tecnologia farmacêutica ou pelo desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficiência de ação (SCHENKEL et al., 2003).

1.7 Compostos utilizados neste estudo

1.7.1 Ácido Úsnico

O ácido úsnico (figura 8) é um metabólito secundário encontrado em diversos gêneros de liquens epífitos, como *Usnea*, *Cladonia*, *Lecanora*, *Ramalina*, *Evemia*, *Parmelia* e *Alectoria*. Foi inicialmente isolado pelo pesquisador alemão W. Knop em 1844, e sintetizado pela primeira vez por Curd e Robertson entre 1933 e 1937. Este composto é denominado como 2,6-Diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzenofuradiona pela IUPAC, possui fórmula molecular igual a $C_{18}H_{16}O_7$ e massa molecular de 344,31. Além da denominação mais comum como ácido úsnico também pode ser chamado de ácido usninico ou usneína (HAWORTH et al., 1971; CARDARELLIA et al., 1997; INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

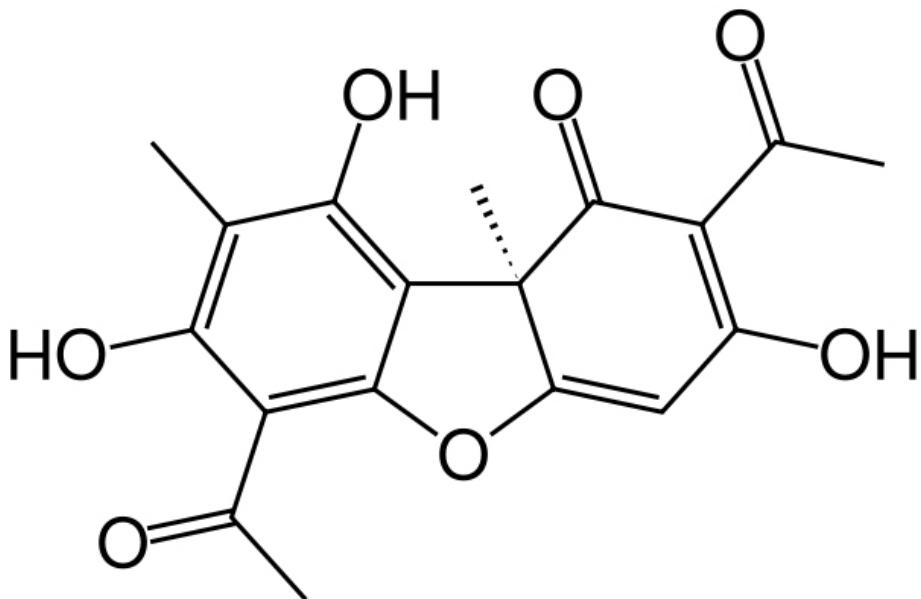


Figura 8 – Estrutura química do ácido úsnico.

O ácido úsnico possui um amplo espectro de propriedades biológicas, dentre estas se destaca principalmente a grande atividade antimicrobiana, além das atividades antivirais e antimitótica (LAUTERWEIN et al., 1995; CAMPANELLA et al., 2002; COCCHIETTO et al., 2002; ELO et al., 2007).

Diversos estudos demonstram a atividade antimicrobiana do ácido úsnico, principalmente sobre bactérias gram-positivas. A exemplo destacamos os experimentos realizados por Lauterwein e colaboradores (1995) que demonstraram a atividade antimicrobiana desta molécula sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, e algumas espécies anaeróbias, como espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Clostridium*. Mesmo sobre linhagens de *Enterococcus* resistentes à vancomicina e *S. aureus* resistentes à meticilina o ácido úsnico apresentou atividade antimicrobiana eficiente (ELO et al., 2007).

Relata-se na literatura uma importante ação antimitótica e anti-proliferativa do ácido úsnico, que tem demonstrado grande importância

em estudos sobre o controle de células cancerígenas (CARDARELLIA et al., 1997; SANTOS et al., 2006).

Outras pesquisas revelam ainda que o ácido úsnico tem uma importante propriedade inseticida, demonstrada contra as larvas do mosquito *Culex pipiens* (CETIN et al., 2008), e atividade antiviral, observada sobre poliomavírus de ratos (CAMPANELLA et al., 2002).

A atividade anti-leishmania do ácido úsnico foi avaliada com promastigotas das espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani*, apresentando-se eficiente para todas, e sobre camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*, apresentando resposta satisfatória quando administrado diretamente nas lesões (FOURNET et al., 1997).

1.7.2 Cumarina

A cumarina (Figura 9) é um composto químico encontrado em diversas espécies vegetais como alguns tipos de feijão, baunilha, morango, cereja, canela e erva-doce. Tem um aroma doce e, em decorrência desta característica tem sido utilizado em perfumes desde 1882 (MCNAUGHT et al., 1997).

Também é denominada como 1,2-benzopirano, possui fórmula molecular $C_9H_6O_2$ e massa molecular igual a 146,14. Tem sido isolada de espécies dos gêneros *Asperula* e *Melilotus* (MCNAUGHT et al., 1997).

A cumarina é composto ativo de diversos medicamentos já comercializados, como VENALOT® e VECASTEN®. Cada comprimido de VENALOT, que é recomendado para problemas de circulação periférica venosa e linfática, contém 15 mg de cumarina, enquanto o VECASTEN, que é um fitoterápico extraído de *Melilotus officinalis* e apresenta recomendações de uso similares ao VENALOT, contém cerca de 4 mg de cumarina por comprimido.

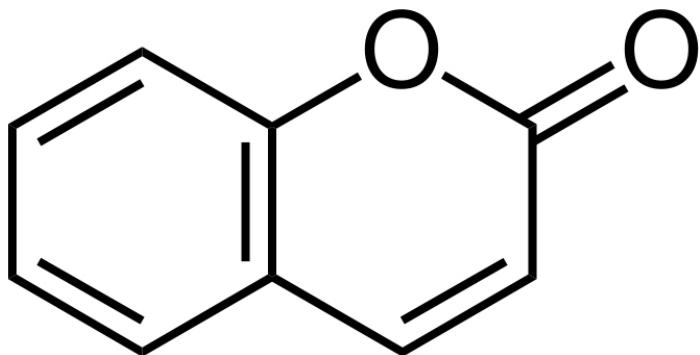


Figura 9 – Estrutura química da cumarina.

Amplamente utilizada como anti-coagulante, a cumarina tem-se demonstrado eficiente na administração oral em pacientes com próteses cardíacas mecânicas (GOHLKE-BÄRWOLF et al., 2008). Além disto, outra recente pesquisa evidenciou a atividade da cumarina na regulação do hipertireoidismo, sem desenvolver hepatotoxicidade, possivelmente por inibir a ação da tireóide tanto em nível glandular quanto no nível de conversão de T4 em T3 (PANDA et al., 2007).

Outra atividade já descrita para a cumarina isolada a partir da espécie vegetal *Phymatodes scolopendria* é a de broncodilatação dependente de relaxamento traqueal (RAMANITRAHASIMBOLA et al., 2005).

A cumarina extraída de *Amburana cearensis* também foi avaliada sobre *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani*, demonstrando atividade anti-leishmania para todas as linhagens ensaiadas. Além disto, a cumarina apresentou atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, e *Trichophyton mentagrophytes* (BRAVO et al., 1999).

1.7.3 Quercetina

A Quercetina (Figura 10) é um flavonóide natural amplamente distribuído no Reino Vegetal, cuja nomenclatura pela IUPAC (União Internacional de Nomenclatura Química Pura e Aplicada) é: 2-(3,4-Dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopirano-4-1 (MCNAUGHT et al., 1997; HAVSTEEN, 1983).

Os flavonóides, por sua vez, são compostos polifenóicos que apresentam estrutura química que favorece sua ação antioxidante composta por 2 anéis de benzeno ligados por um grupo pirano (C6-C3-C6). Esta importante classe de metabólitos secundários de plantas pode ser amplamente encontrada no reino vegetal e em diversos itens comumente utilizados na alimentação humana, além disto, apresentam um amplo espectro de propriedades farmacológicas (MCNAUGHT et al., 1997; HAVSTEEN, 1983).

A quercetina, uma aglucona de diversos glicosídeos como rutina e quercitrina, apresenta-se sob forma de um pó de coloração amarelo-ouro, possui fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7$ e massa molecular igual a 302,24. Também é amplamente distribuída no reino vegetal, sendo encontrada em diversos vegetais, vinho tinto e própolis (MITTRA et al., 2000).

O consumo diário médio da quercetina é de cerca de 30 mg/dia, entretanto apenas 30-50% da quercetina ingerida é absorvida pelo organismo, enquanto a quantidade restante apenas passa pelo trato intestinal. Fabricantes de suplementos alimentares com quercetina sugerem uma suplementação desta dose diária para 400 a 1.200 mg/dia, para garantir as propriedades anti-inflamatórias, anti-histamínicas, anti-virais e anti-oxidantes atribuídas à quercetina (ROSS et al., 2002; JAKUBOWICZ-GIL et al., 2008).

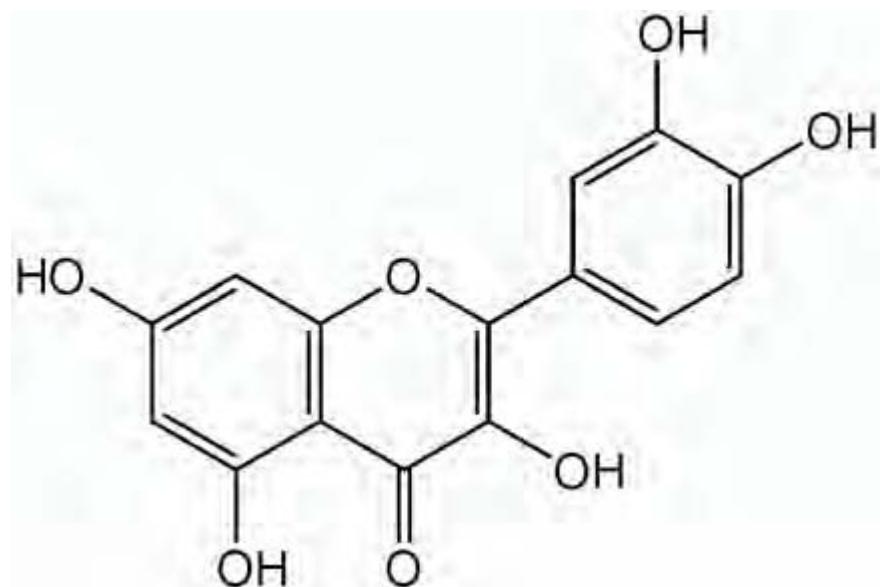


Figura 10 – Estrutura química da quercetina.

Diversas pesquisas têm demonstrado o potencial anti-tumoral da quercetina, principalmente por sua característica antioxidante, por atuar na regulação da expressão de oncogenes e proteínas do ciclo celular (RANELLETTI et al., 2000; CASAGRANDE et al., 2001; LÓPEZ-LÁZARO, 2002).

A alta capacidade antioxidante da quercetina e a capacidade de combater radicais livres têm sido relacionadas também à característica neuro-protetora deste composto, evidenciada por diversos estudos que demonstram a capacidade da quercetina de prevenir o estresse oxidativo prevenindo a apoptose em neurônios (MERCER et al., 2005; SILVA et al., 2008). Entretanto pesquisas recentes demonstram que a quercetina também apresenta toxicidade aos neurônios com IC_{50} de 15 μ g/mL (JAKUBOWICZ-GIL et al., 2008).

A ação anti-leishmania da quercetina têm sido relatada para algumas espécies do gênero *Leishmania*, mas não foi investigada para a espécie *Leishmania chagasi*. Sobre *Leishmania donovani* a quercetina demonstrou atividade leishmanicida em promastigotas e amastigotas

intracelulares (MITTRA et al., 2000; TASDEMIR et al., 2006; SEN et al., 2008).

A atividade anti-tripanosomatídeos da quercetina também foi relatada por Tasdemir e colaboradores (2006) sobre as espécies *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *T. cruzi*, exibindo menor IC₅₀ (8,3 µg/mL) para *T. brucei*.

1.7.4 Reserpina

A reserpina (figura 11) é um metabólito secundário natural extraído de espécies do gênero *Rauwolfia*, especialmente de raízes de *Rauwolfia serpentina* e *Rauwolfia vomitaria*, que têm sido utilizadas na medicina tradicional por muitos séculos na Índia, onde as raízes das referidas espécies vegetais eram utilizadas em chás no combate a distúrbios neurológicos. As propriedades farmacológicas da *R. serpentina* é documentada por povos hindus entre os anos 1000 e 2000 a.c, em que se relatam suas supostas características sedativas (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2004).

Este alcalóide foi isolado na metade do século 20 e, deste então, tem representado um grande avanço no tratamento da esquizofrenia e marcou o início das pesquisas voltadas para a psicofarmacologia. O primeiro pesquisador a confirmar os efeitos sedativos e hipotensores dos compostos do gênero *Rauwolfia* foi Emil Schlettler em meados de 1940, e os primeiros que publicaram pesquisas demonstrando a eficácia antipsicótica da reserpina foram Nathan Kline, Robert Noce e Jean Delay em meados de 1954 (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2004).

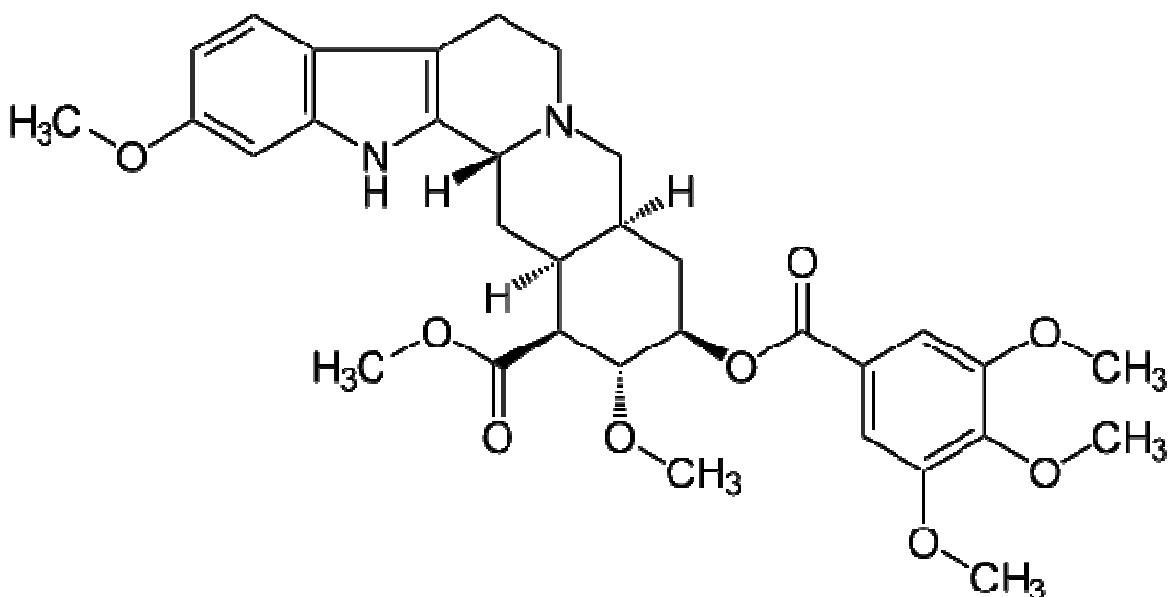


Figura 11 – Estrutura química da reserpina.

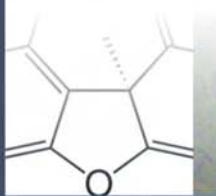
A reserpina, denominada como metil-11,17 α -dimetoxi-18 β -[(3,4,5-trimetoxibenzoil)oxi]-3 β ,20 α -ioinban-16 β -carboxilato, possui fórmula molecular igual a $C_{33}H_{40}N_2O_9$ e massa molecular de 608,68 (MCNAUGHT et al., 1997; LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2004).

A reserpina apresenta um potente efeito anti-hipertensivo por inibir a ação de vesículas transportadoras de aminas biogênicas, que normalmente são responsáveis pela liberação de neurotransmissores como norepinefrina, serotonina e dopamina em vesículas pré-sinapticas (SCHULDINER et al., 1993).

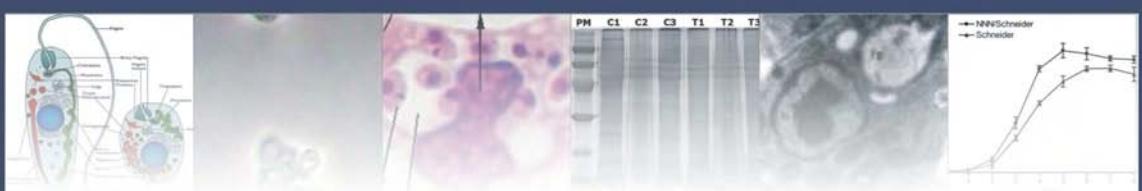
Estudos mais recentes demonstram que a reserpina aumenta a longevidade e resistência a diferentes tipos de estresse de *Caenorhabditis elegans* e, além disto, que a administração continuada deste composto não está associada ao desenvolvimento de câncer de mama nem de úlcera gástrica (SHORR et al., 1993; CURB et al., 1982; SRIVASTAVA et al., 2008).

Com relação a pesquisas envolvendo espécies do gênero *Leishmania*, a reserpina demonstrou-se eficaz em experimentos que

avaliaram a influencia deste composto na reversão de resistência a multiplas drogas de *L. enriettii* e *L. donovani* resistentes a pentamidina e estibogluconato de sódio (WONG et al., 2007).



2 Objetivos



2.1 Objetivo Geral

Estabelecer o ciclo do parasito *Leishmania chagasi* *in vitro* e avaliar comparativamente o potencial antileishmania de compostos naturais isolados sobre as formas promastigotas e amastigotas.

2.2 Objetivos Específicos

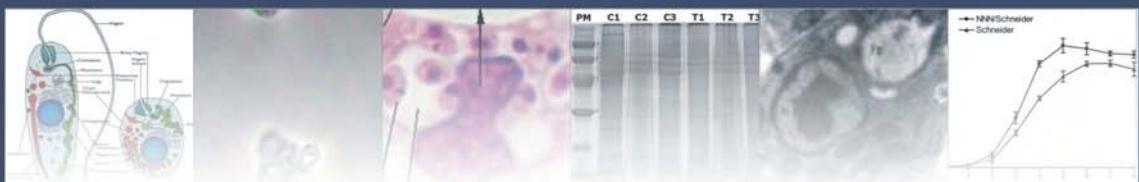
2.2.1 Avaliar a atividade antileishmania dos compostos naturais isolados: ácido úsnico, cumarina, quercetina e reserpina, sobre as formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e determinar a IC₅₀ dos compostos ensaiados sobre as formas promastigotas.

2.2.2 Estabelecer um modelo *in vitro* para mimetizar o ciclo de vida de *L. chagasi* para renovação dos repiques, estabelecendo o cultivo das formas amastigotas *in vitro*.

2.2.3 Avaliar a atividade antileishmania do composto isolado ácido úsnico sobre as formas amastigotas de *L. chagasi* e determinar a IC₅₀ do ácido úsnico sobre as formas amastigotas.



3 Materiais e Métodos



3.1 Compostos naturais isolados

Foram utilizados os compostos naturais isolados: ácido úsnico, cumarina, quercetina e reserpina.

Todos os compostos ensaiados foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. José Maria Barbosa Filho.

3.2 Preparo das soluções de estoque dos compostos

Foram testados dois possíveis solventes para auxiliar na diluição dos compostos apolares em meio aquoso: o detergente polisorbato Tween-80 e o dimetilsulfóxido [DMSO $(CH_3)_2SO$ – Vetec, Brasil].

O tween demonstrou-se altamente leishmanicida, com morte total dos parasitos a 0,1%, ao contrário do DMSO que não teve atividade em nenhuma concentração menor que 1%. Em virtude disto, o DMSO foi utilizado para diluir os compostos.

Cada composto foi pesado e diluído de maneira a obter uma concentração final em estoque de 5 mM. Após a pesagem, cada composto foi macerado com 1% do volume final de DMSO, em cadinho de porcelana por cerca de 5 minutos e, logo após, completou-se até o volume final da solução com tampão fosfato salina (PBS – NaCl 145 mM, Na_2HPO_4 9 mM NaH_2PO_4 1 mM, pH 7,4) ou o próprio meio de cultura (Schneider suplementado com 20% de soro bovino fetal-SBF, 50 $\mu g/mL$ de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina).

Os compostos: ácido úsnico, quercetina e reserpina, caracterizados como substâncias apolares, não apresentaram dissolução total em meio aquoso, permanecendo em emulsão no estoque. Enquanto a cumarina foi totalmente dissolvida.

Além disto, a concentração final de DMSO em cultura não ultrapassou 0,5%, não apresentando toxicidade para os modelos celulares ensaiados.

3.3 Cepa de *L. chagasi* utilizada

Para a realização de toda etapa experimental foi utilizada a cepa de *Leishmania chagasi* MHOM/BR/1970/BH46 gentilmente cedida pela professora Dra. Maria Norma Melo, da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

A cepa foi isolada a partir de um caso humano de leishmaniose visceral, por punção de Medula Óssea de paciente do vale do Rio Doce Conselheiro Pena-MG, pela inoculação em hamster e posterior passagem para cultura *in vitro* e criopreservada.

3.4 Cultivo e manutenção de promastigotas

As formas promastigotas de *Leishmania chagasi* foram cultivadas *in vitro* em meio de cultura bifásico constituído por uma fase sólida de ágar-sangue (“Novy-Macneal-Nicolle” - NNN), e uma fase líquida do meio Schneider (meio para cultivo de insetos) suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF), 50 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina. Além disto, as culturas foram mantidas a 25 ± 2°C e repicadas semanalmente não ultrapassando vinte repiques.

As formas promastigotas foram criopreservadas em meio Schneider acrescido de 10% de glicerol estéril, garantindo a estocagem da cepa BH46 para futura utilização. A criopreservação foi realizada com as promastigotas obtidas a partir de culturas no 5º dia de crescimento (fase estacionária), acrescidas de glicerol que foi adicionado lentamente, gota a gota, na cultura sob agitação manual. Após 15 minutos de agitação,

alíquotas de 1mL da cultura glicerinada foram distribuídas em tubos criogênicos e mantidas em ultrafreezer a -80º C.

Para recuperação das promastigotas criopreservadas, o material foi descongelado à temperatura ambiente e, após observação dos parasitos ao microscópio óptico foi realizado um inoculo de ~300µl da solução de criopreservação em 1,5mL de meio NNN/Schneider, sendo posteriormente incubada a 25 ± 2ºC.

A BH46 encontra-se criopreservada (a -80ºC) no Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia – LABIME – Departamento de Biologia Molecular – Centro de Ciências Exatas e da Natureza – Universidade Federal da Paraíba e mantidas em nitrogênio líquido no Laboratório de Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais.

3.5 Avaliação do Perfil de Crescimento dos Parasitos

A avaliação do perfil de crescimento das formas amastigotas e promastigotas de *L. chagasi* foi realizada a partir de um inóculo inicial de 1×10^6 parasitos/mL para ambas as formas. As formas promastigotas foram inoculadas em meio NNN/Schneider e incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por sete dias, enquanto as formas amastigotas foram inoculadas em NNN/Schneider e em meio Schneider em garrafas para cultivo celular e incubadas a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (estufa Sanyo modelo COM-15^a, Sanyo Electric Co., Japan) por sete dias.

Para a avaliação da curva de crescimento dos parasitos foram retiradas alíquotas dos inóculos, a cada 24 horas de cultivo, e diluídas em solução de fixação ISOTON (ácido cítrico 0,05M, NaCl 0,12M, formaldeído 0,5%, pH 7,2) e quantificadas em câmara hemocitométrica de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico (Olympus BX 41, EUA) num aumento final de 400x.

A média aritmética de duas contagens foi utilizada para calcular o número de parasitas para cada mL de cultura. O cálculo foi realizado utilizando-se a fórmula:

$$\mathbf{NP} = \mathbf{MQ} \times \mathbf{1/D} \times \mathbf{10^4}$$

Onde:

NP = Número de parasitas

MQ = Média dos quatro quadrantes

D= Diluição da amostra

O cálculo foi realizado levando-se em consideração o número total de células. O número de parasitos, para cada dia de contagem, foi plotado em tabela no programa GraphPad Prism5.0 onde foi montado um gráfico em escala logarítmica para avaliação da curva de crescimento e estimativa do tempo de geração (período necessário para a duplicação do número de células da cultura).

3.6 Estabelecimento do Ciclo de Vida de *L. chagasi* *in vitro*

Para renovação dos repiques de *L. chagasi* BH46 *in vitro* e manutenção dos parasitos com todas as suas características peculiares a cada fase de vida destes parasitos digenéticos foi estabelecido o ciclo de vida *in vitro*, buscando mimetizar todas as etapas de vida *in vivo* (PAN et al., 1993; MOHAREB et al, 1995; MOHAREB et al, 1996).

Neste sentido, as formas promastigotas foram cultivadas, como demonstrado no tópico anterior, estabelecendo-se *in vitro* as fases lag, log ou exponencial e estacionária dos parasitos, objetivando mimetizar o fenômeno de metaciclogênese e todo arcabouço genético expresso nesta forma parasitária.

Outra importante etapa foi estabelecer a infecção de macrófagos murinos, com transformação das formas promastigotas em amastigotas intracelulares, mantendo a infectividade das promastigotas e favorecendo a manutenção da expressão gênica das formas amastigotas intracelulares.

O ciclo *in vitro* foi completado com o isolamento das amastigotas e posterior cultivo destas novamente como promastigotas.

As etapas metodológicas do estabelecimento do Ciclo de Vida de *L. chagasi* *in vitro* compreenderam: a) cultivo e manutenção das formas promastigotas, detalhado no item anterior (3.5); b) infecção de macrófagos murinos *in vitro*; e c) isolamento de amastigotas. As etapas b e c são detalhadas nos tópicos seguintes.

3.7 Infecção de Macrófagos Murinos com promastigotas de *L. chagasi*

Esta etapa foi realizada utilizando-se macrófagos peritoneais de camundongos suíços do Biotério Thomas George – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/ANVISA e sob a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa Animal – CEPA/LTF.

Os animais foram elicitados com injeção intraperitoneal de 1mL de caldo tioglicolato (Gibco, EUA) cinco dias antes do início dos experimentos, visando o aumento da quantidade de macrófagos pela ação promotora de injeção do tioglicolato. Após os cinco dias os camundongos foram eutanasiados, por deslocamento cervical, e coletou-se os macrófagos da cavidade peritoneal por meio de uma lavagem na referida cavidade com injeção e posterior recuperação de 10 mL de PBS completo (PBS + 3% de SBF) gelado.

Logo após, o lavado foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos (centrífuga Excelsa Baby I, Fanem, Brasil), o sobrenadante foi descartado e o pelet foi ressuspensiondo em 1mL de meio RPMI 1640 (Cutilab, Brasil)

completo [RPMI 1640 + 10% SBF + estreptomicina (50µg/ml) e penicilina (100 UI/mL)].

As células ressuspensas foram quantificadas em câmara hemocitométrica de Neubauer com o auxílio do azul de Trypan a 0,4%, um corante vital que realça em azul as células inviáveis e não colore as células viáveis, que são capazes de expulsar o corante para o meio extracelular.

O número de células por mL de amostra foi calculado segundo a seguinte fórmula:

$$\mathbf{NC = MQ \times 1/D \times 10^4 \times 1,1}$$

Onde:

NC = Número de células

MQ = Média dos quatro quadrantes

D = Diluição da amostra

1,1 = Fator de correção da diluição com o azul de Trypan

O número de células foi calculado para as viáveis e inviáveis separadamente e, a partir dos números obtidos calculou-se a porcentagem de células viáveis em relação ao número de células totais (viáveis + inviáveis). Suspensões com viabilidade abaixo de 95% não foram utilizadas.

Seis mililitros da suspensão de macrófagos, ajustada para uma concentração de 1×10^6 células/mL, foram transferidos em garrafas de cultivo celular com capacidade para 20 mL cada e incubados a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (estufa Sanyo, Japão) por 2 horas para aderência das células. Após esse período as culturas foram visualizadas em microscópio invertido (Wilover S, Hund Wetzlar - EUA) para observação dos macrófagos aderidos, as garrafas foram lavadas 10 vezes com RPMI 1640 (Cutilab, Brasil) previamente aquecido a 37°C, retirando as células não aderidas.

Durante o período de incubação dos macrófagos, culturas de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* em fase estacionária de crescimento, rica em formas metacíclicas (infectivas), foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 6-10°C (Sorvall RC 5C Plus, DuPont, EUA), ressuspensas em meio RPMI completo, quantificadas e ajustadas para a proporção de 10 promastigotas por macrófago. As promastigotas foram adicionadas às garrafas contendo os macrófagos e incubadas por 3 a 4 horas.

Posteriormente, as garrafas foram lavadas 3 vezes com RPMI 1640 completo pré-aquecido para remover as promastigotas não aderentes e não internalizadas. Os macrófagos infectados foram então incubados por 48 horas a 37°C em estufa de CO₂.

3.8 Isolamento de amastigotas extracelulares

Após as 48 horas de cultivo dos macrófagos infectados muitos destes já estavam lisados em virtude da multiplicação das formas amastigotas intracelulares e, muitas destas encontravam-se em suspensão no meio. O isolamento de amastigotas extracelulares foi realizado pelo método de filtragem com lã de vidro, previamente utilizado para extração de amastigotas de tripanosomatídeos de acordo com Andrade, H. M.¹ (comunicação pessoal em dezembro de 2007), e adaptado neste trabalho para os parasitos do gênero *Leishmania*.

Foi retirado o meio da garrafa lavando-a 3 vezes e transferiu-se o lavado para um falcon de 50 mL. A suspensão foi centrifugada a 3.000 rpm por 7 minutos.

¹ Comunicação pessoal com a Dr. Hélida Monteiro de Andrade (Laboratório de Imunoparasitologia - UFMG)

Enquanto a suspensão era centrifugada colocou-se uma seringa de 30 mL sem o êmbolo em um falcon de 50 mL, adicionou-se 1,5 g de lã de vidro estéril até preencher 10 mL, posteriormente adicionou-se mais 1,0 g de lã de vidro estéril até completar a seringa, formando uma malha impermeável aos macrófagos e de livre passagem às amastigotas. Para equilibrar o filtro formado pela seringa com a de lã de vidro passou-se 30 mL de meio RPMI completo pela seringa (Figura 12).

Após a centrifugação o *pellet* foi ressuspensionado com aproximadamente 5 mL de meio RPMI completo, filtrou-se a suspensão na seringa com lã de vidro e, posteriormente a seringa foi lavada com 30 mL de meio limpo para a passagem de toda suspensão. O filtrado foi centrifugado novamente a 3.000 rpm por 7 minutos e, logo após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado com 5 mL de meio de cultura. O número de células foi calculado por meio de contagem de células em câmara hermocinética de Neubauer, com cálculo do número total de amastigotas e macrófagos semelhante às contagens realizadas nos itens 3.5 e 3.6. Não foram utilizadas as suspensões com mais de 1% de macrófagos na concentração final para evitar a contaminação das amastigotas filtradas.

As amastigotas isoladas nesta etapa foram: 1) mantidas como amastigotas; ou, 2) cultivadas em NNN/Schneider a 24°C para voltarem à forma promastigota e completar o ciclo de vida *in vitro*.

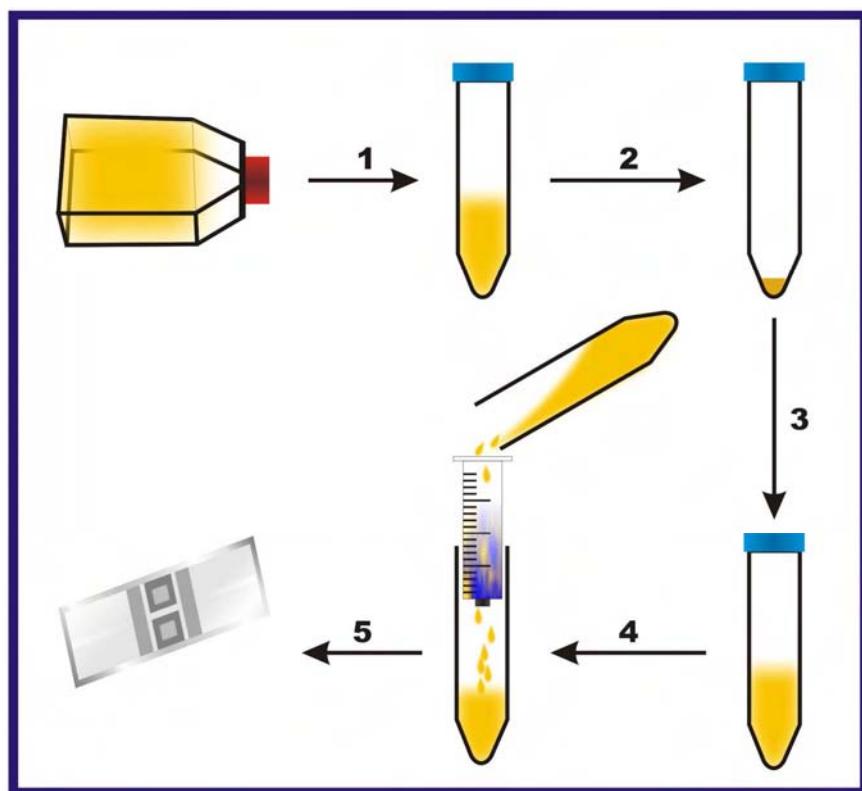


Figura 12 – Esquema demonstrativo da etapa de isolamento de amastigotas extracelulares pelo método de filtragem com lã de vidro, onde 1) Lavagem da garrafa de cultivo celular; 2) Centrifugação; 3) Ressuspensão do *pellet*; 4) Filtragem em seringa com lã de vidro; 5) Contagem de células em câmara hermocinética de Neubauer.

3.9 Transformação de Amastigotas

Para a transformação de promastigotas em amastigotas axenicas foram realizados três tipos de experimentos, sendo: a) Transformação extracelular direta; b) Transformação a partir de promastigotas metacíclicas recém repicadas; e c) Isolamento e cultivo de amastigotas originadas pelo ciclo *in vitro*. Cada tipo de experimento tem a metodologia detalhada nos tópicos seguintes.

3.9.1 Transformação extracelular direta:

Promastigotas de *L. chagasi* BH46 inicialmente cultivadas em NNN/Schneider pH 7,2, suplementado com 20% de Soro Bovino Fetal (SBF), 50 µg/mL de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina e 24°C, com mais de 6 repiques *in vitro*, foram inoculadas em uma concentração inicial de 1×10^6 promastigotas/mL sob diferentes condições, demonstradas na tabela 2. Para cada condição de meio foram observados os efeitos da variação do pH (entre 7,2 e 5,5) e da temperatura (entre 24 e 37°C).

O meio Schneider, para todos os testes, foi suplementado com 20% de SBF, 30 µg/mL de estreptomicina e 60 UI/mL de penicilina. Além dos testes, foram realizados repiques com as condições especificadas para o cultivo de promastigotas (pH 7,2 e 24°C). As alterações morfológicas foram monitoradas diariamente com microscópio óptico de luz com ou sem contraste de fase.

Tabela 2 - Experimentos para transformação extracelular direta em amastigotas axenicas

| Meio de Cultura | pH do meio líquido Schneider | Temperatura (°C) |
|-----------------------------|------------------------------|------------------|
| NNN/Schneider | 7,2 | 37 |
| NNN/Schneider | 5,5 | 37 |
| NNN/Schneider | 5,5 | 24 |
| NNN/Schneider (Controle) | 7,2 | 24 |
| Schneider | 7,2 | 37 |
| Schneider | 5,5 | 37 |
| Schneider | 5,5 | 24 |
| Schneider (Controle) | 7,2 | 24 |

3.9.2 Transformação a partir de promastigotas metacíclicas recém repicadas

A transformação em amastigotas axenicas a partir de promastigotas metacíclicas foi realizada por uma adaptação da técnica de Cysne-Finkelstein e colaboradores (1998).

Foi realizada a infecção de macrófagos murinos *in vitro*, como descrito no item 3.6, após 48 horas da infecção as amastigotas extracelulares foram isoladas (item 3.7) e cultivadas em meio NNN/Schneider pH 7,2 suplementado com 100 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina a 24°C por cinco dias, de maneira que as amastigotas transformaram-se em promastigotas com maior capacidade de metacilogênese. As promastigotas recém repicadas, no quinto dia, foram transferidas para as condições de meio, temperatura e pH referidas na tabela 2, observando-se o efeito do aumento de temperatura e diminuição de pH para a transformação.

O meio Schneider, para todos os testes de transformação, foi suplementado com 20% de SBF, 30 µg/mL de estreptomicina e 60 UI/mL de penicilina. Além dos testes, foram realizados repiques mantendo-se as condições especificadas para o cultivo de promastigotas (pH 7,2 e 24°C). As alterações morfológicas foram monitoradas diariamente com microscópio óptico de luz com ou sem contraste de fase.

3.9.3 Isolamento e cultivo de amastigotas originadas pelo ciclo *in vitro*

Foi realizada a infecção de macrófagos murinos *in vitro*, como descrito no item 3.7, após 48 horas da infecção as amastigotas extracelulares foram isoladas (item 3.8). Diferentemente do item anterior, neste experimento as amastigotas não foram transformadas em

promastigotas, mas pelo contrário, foram realizados diversos testes para manter as amastigotas isoladas cultivadas *in vitro*. Para tanto, as amastigotas isoladas foram cultivadas sob as condições descritas na tabela 3, observando-se os efeitos do pH e dos diferentes tipos de meio sobre a manutenção das amastigotas *in vitro*.

Tabela 3 - Experimentos para cultivo direto de amastigotas axenicas

| Meio de Cultura | pH do meio líquido | Temperatura (°C) |
|-----------------|--------------------|------------------|
| NNN/Schneider | 7,2 | 37 |
| NNN/Schneider | 5,5 | 37 |
| Schneider | 7,2 | 37 |
| Schneider | 5,5 | 37 |
| RPMI completo | 7,2 | 37 |
| RPMI completo | 5,5 | 37 |

3.10 Avaliação da atividade anti-promastigota dos compostos naturais isolados

Para avaliar a atividade antileishmania dos compostos naturais isolados queracetina, ácido úsnico, cumarina e reserpina foram realizados experimentos observando-se o efeito dos compostos sobre o crescimento das formas promastigotas de *Leishmania chagasi*.

A partir de uma cultura em fase logarítmica de crescimento, quantificada por meio de contagem de alíquota diluída em ISOTON em câmara de Neubauer, foi realizado um inoculo com 1×10^6 promastigotas/mL, meio Schneider completo pH 7,2, e adicionando-se os compostos a serem avaliados sob diferentes concentrações. O inoculo foi incubado a 24°C e após 72 horas de incubação as promastigotas foram quantificadas em câmara de Neubauer como detalhado no item 3.6.

Cada concentração de composto ensaiada foi realizada em quintuplicata e as culturas mantidas nas mesmas condições de meio e temperatura, sendo a ausência dos produtos avaliados foram consideradas como controle. A porcentagem de crescimento das culturas foi calculada considerando o grupo controle como 100% de crescimento.

3.11 Avaliação da atividade anti-amastigota do composto natural isolado ácido úsnico

Foram realizados experimentos de observação do efeito do composto que apresentou menor IC₅₀ contra as formas promastigotas sobre o crescimento das formas amastigotas de *Leishmania chagasi* como forma de avaliar a atividade antileishmania do composto natural.

A partir de uma cultura de amastigotas no quinto dia de cultivo, quantificada por meio de contagem de alíquota diluída em ISOTON em câmara de Neubauer, foi realizado um inoculo com 1×10^6 amastigotas/mL, em meio schneider suplementado com 30% de SBF, 30 µg/mL de estreptomicina e 60 UI/mL de penicilina, adicionado com o composto a ser avaliado em diferentes concentrações. Os inoculos foram feitos em placas com 96 poços com um volume final de 250 µL por poço. As placas foram incubadas a 37 °C e após 72 horas de incubação as amastigotas foram quantificadas em câmara de Neubauer como detalhado no item 3.5.

Cada concentração de composto ensaiada foi realizada em quintuplicata e as culturas mantidas nas mesmas condições de meio e temperatura, sendo a ausência dos produtos avaliados foram consideradas como controle. A porcentagem de crescimento das culturas foi calculada considerando o grupo controle como 100% de crescimento.

3.12 Utilização de Pentamidina como Referência

O isetonato de pentamidina, Laboratórios Filaxis S.A. – Brasil, foi utilizado como droga de referência na comparação com os dados obtidos para os compostos naturais ensaiados quercetina, ácido úsnico, cumarina e reserpina. O isocienato de pentamidina, que ao longo da pesquisa será referido apenas como pentamidina, foi adquirido sob a forma de frasco-ampola com 300mg de isotienato de pentamidina sob a forma de pó liofilizado injetável, este foi diluído em PBS e ensaiado a 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ (8,4, 16,8, 25,2 e 33,7 μM) sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania chagasi*.

3.13 Análise estatística

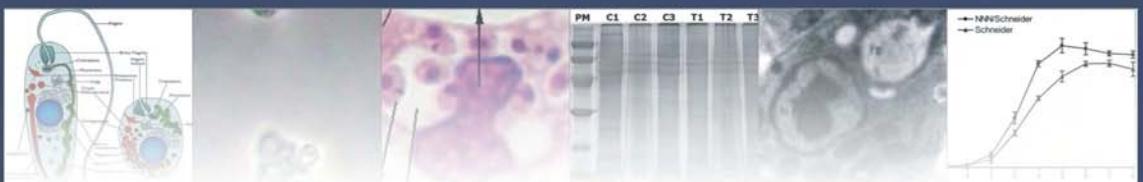
Os valores de IC_{50} (concentração da droga capaz de inibir o crescimento dos parasitos em 50%) para cada composto foram calculados por meio de regressão não linear calculada pelo *software* GraphPad Prism 4.0, utilizando-se a equação sigmoidal dose-resposta, cuja fórmula está demonstrada na figura 13. Todos os dados obtidos em cada experimento foram comparados utilizando-se análise de variância ANOVA e o teste *Bonferroni* de múltipla comparação, também pelo *software* GraphPad Prism 4.0. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com $p \leq 0,05$.

$$Y = \text{Mínimo} + \frac{(\text{Máximo} - \text{Mínimo})}{1 + 10^{\text{LogEC50}-X}}$$

Figura 13 - Equação sigmoidal dose-resposta utilizada para calcular a IC_{50} dos compostos ensaiados. Y = Resposta; X = Logaritmo da concentração dos compostos; Máximo = efeito máximo (% máxima de inibição) e Mínimo = Efeito mínimo (% mínima de inibição, aqui igual ao controle com 0% de inibição).



4 Resultados e Discussão



4.1 Avaliação do Perfil de Crescimento dos Parasitos

O perfil de crescimento dos parasitos foi realizado avaliando-se as curvas de crescimento, que podem ser verificadas no gráfico 3, para as formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/1970/BH46). Por meio da curva de crescimento é possível determinar as principais fases que mimetizam o desenvolvimento dos parasitos *in vivo*, além de auxiliar na manutenção das formas promastigotas *in vitro* e na escolha do melhor momento para realização de cada experimento. As principais etapas evidenciadas na curva de crescimento são as fases exponencial e estacionária em cada sistema de cultivo.

Para as espécies do gênero *Leishmania* a determinação destas fases é importante também para a obtenção de amastigotas axênicas, como demonstrado por Cysne-Finkelstein e colaboradores (1998), que evidenciaram a correlação entre a metaciclogênese, fase exponencial tardia, e a capacidade de transformação *in vitro*.

As curvas de crescimento geradas pelo cultivo das promastigotas em meio NNN/ Schneider e apenas em meio Schneider foram comparadas com a finalidade de determinar o perfil de crescimento dos parasitos sob diferentes meios, visto que as culturas são estocadas *in vitro* em meio NNN/Schneider, porém os experimentos são realizados apenas em meio Schneider.

As culturas apresentaram um perfil de crescimento distinto após o segundo dia de incubação, ou seja, permaneceram similares na fase inicial de adaptação dos parasitos ao meio, fase lag. A partir do segundo dia as culturas em meio NNN/Schneider apresentaram maior taxa de crescimento, aumentando o número de parasitos de maneira mais acentuada. Entretanto, ambas as culturas apresentaram o mesmo perfil de crescimento, com fase logarítmica entre o segundo e o quarto dias, fase logarítmica tardia entre o quarto e o quinto dias. No sexto dia ambas as culturas se encontravam em fase estacionária e, após o sétimo dia as culturas entraram em declínio (Gráfico 3).

Durante o cultivo *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania* dois tipos principais ocorrem em cultura: as promastigotas procíclicas e as promastigotas metacíclicas. Promastigotas procíclicas são formas mais alongadas, não infectivas para o hospedeiro mamífero e que replicam ativamente, sendo predominantes na fase exponencial ou logarítmica de crescimento *in vitro* e, *in vivo* as procíclicas são encontrados no intestino médio do vetor flebotomíño. As promastigotas metacíclicas são definidas como formas pequenas, delgadas, com flagelo relativamente longo e que ocorrem em grande número no início da fase estacionária *in vitro*, ou fase exponencial tardia. *In vivo* as metacíclicas são encontrados no intestino anterior do flebotomíneo e são infectivas para o hospedeiro mamífero (CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998; KAMHAWI, 2006).

Como a fase logarítmica tardia é caracterizada por conter maior número de formas promastigotas metacíclicas (CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998; KAMHAWI et al., 2004) os experimentos de cultivo dos parasitos na presença dos compostos e a infecção de macrófagos murinos foram realizados com culturas no quinto dia de cultivo.

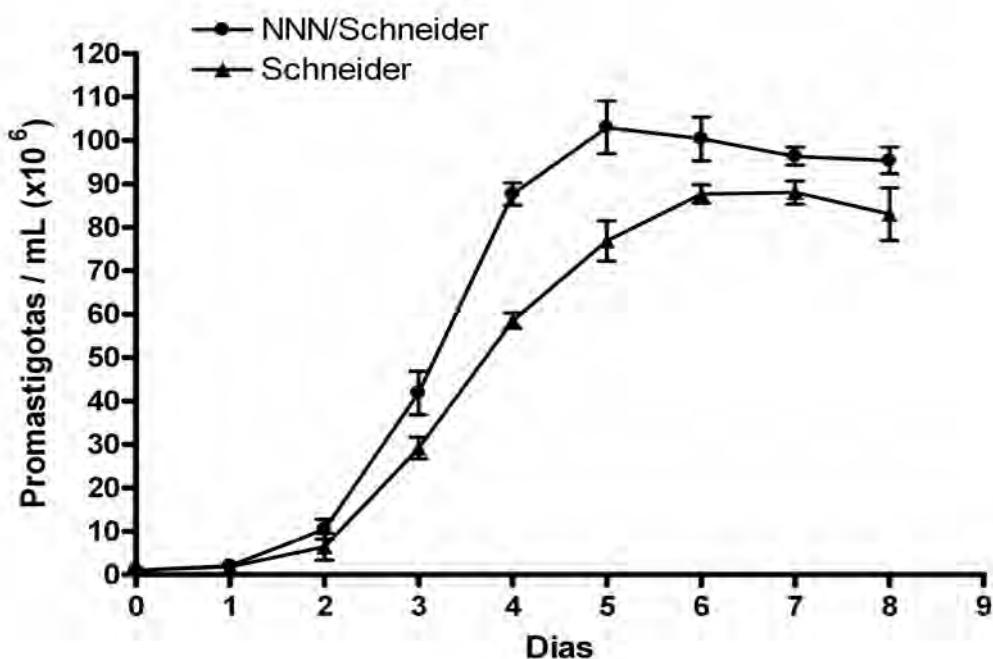


Gráfico 3 – Curvas de crescimento das formas promastigotas de *L. chagasi* em meio NNN/Schneider e apenas em Schneider. O gráfico representa a média ± desvio padrão (DP) de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

4.2 Estabelecimento do Ciclo de Vida de *L. chagasi* *in vitro*

As formas promastigotas de *L. chagasi* são mais facilmente cultivadas *in vitro*, entretanto, os parasitos deste gênero são caracterizados por um ciclo de vida digenético, com duas formas de vida principais, amastigotas no hospedeiro vertebrado e promastigotas no hospedeiro invertebrado (WHO, 2002). Neste sentido, as culturas de promastigotas quando mantidas *in vitro* por um longo período de tempo e com muitos repiques tendem a perder sua capacidade infectiva e de metacilogênese, como demonstrado por Cysne-Finkelstein e colaboradores (1998).

Para renovação dos repiques de *L. chagasi*, cepa MHOM/BR/1970/BH46, *in vitro* e manutenção dos parasitos com todas as suas características peculiares a cada fase de vida, normalmente são mantidas formas amastigotas em animais, como camundongos, infectados. Porém, nem sempre estes modelos de infecção animal são facilmente mantidos, além da triagem inicial dos efeitos de compostos naturais isolados que requerem testes que sejam simples de manipular, reprodutíveis e fáceis de quantificar. Desta forma, o estabelecimento de modelos *in vitro*, que busquem mimetizar as etapas de vida *in vivo*, são importantes e necessários (GUPTA et al., 2001).

Neste sentido, o ciclo de vida *in vitro* dos parasitos foi estabelecido, neste estudo, com a finalidade de manter as características de infectividade e capacidade de metacilogênese dos parasitos. Para tanto, as formas promastigotas foram cultivadas estabelecendo-se *in vitro* as fases lag, log ou exponencial e estacionária dos parasitos, como evidenciado pela curva de crescimento (Gráfico 3), buscando mimetizar o fenômeno de metacilogênese contendo todo arcabouço genético expresso nesta forma parasitária.

Outra importante etapa foi desenvolver a infecção de macrófagos murinos, com transformação das formas promastigotas em amastigotas

intracelulares, mantendo a infectividade das promastigotas e favorecendo a manutenção da expressão gênica das formas amastigotas intracelulares.

Para estabelecer o ciclo de vida *in vitro* de *Leishmania chagasi* macrófagos peritoneais de camundongos suíços/LTF foram experimentalmente infectados com formas promastigotas de *L. chagasi* (Figura 14). Obteve-se sucesso na infecção dos macrófagos que, após 4 horas de exposição já apresentavam amastigotas intracelulares e, após 48 horas de incubação cerca de 60% dos macrófagos encontravam-se infectados e uma média de $4,75 \times 10^4$ amastigotas/mL foram encontradas em suspensão (Figuras 14 e 15).



Figura 14 – Macrófagos experimentalmente infectados com formas promastigotas de *Leishmania chagasi*, na proporção de 10 promastigotas por macrófago, e incubados a 37°C com atmosfera de 5% CO₂, após 48 horas de infecção. As setas indicam as regiões dos macrófagos com maior concentração de amastigotas e o triângulo indica amastigotas em suspensão. Microscópio óptico com contraste de fase, aumento final de 400x.

As amastigotas em suspensão foram isoladas por meio de filtragem em seringa com malha de lã de vidro, de maneira que para todos os experimentos, após a filtragem não foram encontrados macrófagos contaminantes. Todas as amastigotas isoladas mostraram-se

eficientes em voltar à forma promastigota um dia após o cultivo em NNN/Schneider, pH 7,2 a 24°C.



Figura 15 – Amastigotas em suspensão após rompimento dos macrófagos murinos infectados. Microscópio óptico com contraste de fase, aumento final de 400x mais zoom ótico da câmera digital de aproximadamente 3x.

As formas promastigotas resultantes dos primeiros repiques após a infecção dos macrófagos e cultivo na forma promastigota recém originada das amastigotas intracelulares demonstraram curva de crescimento diferente das formas promastigotas com mais de 10 repiques, como demonstrado no gráfico 4. Para as culturas recém repicadas o tempo de geração (período necessário para que a cultura duplique o número de células) foi estimado graficamente em 16 horas, enquanto para as culturas com mais de 10 repiques foi de 22 horas e 30 minutos, como demonstrado no gráfico 5. Além disto, por meio de uma análise visual qualitativa em microscopia óptica, foi possível verificar que as culturas recém repicadas e transformadas em promastigotas apresentaram maior motilidade, principalmente na fase exponencial, e maior diferença morfológica entre as formas procíclicas e metacíclicas, quando comparadas às culturas com mais de 10 repiques.

Estas diferenças evidenciam a importância de se manter as leishmanias *in vitro* sob diferentes condições que mimetizem o ciclo do parasito *in vivo*, de maneira que não se repique as formas promastigotas indefinidamente sob esta forma sem que os parasitos expressem sua diversidade genética, como pela infecção de macrófagos e pela transformação em amastigotas.

Outra importância do estabelecimento do ciclo de vida *in vitro* do parasito é o aumento na capacidade de metacilogênese em culturas com poucos repiques na forma promastigota, como demonstrado por Cysne-Finkelstein e colaboradores (1998), onde o fenômeno da metacilogênese garante a infectividade das cepas ensaiadas e favorece a transformação *in vitro* das promastigotas em amastigotas metacíclicas.

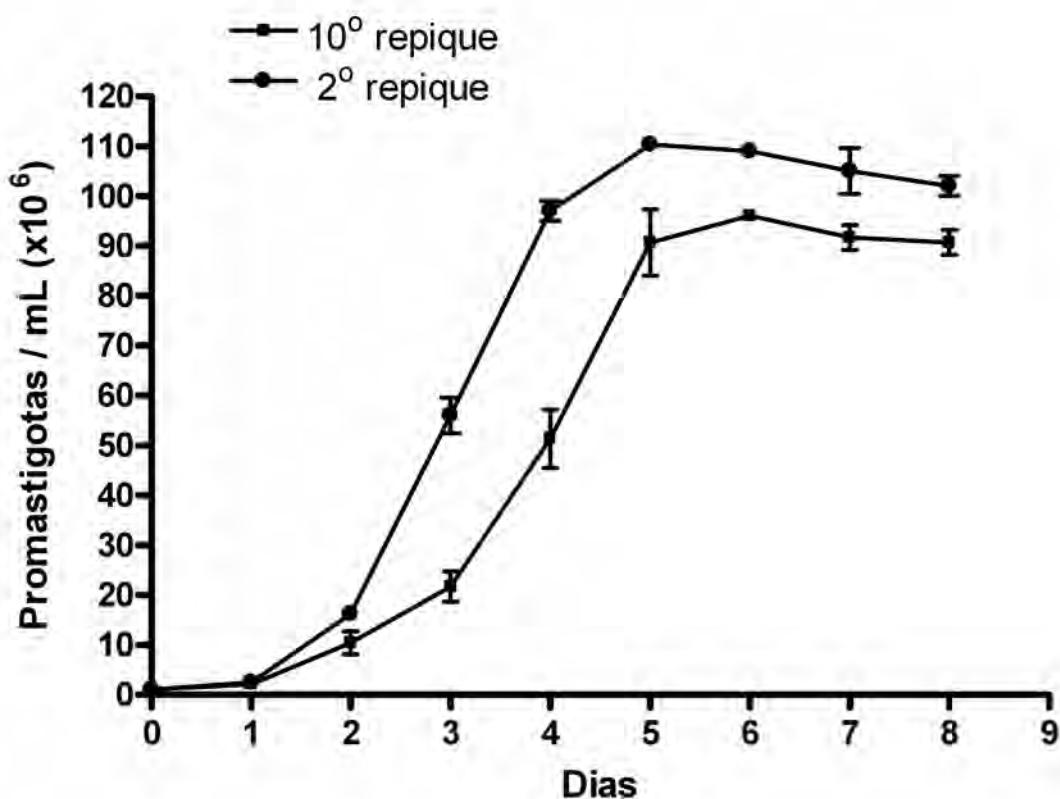


Gráfico 4 – Curvas de crescimento das formas promastigotas de *L. chagasi* no 10º repique e das recém-repicadas na forma promastigota, após infecção de macrófagos murinos e cultivo sob a forma de amastigota intracelular (2º repique). O cultivo de ambas culturas foi realizado em meio NNN/Schneider. O gráfico representa a média \pm DP de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

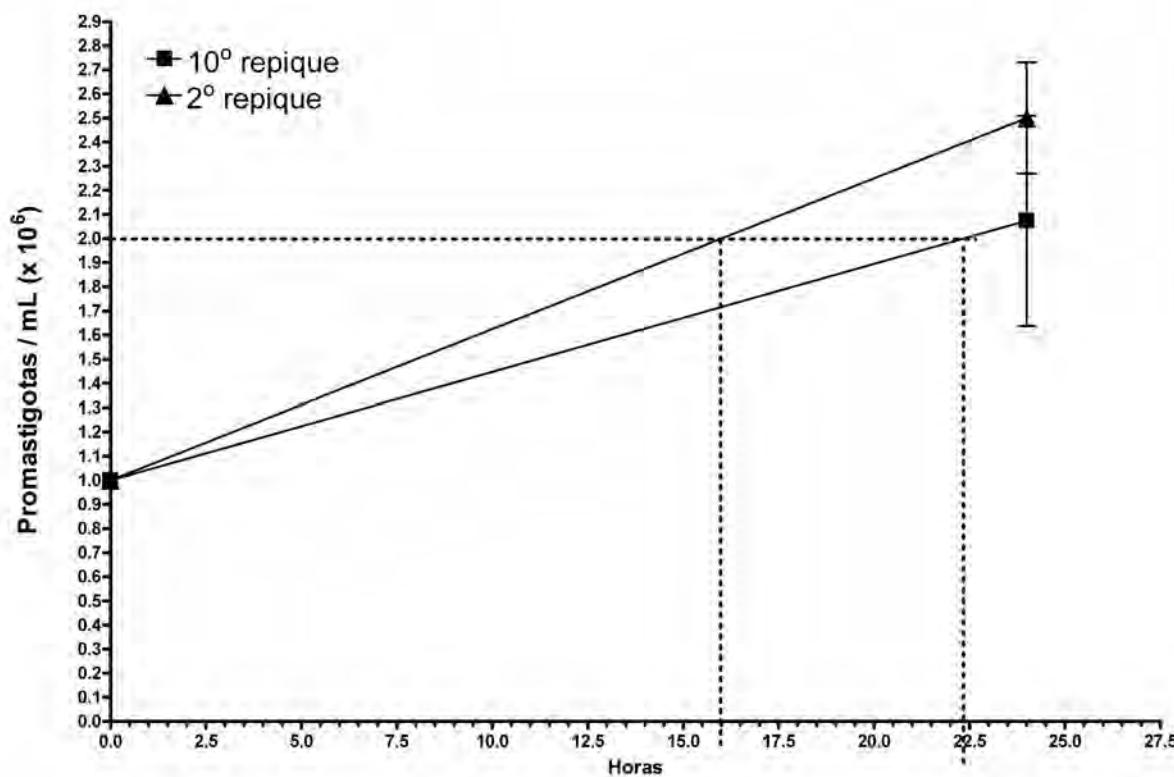


Gráfico 5 – Demonstração gráfica da estimativa do tempo de geração (período necessário para que a cultura duplique o número de células), onde as culturas com menor número de repiques (2º repique sob a forma promastigota, logo após a cultura sob a forma amastigota intracelular *in vitro*) apresentaram menor tempo de geração (16 horas), quando comparadas às culturas no 10º repique (22 horas e 30 minutos). $p<0,001$ na comparação entre o tempo de geração do 10º e do 2º repiques.

4.3 Transformação de Amastigotas

As amastigotas são as formas parasitárias do gênero *Leishmania* responsáveis pelas manifestações clínicas nos hospedeiros vertebrados, por isso é essencial o desenvolvimento de novos modelos de cultivo *in vitro* desta forma parasitária. Porém se observa que a grande maioria das pesquisas envolvendo as espécies do referido gênero derivam de estudos realizados com as formas promastigotas, provavelmente pelo fato destas serem mais facilmente cultivadas *in vitro* (PAN et al., 1993; MOHAREB et al., 1995; GUPTA et al., 2001).

Amastigotas têm sido obtidas a partir do cultivo de macrófagos murinos peritoniais ou outras linhagens de macrófagos infectados, ou

ainda a partir de tecidos infectados, porém apenas por um curto período de tempo e com a desvantagem de que neste isolamento normalmente as culturas de amastigotas apresentam contaminação por componentes celulares dos hospedeiros. Apesar das limitações no cultivo das formas amastigotas, muitos estudos tem sido desenvolvidos no sentido de estabelecer modelos eficazes de cultivo *in vitro* dos parasitos sob esta condição, constituindo-se uma importante ferramenta para estudos envolvendo a produção de vacinas, a identificação de genes regulatórios ou ainda a avaliação da ação de drogas antileishmania (PAN et al., 1993; MOHAREB et al., 1995; GUPTA et al., 2001).

As amastigotas são organismos acidófilos, ou seja, apresentam um metabolismo ótimo em pH ácido, como o encontrado no vacúolo parasitóforo. Esta adaptação pode estar ligada à expressão de bombas de prótons específicas na membrana plasmática dos parasitos, que estariam envolvidas na captura de metabólitos e manutenção do pH citoplasmático normal das amastigotas (ANTOINE et al., 1998).

As formas amastigotas de *Leishmania* spp. caracterizam-se principalmente pela forma ovalada e ausência de flagelo livre, além de serem bioquimicamente bastante distintas das formas promastigotas (PAN et al., 1993; SHAW, 1994).

Embora muitos autores tenham demonstrado que o pH ácido e temperatura elevada sejam fatores essenciais para ativar a citodiferenciação *in vitro* das promastigotas (PAN et al., 1993; MOHAREB et al., 1995; MOHAREB et al., 1996; BARAK et al., 2005), as condições ideais de temperatura e pH para o cultivo das amastigotas variam entre as diferentes espécies e cepas de *Leishmania*, o que ressalta sua heterogeneidade biológica. Desta forma as condições de cultivo devem ser padronizadas para cada novo isolado a ser estudado (GUPTA et al., 2001).

Considerando-se, portanto, as diferenças de crescimento, fisiologia e bioquímica entre as diferentes espécies e cepas de *Leishmania*, as condições para diferenciação de promastigotas de *L. chagasi* (cepa MHOM/BR/1970/BH46) em amastigotas axênicos foram otimizadas em

nosso laboratório a partir de protocolos previamente descritos para outras cepas, com modificações (PAN et al., 1993; MOHAREB et al., 1995; CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998; GUPTA et al., 2001).

A transformação *in vitro* de promastigotas em amastigotas axenicas foi avaliada neste estudo por meio de três tipos de experimentos distintos, onde observou-se a capacidade de transformação direta em culturas com mais de seis repiques *in vitro* como promastigotas; a transformação a partir de promastigotas metacíclicas recém repicadas; e pelo isolamento e cultivo de amastigotas originadas pelo ciclo *in vitro*.

Nos experimentos de transformação direta a diferenciação foi satisfatória no cultivo à 37°C para ambos meios avaliados (bifásico NNN/Schneider e apenas Schneider) e para as duas faixas de pH ensaiadas (Tabela 4), entretanto, para os testes com apenas a diminuição do pH não foi observada uma diferenciação no número total de células, permanecendo alguns parasitos ainda sob a forma promastigota.

Para todos os ensaios de transformação direta dos parasitos no 6º repique sob a forma promastigota, onde observou-se a diferenciação para amastigotas axenicas, não foi possível repicar as culturas com formas amastigotas sem que estas voltassem por um período de pelo menos dois dias para a forma promastigota, aumentando desta forma a contaminação da cultura de amastigotas axênicas por formas promastigotas.

Nos experimentos de transformação direta a diferenciação não foi satisfatória nos cultivos à 24°C com diminuição do pH para 5,5 para ambos meios avaliados (Tabela 4). Nestes ensaios foi observada uma diferenciação parcial, onde todos os parasitos assumiram uma forma arredondada, porém com o flagelo externo e aparentemente imóvel (Figura 16).

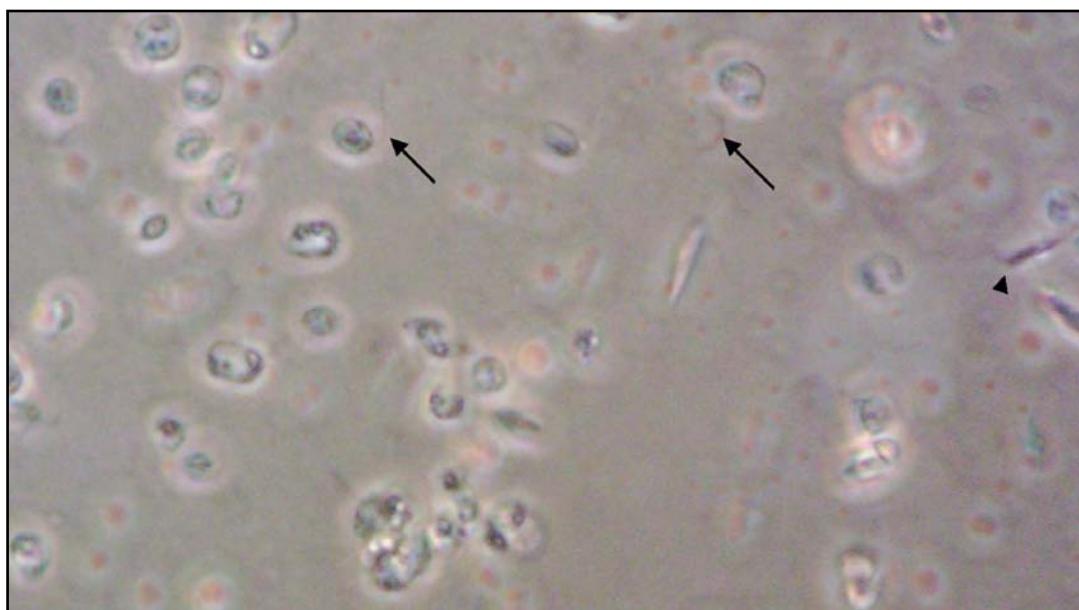


Figura 16 – Resultados da diferenciação *in vitro* de promastigotas com mais de seis repiques, incubados a 24°C e pH 5,5. As setas indicam as formas arredondadas com a presença de flagelo externo e o triângulo indica a presença de formas promastigotas contaminantes.

Tabela 4 - Resultados para transformação extracelular direta em amastigotas axenicas, após 5 dias de incubação

| Meio de Cultura | pH do meio líquido Schneider | Temperatura (°C) | Resultados |
|--------------------------|------------------------------|------------------|---|
| NNN/Schneider | 7,2 | 37 | Amastigotas axenicas, forma arredondada e ausência de flagelo. Contaminação por promastigotas na proporção aproximada de 5 amastigotas para 1 promastigota. |
| NNN/Schneider | 5,5 | 37 | Amastigotas axenicas, forma arredondada e ausência de flagelo. Número reduzido de amastigotas. |
| NNN/Schneider | 5,5 | 24 | Formas arredondadas, porém com flagelo externo. |
| NNN/Schneider (Controle) | 7,2 | 24 | Apenas promastigotas |
| Schneider | 7,2 | 37 | Poucas amastigotas axenicas, forma arredondada e ausência de flagelo. Contaminação por promastigotas. |
| Schneider | 5,5 | 37 | Poucas amastigotas axenicas, forma arredondada e ausência de flagelo. |
| Schneider | 5,5 | 24 | Formas arredondadas, porém com flagelo externo. |
| Schneider (Controle) | 7,2 | 24 | Apenas promastigotas |

Na transformação a partir de promastigotas metacíclicas recém repicadas foram considerados os resultados observados por Cysne-Finkelstein e colaboradores (1998) que demonstraram a relação entre o fenômeno da metaciclogênese e a quantidade de repiques das culturas de promastigotas, além da relação com a capacidade de diferenciação *in vitro* para as formas amastigotas axenicas.

Neste outro experimento, as amastigotas recém isoladas do ciclo de vida *in vitro*, no 2º repique, foram avaliadas sob as mesmas condições relacionadas na transformação direta, entretanto, diferentemente dos experimentos com promastigotas no 6º ou mais repiques, nesta avaliação a citodiferenciação em amastigotas axênicas foi satisfatória para todos os ensaios a 37°C em meio NNN/Schneider independente da faixa de pH, além disto, não foi observada contaminação por formas promastigotas em nenhum dos ensaios quando a transformação em formas amastigotas foi observada (Tabela 5).

Para os ensaios de transformação a partir de promastigotas no 2º repique e cultivo a 24°C e pH 5,5 a diferenciação para amastigotas axenicas não ocorreu de forma satisfatória, de maneira que, para o meio bifásico foram encontradas apenas formas promastigotas e para o meio schneider a transformação foi parcial, com a cultura apresentando parasitos arredondados, porém com flagelo externo.

No isolamento e cultivo de amastigotas originadas pelo ciclo *in vitro*, as amastigotas não foram transformadas em promastigotas, sendo realizados diversos ensaios para manter as amastigotas isoladas cultivadas *in vitro* (Tabela 6). Neste experimento apenas as amastigotas incubadas em meio NNN/Schneider a 37°C se mantiveram sob a forma amastigota, entretanto, para o meio com pH 5,5 o número de amastigotas axenicas após 5 dias de cultivo foi muito menor que o observado no meio com pH 7,2.

Tabela 5 - Resultados para transformação a partir de promastigotas metacíclicas do 2º repique, após 5 dias de incubação

| Meio de Cultura | pH do meio líquido Schneider | Temperatura (°C) | Resultados |
|--------------------------|------------------------------|------------------|--|
| NNN/Schneider | 7,2 | 37 | Ausência de formas promastigotas. Amastigotas axenicas, forma arredondada e ausência de flagelo. |
| NNN/Schneider | 5,5 | 37 | Ausência de formas promastigotas. Amastigotas axenicas, forma arredondada e ausência de flagelo. |
| NNN/Schneider | 5,5 | 24 | Apenas promastigotas |
| NNN/Schneider (Controle) | 7,2 | 24 | Apenas promastigotas |
| Schneider | 7,2 | 37 | Ausência de formas promastigotas. Amastigotas axenicas, forma arredondada e ausência de flagelo. |
| Schneider | 5,5 | 37 | Poucas amastigotas, formas arredondadas, porém com flagelo externo. |
| Schneider | 5,5 | 24 | Poucas amastigotas, formas arredondadas, porém com flagelo externo. |
| Schneider (Controle) | 7,2 | 24 | Apenas promastigotas |

As amastigotas axenicas (figura 17) originadas por meio da diferenciação a partir de promastigotas no 2º repique e cultivadas em NNN/Schneider com pH 5,5 ou 7,2 a 37°C foram repicadas e, após 3 repiques ainda conservaram a morfologia característica das formas amastigotas e não apresentaram contaminação por promastigotas.

Apesar do sucesso na transformação *in vitro* de promastigotas em amastigotas, as condições ideais para se obter culturas axenicas não estão ainda totalmente compreendidas, afinal, diferentes espécies de *Leishmania* tem restrições e necessidades distintas para serem cultivadas sob a forma amastigota axenica (PAN et al., 1993).

Tabela 6 - Resultados para o cultivo direto de amastigotas axenicas, após 5 dias de incubação

| Meio de Cultura | pH do meio líquido | Temperatura (°C) | Resultados |
|-----------------|--------------------|------------------|--|
| NNN/Schneider | 7,2 | 37 | Amastigotas axenicas com forma arredondada e ausência de flagelo |
| NNN/Schneider | 5,5 | 37 | Amastigotas axenicas com forma arredondada e ausência de flagelo, porém em número muito reduzido |
| Schneider | 7,2 | 37 | Nenhum parasito |
| Schneider | 5,5 | 37 | Nenhum parasito |
| RPMI completo | 7,2 | 37 | Nenhum parasito |
| RPMI completo | 5,5 | 37 | Nenhum parasito |

Como exemplo temos *L. brasiliensis* e *L. panamensis* que, apesar de terem demonstrado sucesso na diferenciação e adaptação ao meio schneider, não demonstraram capacidade de transformação e sobrevivência no meio UM54, originalmente utilizado para a obtenção de culturas de amastigotas axenicas de *L. pifanoi* (GUPTA et al., 2001).

Por outro lado, Mohareb e colaboradores (1995) obtiveram sucesso na transformação *in vitro* para amastigotas axenicas nos meios DMEM e Schneider, com a transformação máxima observada para o meio D-MEM com pH 5,8 e 34°C, entretanto, não obtiveram sucesso na diferenciação para o meio RPMI, corroborando com os resultados observados neste estudo para este meio.

Em outros estudos, realizados por Gupta e colaboradores (1996 e 1999), a citodiferenciação das formas promastigotas em amastigotas axenicas de *L. donovani* foi conseguida apenas em meio bifásico com a fase sólida suplementada com sangue, ou seja, semelhante ao observado na presente pesquisa, onde a maior eficiência na transformação e a melhor manutenção das amastigotas axenicas foi encontrada para os cultivos no meio bifásico NNN/Schneider.

Os resultados obtidos neste estudo com *Leishmania chagasi* corroboram com os resultados de Cysne-Finkelstein e colaboradores (1998) com *Leishmania amazonensis*, onde a capacidade de diferenciação

demonstrou-se relacionada à capacidade de metacilogênese. Com *L. chagasi*, na presente pesquisa, a transformação das formas promastigotas em amastigotas axenicas ocorreu de maneira mais eficiente com as culturas recém-repicadas sob a forma de promastigotas oriundas do ciclo de vida estabelecido *in vitro*.

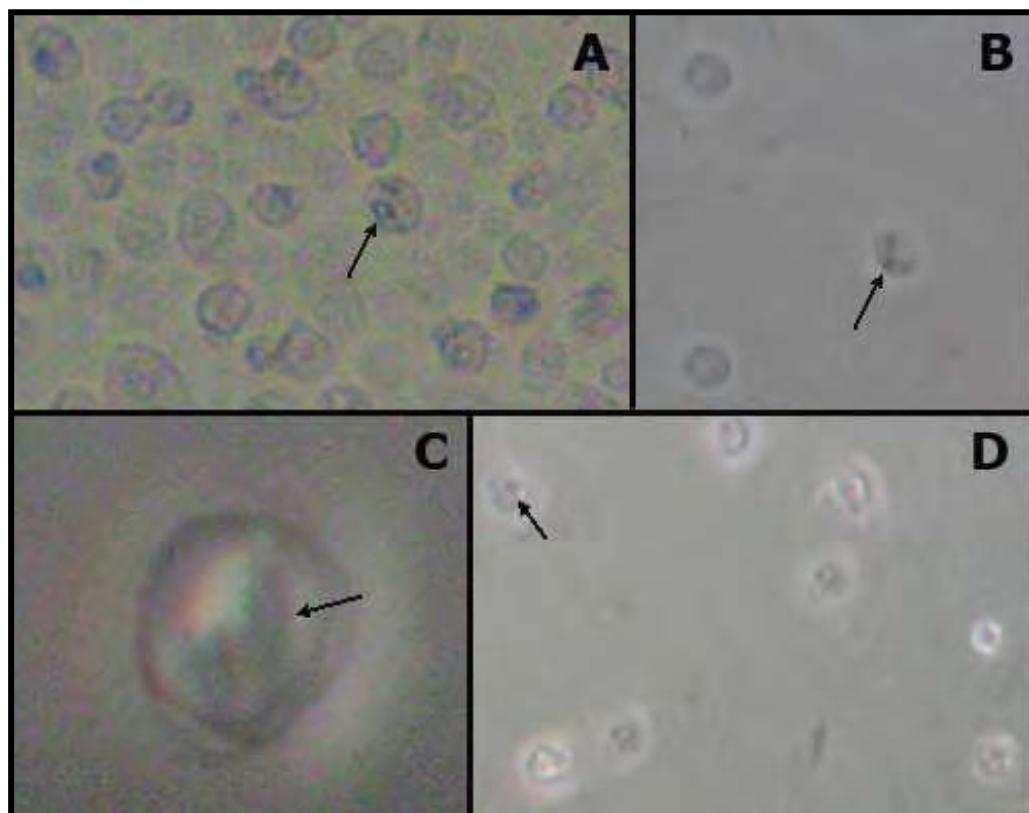


Figura 17 – Amastigotas axenicas mantidas em cultivo *in vitro*. A) amastigotas diferenciadas *in vitro* a partir de promastigotas no 2º repique, após ciclo de vida *in vitro*, concentradas por centrifugação e coradas por hematoxilina e eosina, AF. 1000x; B) amastigotas diferenciadas *in vitro* a partir de promastigotas no 2º repique, após ciclo de vida *in vitro*, microscópio óptico com contraste de fase, AF. 400x; C) amastigota axenica isolada após infecção de macrófagos murinos peritoniais, microscópio óptico com contraste de fase, AF. 1000x mais zoom ótico da câmera digital de aproximadamente 3x; D) amastigotas axenicas isoladas após infecção de macrófagos murinos peritoniais, microscópio óptico com contraste de fase, AF. 400x. As setas indicam as regiões com núcleo e cinetoplasto.

A diferença observada entre a transformação das promastigotas no 6º repique e as promastigotas no 2º repique evidenciam o sucesso obtido no estabelecimento do ciclo *in vitro*, pois as culturas recém repicadas sob a forma promastigota, após passagem sob a forma

amastigota no ciclo *in vitro*, demonstraram-se mais competentes para a citodiferenciação *in vitro*.

Diferentes metodologias de alteração de pH e temperatura foram descritos na literatura científica. Cysne-Finkelstein e colaboradores (1998) descreveram o cultivo das amastigotas de *L. amazonensis* com alteração direta para pH 5,5, e só após 6 dias de cultivo aumentou a temperatura para 32°C, enquanto Hodgkinson e colaboradores (1996) descreveram o cultivo e a caracterização de amastigotas axênicos de *L. amazonensis* utilizando a redução gradual de pH e aumento gradual da temperatura, chegando ao pH 4,6 e a temperatura de 32°C.

Teixeira e colaboradores (2002) descrevem a citodiferenciação de promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* em amastigotas utilizando a variação simultânea de pH e temperatura, conforme realizado no presente estudo. Estes autores obtiveram culturas com altas taxas de amastigotas (entre 90 a 98%), mas não conseguiram manter as culturas por mais de 2 repiques.

O aumento de temperatura e redução no valor de pH realizados de modo gradual, bem como a utilização de meios de cultivo complexos mostram-se eficazes para a obtenção de amastigotas axênicas e permitem o cultivo dos parasitos por longos períodos (HODGKINSON et al., 1996; BALANCO et al., 1998). Entretanto, o longo período de tempo necessário para obtenção de tais culturas (até 2 meses) e o baixo número de amastigotas gerados devido às exigências nutricionais dos parasitos torna estas metodologias pouco práticas para a triagem de fármacos.

Embora a manutenção da cultura de amastigotas axênicas em longo prazo ainda não tenha sido demonstrada em nosso laboratório, em virtude do curto período de experimentação, as formas obtidas foram mais infectivas para as células hospedeiras (macrófagos murinos peritoneais) que as formas promastigotas e, além disto, mantiveram a capacidade de reverter à forma promastigota quando transferidas para condições de cultivo adequadas. Estas características são típicas de formas amastigotas intracelulares e têm sido descritas para amastigotas

axenicas de outros autores (PAN et al., 1993; GUPTA et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2002; SILVA, 2008).

4.4 Avaliação da atividade anti-promastigota dos compostos naturais isolados

Nesta pesquisa foram avaliados 4 compostos naturais isolados, ácido úsnico, cumarina, quercetina e reserpina, sobre promastigotas de *Leishmania chagasi* MHOM/BR/1970/BH46. Para cada composto foram avaliados os efeitos sobre o crescimento dos parasitos em diferentes concentrações, de maneira a estabelecer as curvas dose-efeito e a IC₅₀ (concentração capaz de inibir o crescimento das culturas em 50%) de cada um (Tabela 7 e 8).

Com relação ao ácido úsnico, os resultados da inibição do crescimento e efeito deste composto sobre as promastigotas de *L. chagasi* estão demonstrados nos gráficos 6 e 7. O ácido úsnico apresentou redução significativa do crescimento dos parasitos a partir da concentração de 0,025 mM (25 μ M) com percentual de inibição (PI) de $22,97 \pm 6,7\%$ para esta concentração do composto e, demonstrou um PI de $94,69 \pm 1,3\%$ para a concentração de 0,2 mM (200 μ M). Estas concentrações foram similares às observadas por Fournet e colaboradores (1997), que avaliaram a redução significativa do crescimento dos parasitos a partir de 29,4 μ M (10 μ g/mL) para *L. donovani* e de 72,6 μ M (25 μ g/mL) para *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

A IC₅₀ do ácido úsnico para as promastigotas de *L. chagasi* foi de 0,0417 mM (41,7 μ M).

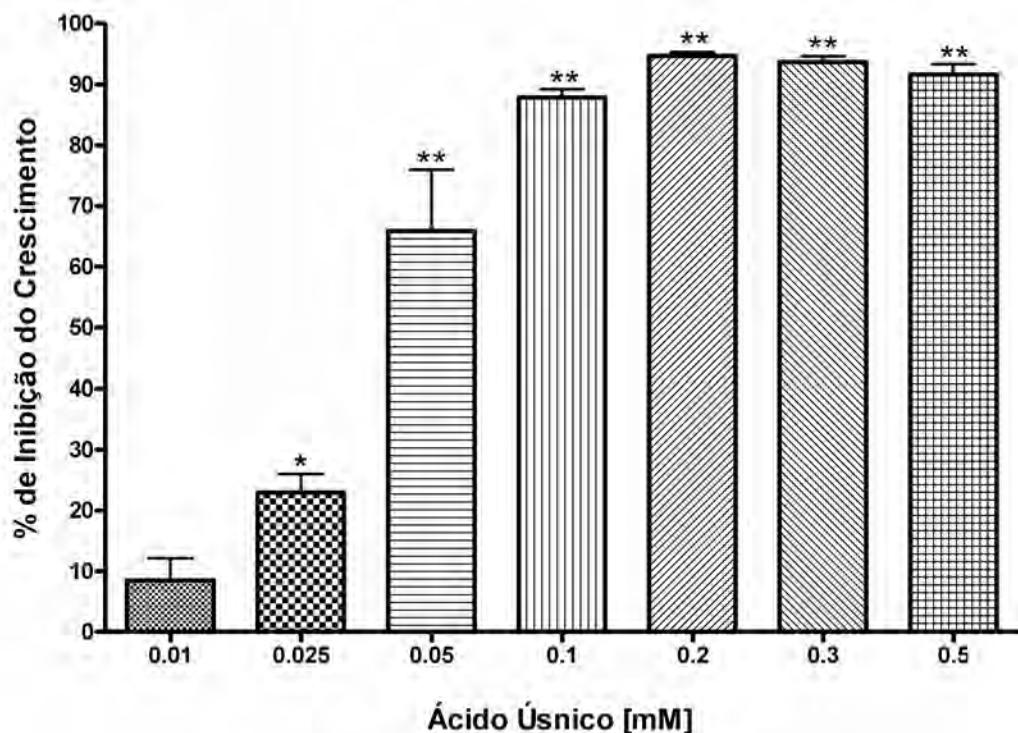


Gráfico 6 – Porcentagem de inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* na presença de diferentes concentrações do composto isolado ácido úsnico. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ em relação ao controle.

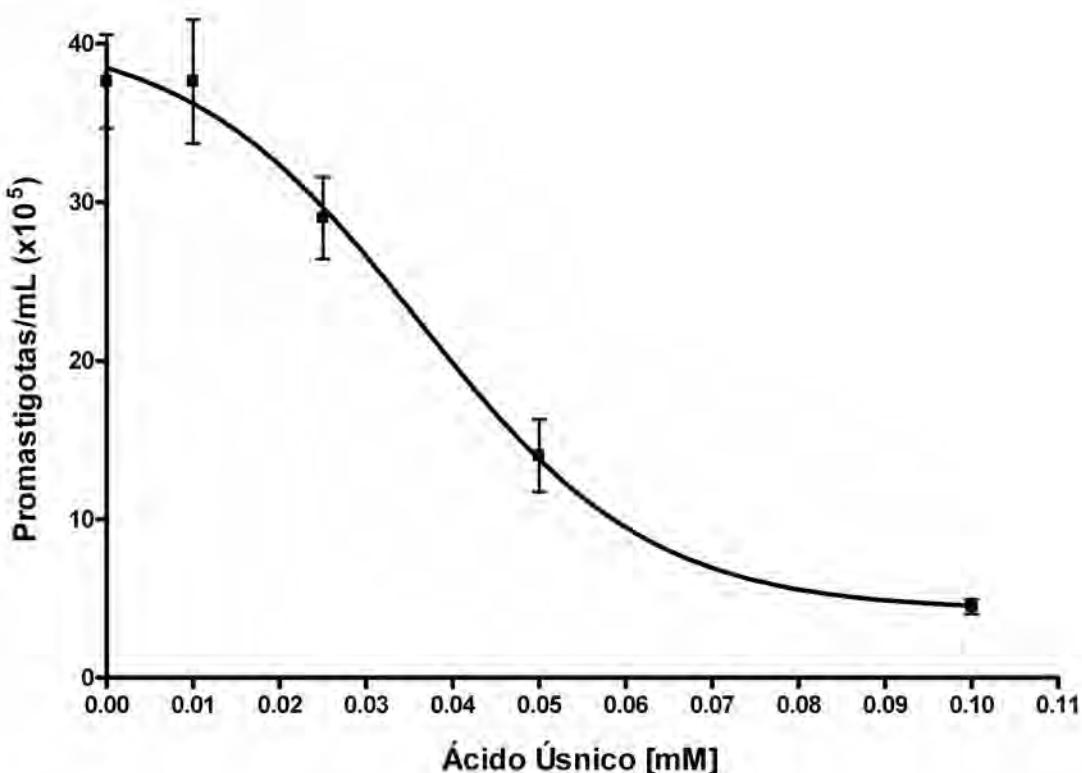


Gráfico 7 – Curva concentração-resposta do composto ácido úsnico sobre promastigotas de *Leishmania chagasi* demonstrando o efeito do composto sobre o número de parasitos/mL. O ajuste da curva foi realizado de acordo com a equação sigmoidal dose-resposta detalhada no item 3.13. Os pontos representam a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Os resultados da atividade do composto isolado cumarina sobre o crescimento das formas promastigotas de *L. chagasi* estão demonstrados nos gráficos 8 e 9.

A cumarina apresentou redução significativa do crescimento dos parasitos a partir da concentração de 0,5 mM (500 μ M), onde demonstrou inibição de $29,31 \pm 8,4\%$. Os maiores valores de inibição do crescimento, obtidos para as concentrações de 1,5 e 2 mM, foram de $66,86 \pm 6,1\%$ e $67,51 \pm 4,2\%$, respectivamente. Bravo e colaboradores (1999) demonstraram atividade da cumarina sobre *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani* a partir da concentração de 0,342 mM (50 μ g/mL), ou seja, um efeito significativo com concentrações menores que as observadas no

presente estudo com *L. chagasi*. A IC₅₀ da cumarina sobre promastigotas de *L. chagasi* foi de 1,07 mM.

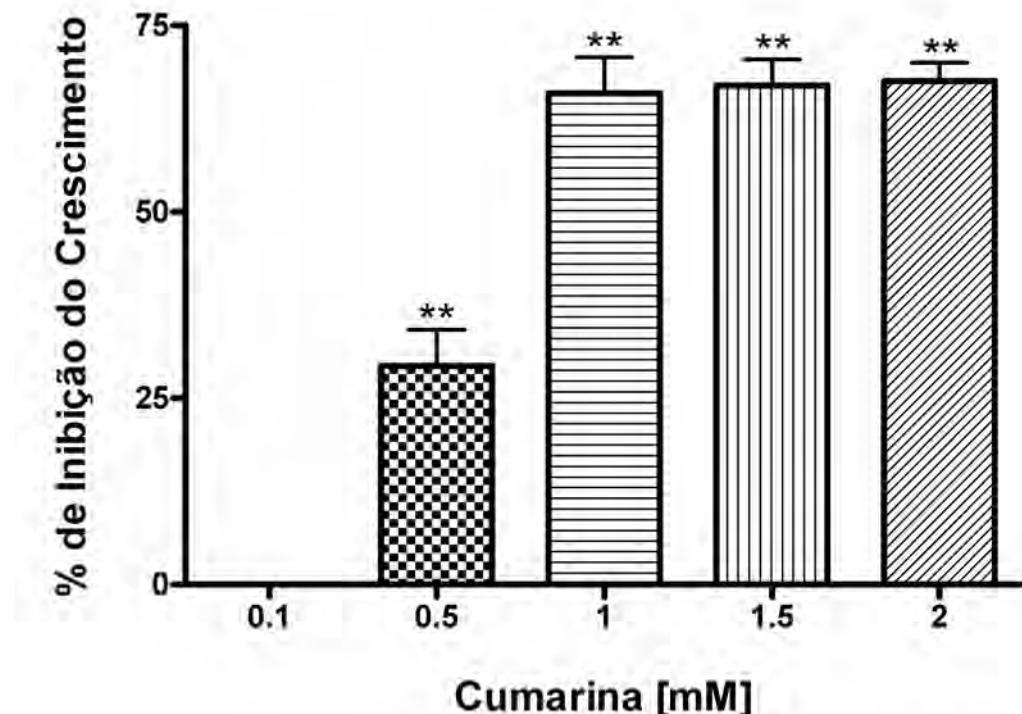


Gráfico 8 - Porcentagem de inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* na presença de diferentes concentrações do composto isolado cumarina. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. ** p < 0,001 em relação ao controle.

Os resultados referentes à ação da quercetina sobre promastigotas de *Leishmania chagasi* estão demonstrados nos gráficos 10 e 11. Este composto apresentou efeito significativo na redução do crescimento da cultura a partir da concentração de 0,1mM e, para as maiores concentrações avaliadas, 1,5 e 2 mM, os valores percentuais de inibição do crescimento das culturas foram de $74,76 \pm 13,1$ e $80,67 \pm 11,1\%$, respectivamente.

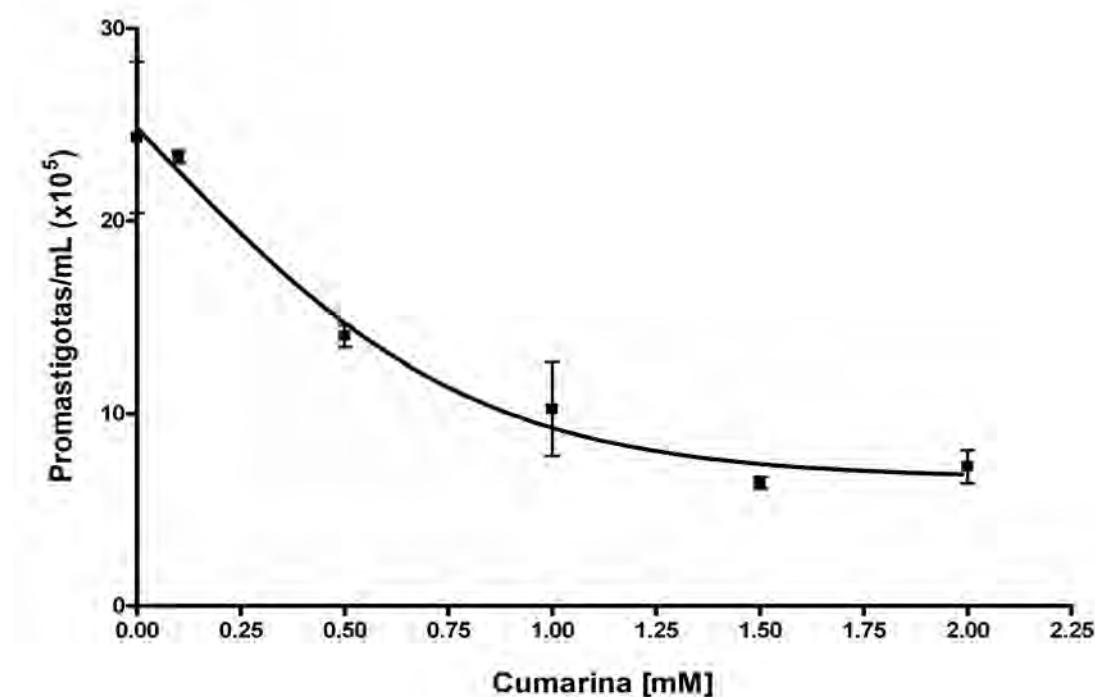


Gráfico 9 – Curva dose-resposta da cumarina sobre promastigotas de *Leishmania chagasi* demonstrando o efeito do composto sobre o número de parasitos/mL. O ajuste da curva foi realizado de acordo com a equação sigmoidal dose-resposta detalhada no item 3.13. Os pontos representam a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

A IC_{50} para a quercetina foi de 0,271 mM (271 μ M), muito maior do que a de 45,5 μ M observada por Mittra e colaboradores (2000), e de 3,3 μ M avaliada por Tasdemir e colaboradores (2006), ambos sobre *Leishmania donovani*, espécie do mesmo complexo que a *Leishmania chagasi*. Além disto, estes autores também demonstraram que a quercetina foi capaz de minimizar a infecção por *L. donovani* em modelos animais.

Em *L. donovani* a quercetina provoca a interrupção do ciclo celular, levando os parasitos à apoptose (MITTRA et al., 2000), além de inibir a ação de uma topoisomerase tipo I pela estabilização de um complexo de clivagem topoisomerase I - DNA e pela capacidade de ligar-se a enzimas citoplasmáticas e intercalar-se à moléculas de DNA em altas concentrações - 300 μ M (DAS et al., 2006).

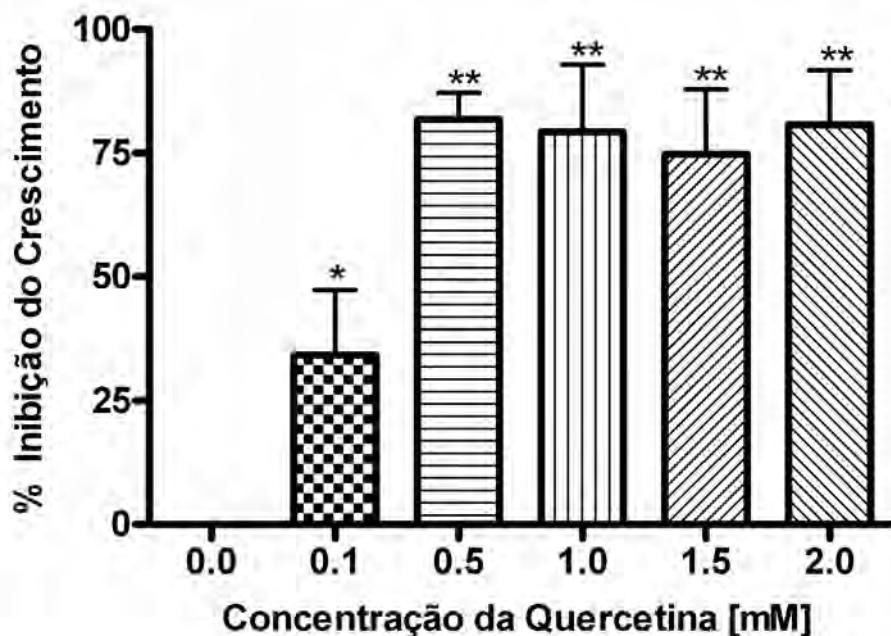


Gráfico 10 – Porcentagem de inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* na presença de diferentes concentrações do composto isolado quercetina. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ em relação ao controle.

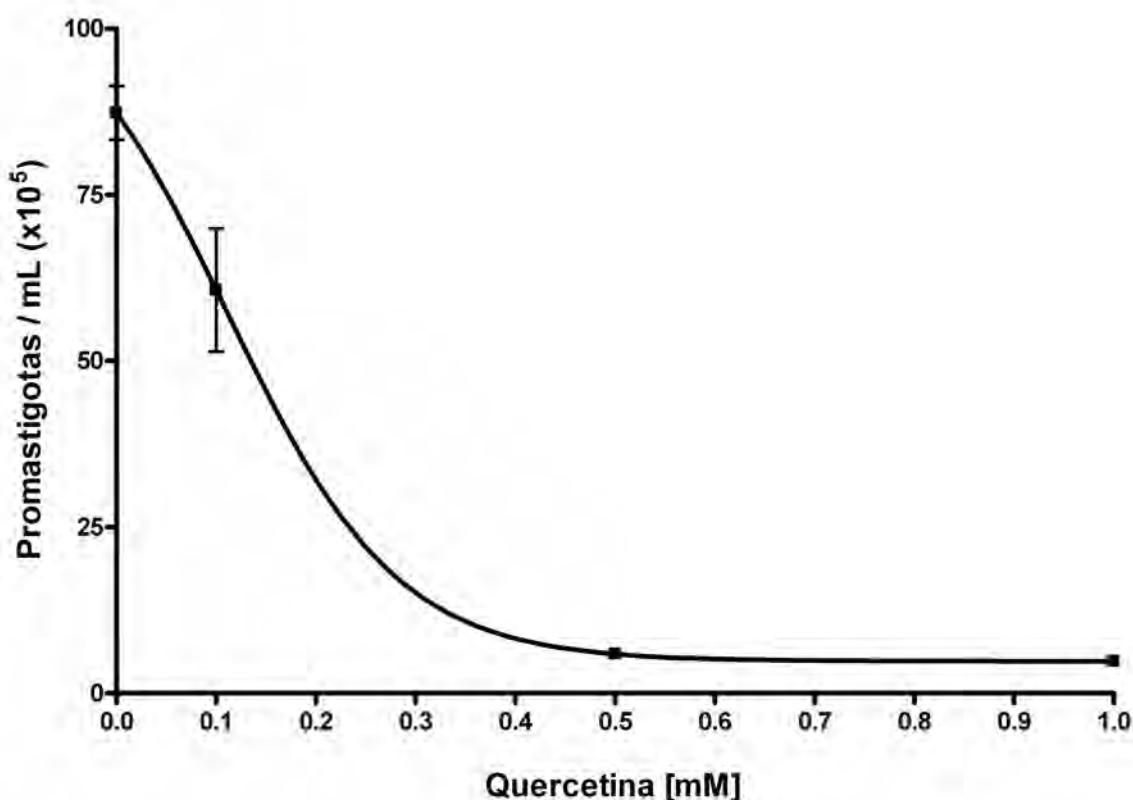


Gráfico 11 – Curva concentração-resposta do composto quercetina sobre promastigotas de *Leishmania chagasi* demonstrando o efeito do composto sobre o número de parasitos/mL. O ajuste da curva foi realizado de acordo com a equação sigmoidal dose-resposta detalhada no item 3.13.

Os resultados do efeito da reserpina sobre promastigotas de *L. chagasi* estão demonstrados nos gráficos 12 e 13.

Para o composto isolado reserpina a significativa inibição do crescimento foi observada para concentrações a partir de 0,5 mM, com inibição de $48,97 \pm 10,9\%$, e a inibição máxima de crescimento foi de $67,15 \pm 21,8\%$ para a concentração de 1,5 mM. A IC_{50} da reserpina, igual a 1,75 mM, foi a maior de todos os compostos naturais ensaiados. A reserpina também foi o composto que demonstrou os resultados estatisticamente menos consistentes, com maiores valores de p e maiores desvios-padrão.

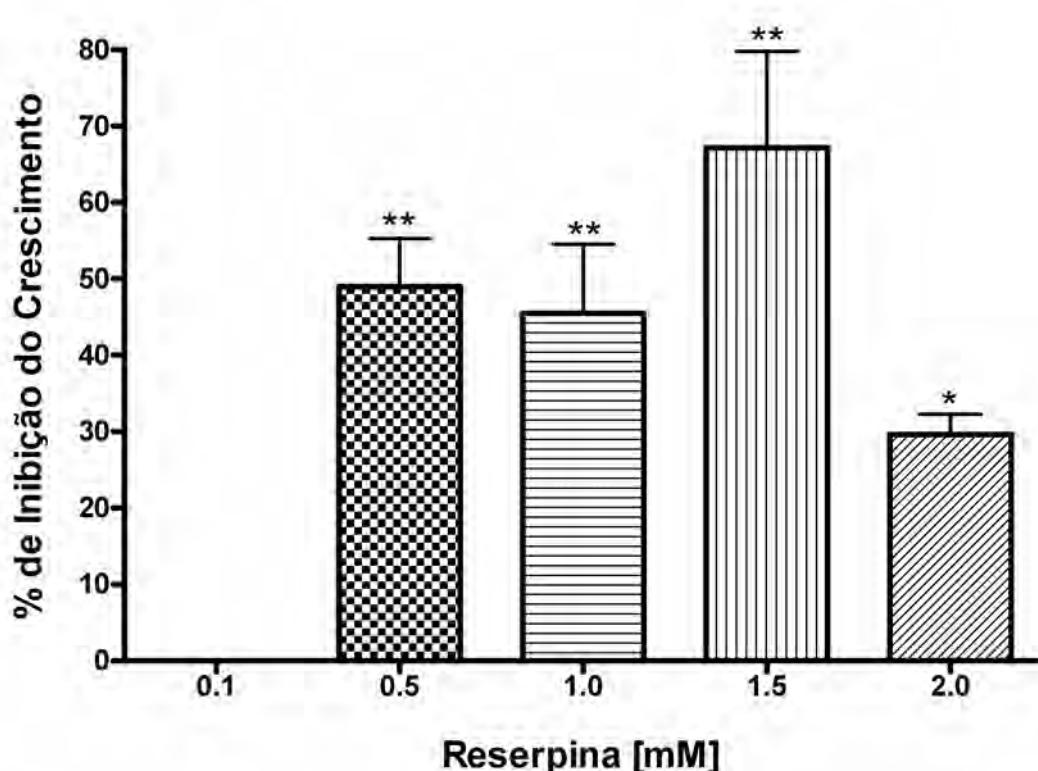


Gráfico 12 - Porcentagem de inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* na presença de diferentes concentrações do composto isolado reserpina. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média e desvio padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

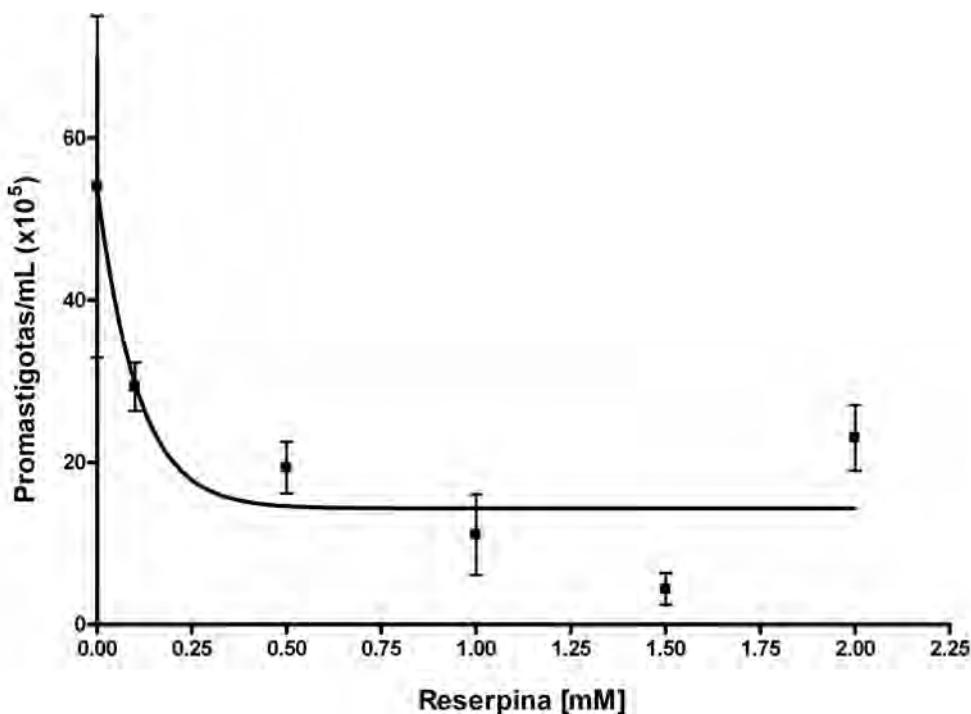


Gráfico 13 – Curva dose-resposta da reserpina sobre promastigotas de *Leishmania chagasi* demonstrando o efeito do composto sobre o número de parasitos/mL. O ajuste da curva foi realizado de acordo com a equação sigmoidal dose-resposta detalhada no item 3.13. Os pontos representam a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Os resultados obtidos com os compostos naturais isolados ensaiados foram comparados ao potencial anti-promastigota da pentamidina, classificada como uma das drogas de primeira escolha no tratamento da leishmaniose visceral (CROFT et al., 2006).

A IC_{50} da pentamidina ($21,2 \mu\text{M}$) foi menor do que a de todos os compostos ensaiados, entretanto, o efeito máximo observado para a pentamidina não foi significativamente diferente do observado para a quercetina e para o ácido úsnico, como demonstrado no gráfico 14. Os resultados do ácido úsnico foram os que mais se aproximaram dos observados para a pentamidina, com menor diferença entre os valores de IC_{50} e efeitos de inibição máxima do crescimento observados.

O fato da pentamidina apresentar efeito anti-leishmania mais significativo com concentrações menores que os compostos ensaiados não inviabiliza a continuidade das pesquisas com estes compostos naturais,

visto que estes apresentaram significativa capacidade de inibição do crescimento dos parasitos. Além disto, mesmo sendo utilizada como droga de primeira escolha em muitos países, a pentamidina apresenta alta toxicidade e graves efeitos colaterais, como o desenvolvimento de diabete dependente de insulina irreversível e morte (SUNDAR, et al., 2006).

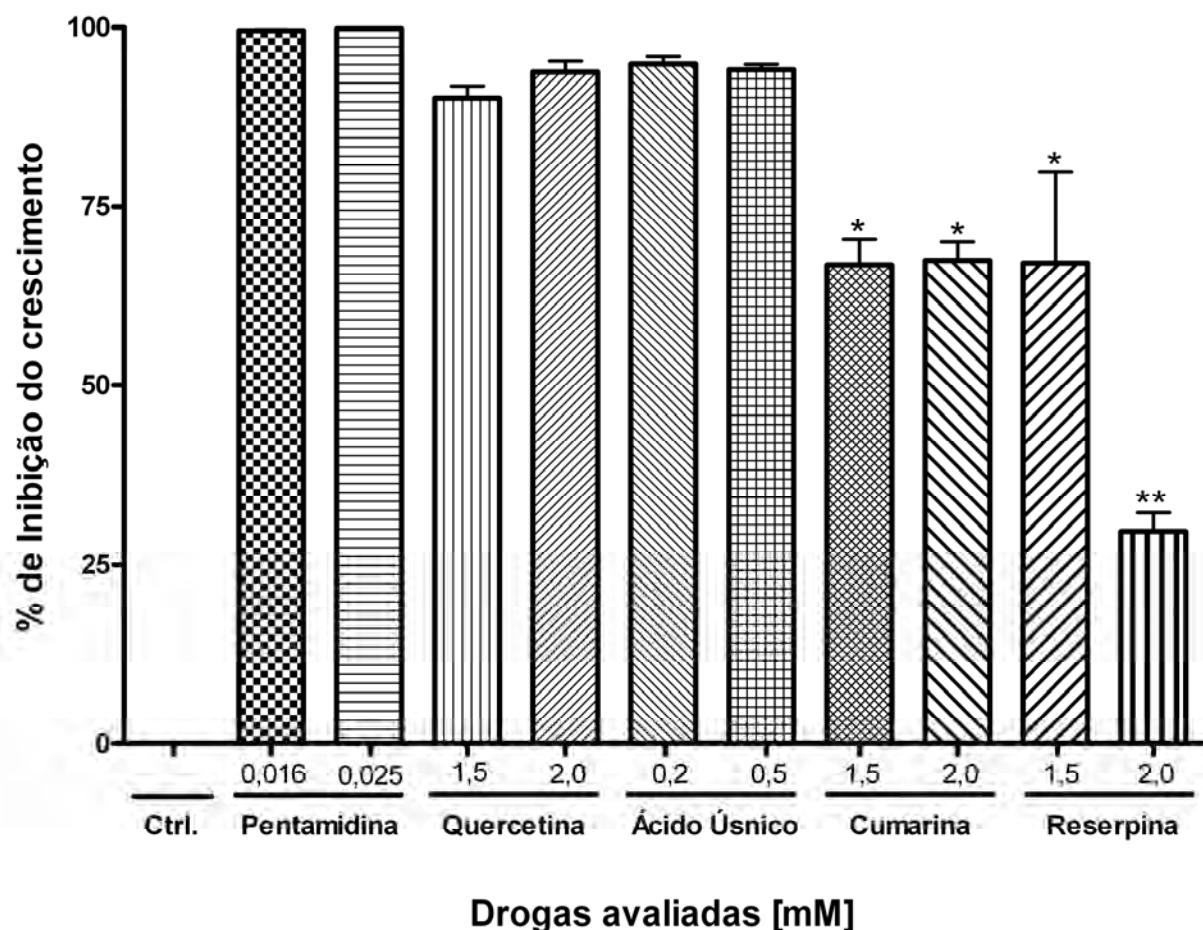


Gráfico 14 - Porcentagem de inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* na presença de diferentes concentrações dos compostos ensaiados em comparação com a pentamidina. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ em relação à pentamidina.

Tabela 7 – Atividade antileishmania *in vitro* de compostos naturais isolados contra promastigotas de *L. chagasi*

| Compostos | Percentual de Inibição (PI) de <i>L. chagasi</i> | | | | |
|---------------------|--|--------------|---------------|--------------|--------------|
| | 0,1 mM | 0,5 mM | 1,0 mM | 1,5 mM | 2,0 mM |
| Ácido Úsnico | 87,89 ± 3,0 | 91,61 ± 3,8 | 94,04 ± 3,6 | 90,84 ± 6,7 | 89,87 ± 7,8 |
| Cumarina | SA | 29,31 ± 8,4 | 65,89 ± 8,3 | 66,86 ± 6,1 | 67,51 ± 4,2 |
| Quercetina | 34,19 ± 13,07 | 81,91 ± 5,29 | 79,31 ± 13,54 | 74,76 ± 13,1 | 80,67 ± 11,1 |
| Reserpina | SA | 48,97 ± 10,9 | 45,50 ± 15,6 | 67,15 ± 21,8 | 29,64 ± 4,5 |

SA= Sem atividade inibitória contra *Leishmania chagasi*. Os resultados representam a média ± DP de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Tabela 8 – Concentração capaz de inibir 50% do crescimento (IC₅₀) dos compostos ensaiados sobre *L. chagasi*

| | Ácido Úsnico | Cumarina | Quercetina | Reserpina |
|-----------------------------|---------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| IC₅₀ (mM) | 0,0417 | 1,07 | 0,271 | 1,7 |

4.5 Avaliação da atividade anti-amastigota do composto natural isolado Ácido Úsnico

Os compostos naturais constituem excelentes candidatos a fármacos para o tratamento de doenças, e as possibilidades de uso e variedade de compostos são praticamente ilimitadas. Em vista disso, a

triagem inicial para a utilização dos compostos naturais como fármacos requer testes que sejam simples de manipular, reproduutíveis, fáceis de quantificar e que, idealmente, refletem as condições encontradas pelo agente patogênico no hospedeiro, condições geralmente difíceis de obter conjuntamente (SERENO et al., 2007).

A triagem de agentes antileishmania, classicamente utiliza formas promastigotas, devido à sua simplicidade e baixo custo no cultivo, nestes modelos as formas promastigotas são expostas *in vitro* a diferentes concentrações dos compostos a serem avaliados e a taxa de inibição do crescimento dos parasitos é determinada após 48 a 72 horas de incubação (FUMAROLA et al., 2004), como realizado na primeira etapa de avaliação dos compostos naturais na presente pesquisa, item 4.4.

É importante ressaltar, entretanto, que no ciclo natural a forma promastigota é encontrada apenas no hospedeiro invertebrado, não sendo o alvo para o tratamento das leishmanioses, patologias que ocorrem nos hospedeiros vertebrados como o homem e, além disto, é sabido que as diferenças morfológicas e bioquímicas entre as formas promastigota e amastigota provavelmente determinam as diferentes susceptibilidades observadas entre estes dois estágios evolutivos frente a compostos leishmanicidas (CALLAHAN et al., 1997; SERENO et al., 1997; FUMAROLA et al., 2004).

Neste sentido, os resultados obtidos com a pesquisa experimental utilizando promastigotas nem sempre são conclusivos quando se visa o tratamento das leishmanioses. Assim, o uso das formas amastigotas, responsáveis pelas manifestações clínicas da doença, pode produzir resultados mais próximos do modelo animal.

Quanto aos estudos realizados com amastigotas, as pesquisas eram realizadas utilizando-se estas células oriundas de células infectadas *in vitro* ou a partir da biópsia da lesão de animais experimentalmente infectados, isso até meados de 1990. Entretanto, estas metodologias são caras, pouco práticas, produzem muitas vezes um número limitado de parasitos e possibilitam a presença de contaminantes do tecido infectado.

Além disso, o uso de animais, embora imprescindível em alguns casos, deve ser substituído por métodos alternativos sempre que possível (FUMAROLA et al., 2004).

A vantagem de se utilizar a forma clinicamente relevante do parasito na triagem de fármacos a baixo custo e livre de contaminantes celulares, aliada às mais recentes técnicas de cultivo *in vitro* de amastigotas axenicas de *Leishmania* spp. e a semelhança morfológica, bioquímica e antigênica destas com as amastigotas intracelulares obtidas *in vivo*, tem trazido grandes avanços na triagem de fármacos, de maneira que a avaliação de compostos leishmanicidas utilizando amastigotas axênicos tem apresentado resultados confiáveis, reproduzíveis e algumas vezes semelhantes aos obtidos com a forma intracelular (CALLAHAN et al., 1997; SERENO et al., 1997; BALANCO et al, 1998; GUPTA et al., 2001).

No presente estudo, o composto natural isolado ácido úsnico, que apresentou menor IC₅₀ na avaliação de seu efeito sobre promastigotas, foi avaliado também com relação ao seu potencial antileishmania sobre amastigotas axenicas de *L. chagasi*. Os resultados referentes ao efeito do ácido úsnico sobre as formas amastigotas estão representados nos gráficos 15 e 16.

Ao contrário do efeito demonstrado para as formas promastigotas, o ácido úsnico inibiu significativamente o crescimento das formas amastigotas a partir da concentração de 1 mM, enquanto para as formas promastigotas este valor foi de 0,025 mM. Além disto, para as amastigotas o ácido demonstrou IC₅₀ de 1,16 mM, muito maior que a avaliada para as formas promastigotas que foi igual a 0,0417 mM, e o efeito máximo de inibição observado para as amastigotas, 82,72 ± 5,2%, também foi menor que o apresentado nas formas promastigotas, 94,69 ± 1,3% (Gráfico 17).

Apesar das diferenças, os resultados da atividade do ácido úsnico sobre as formas amastigotas de *L. chagasi* foram significativos, confirmado o potencial antileishmania do composto também sobre as amastigotas axenicas. Estes resultados corroboram com os observados

por Fournet e colaboradores (1997), que demonstraram a atividade do ácido na diminuição da carga parasitária em modelos animais quando administrado intralesionalmente.

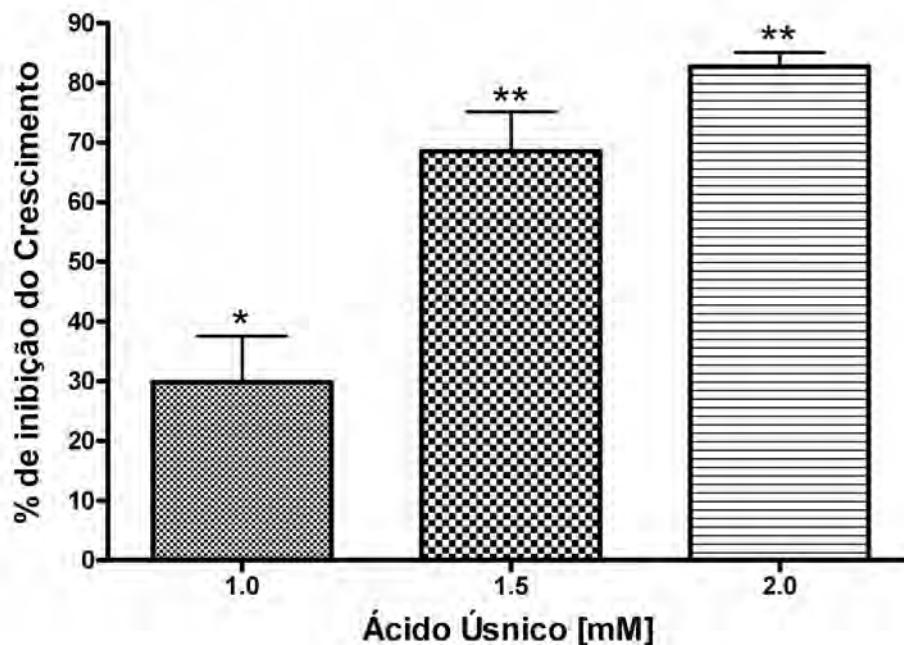


Gráfico 15 - Porcentagem de inibição do crescimento de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* na presença de diferentes concentrações do composto isolado ácido úsnico. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média e desvio padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ em relação ao controle.

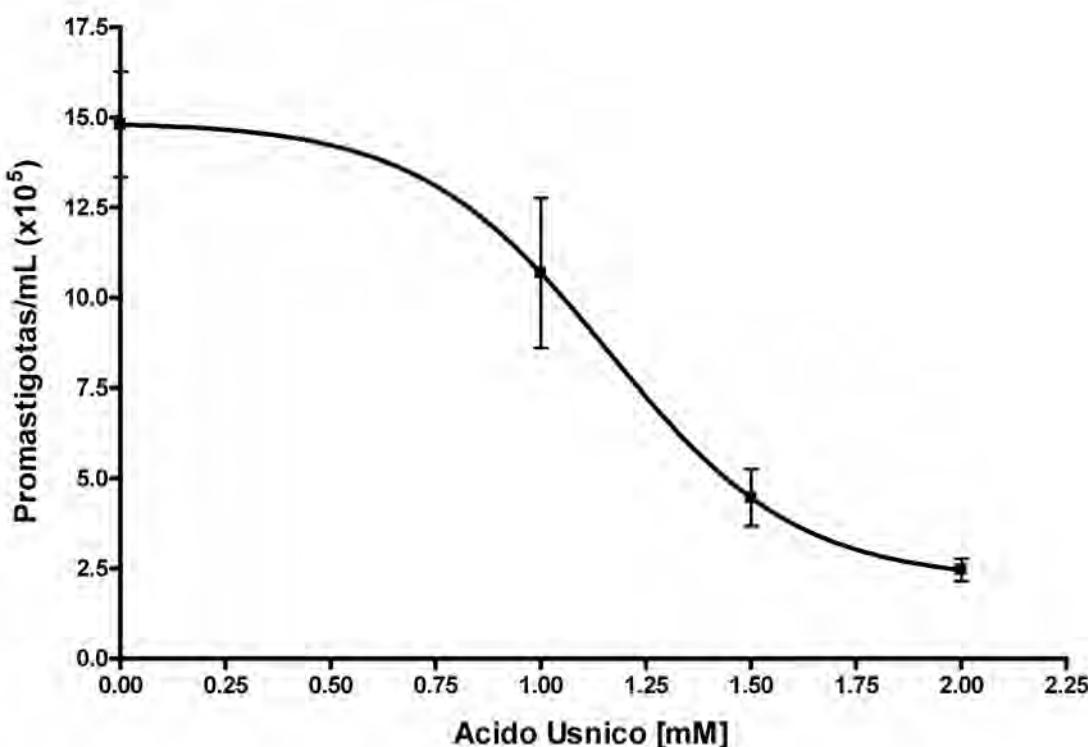


Gráfico 16 – Curva concentração-resposta do ácido úsnico sobre amastigotas de *Leishmania chagasi* demonstrando o efeito do composto sobre o número de parasitos/mL. O ajuste da curva foi realizado de acordo com a equação sigmoidal dose-resposta detalhada no item 3.13. Os pontos representam a média e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

A IC_{50} da pentamidina sobre as amastigotas de *L. chagasi* ensaiadas foi de 31,8 μ M, maior que a encontrada para as formas promastigotas (21,3 μ M), entretanto significativamente menor que a IC_{50} do ácido úsnico (1,16 mM) sobre as amastigotas. A pentamidina apresentou perfil de inibição do crescimento diferente entre amastigotas e promastigotas, de maneira semelhante ao observado para o ácido úsnico, demonstrando, para as drogas ensaiadas, uma maior resistência das formas amastigotas.

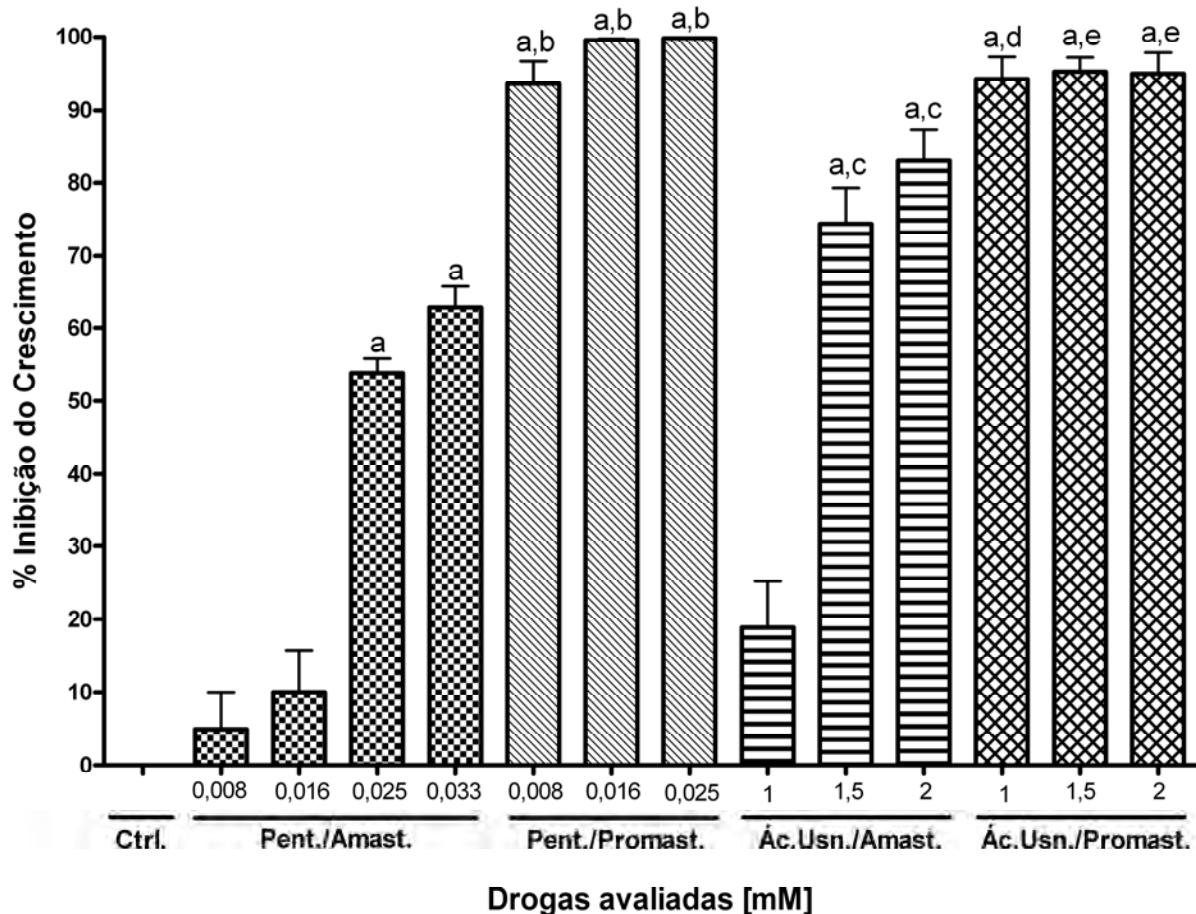


Gráfico 17 - Porcentagem de inibição do crescimento de formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania chagasi* na presença de diferentes concentrações do composto isolado ácido úsnico e da droga pentamidina. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. a - $p < 0,001$ em relação ao controle; b - $p < 0,001$ em relação às concentrações correspondentes de pentamidina sobre amastigotas; c - $p < 0,001$ em relação à pentamidina sobre amastigotas; d - $p < 0,001$ em relação à concentração correspondente de ácido úsnico sobre amastigotas; e - $p < 0,05$ em relação às concentrações correspondentes de ácido úsnico sobre amastigotas.

A diferença no potencial antileishmania entre os dois principais estágios de vida dos parasitos ensaiados por um mesmo composto tem sido observada por outros autores. Seifert e colaboradores (2007) não encontraram similaridade entre amastigotas e promastigotas de *L. donovani* no efeito antileishmania de diversos fosfolipídios sintéticos; Monzote e colaboradores (2007) também demonstraram uma IC_{50} maior para as amastigotas de *L. donovani* avaliadas na presença do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides*, enquanto Pontin e colaboradores

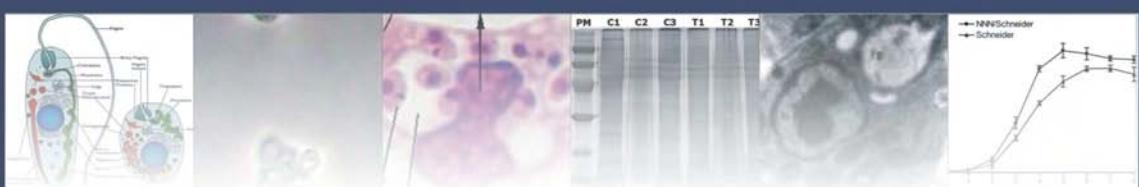
(2008) encontram significativa atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico de própolis verde sobre promastigotas de *L. braziliensis*, entretanto não observaram nenhuma ação do extrato de própolis sobre as formas amastigotas. Nas referidas pesquisas as amastigotas demonstraram maior resistência aos compostos ensaiados, corroborando com os resultados observados no presente estudo.

Outra forma de avaliar a ação de compostos naturais isolados, como o ácido úsnico, é o cultivo de formas amastigotas intracelulares na presença de diferentes concentrações do composto e observar as possíveis alterações na carga parasitária das células infectada *in vitro*, entretanto, a avaliação das drogas diretamente nas amastigotas também pode ser considerada eficiente na determinação da atividade antileishmania, principalmente pela possibilidade de encapsulamento das drogas por nanopartículas que podem ser fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear e, desta forma, carrear o composto até o fagolisossomo onde encontram-se os parasitos (TORRES-SANTOS et al., 1999; ROMERO, et al., 2008).

Torres-Santos e colaboradores (1999) demonstraram, por meio de microscopia eletrônica, a fusão de nanopartículas de poli-D,L-lactida com os vacúolos parasitóforos de macrófagos infectados, levando desta forma a droga ensaiada diretamente à forma amastigota, aumentando significativamente a ação do fármaco estudado. Neste sentido, estudos como os da presente pesquisa são importantes, pois avaliam a atividade antileishmania dos compostos diretamente sobre as amastigotas que, por meio das referidas técnicas de encapsulamento, podem ser alcançadas de maneira eficiente em futuros ensaios *in vivo*.



5 Conclusões

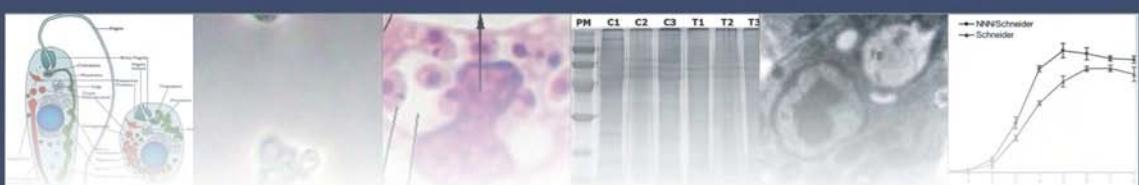


Em virtude dos resultados apresentados, as seguintes conclusões podem ser elencadas:

- ☞ Os compostos naturais isolados ácido úsnico, cumarina, queracetina e reserpina apresentaram significativa atividade antileishmania sobre as formas promastigotas de *Leishmania chagasi*;
- ☞ A concentração capaz de inibir o crescimento das culturas em 50% (IC_{50}) dos compostos foram 0,0417 mM para o ácido úsnico; 1,07 mM para a cumarina; 0,271 mM para a queracetina e 1,7 mM para a reserpina;
- ☞ Nas condições de cultivo padronizadas no presente estudo foi possível estabelecer o ciclo de vida *in vitro* dos parasitos, com passagem destes pelas duas principais formas de vida: promastigotas e amastigotas, além do cultivo das amastigotas axênicas para ensaios de ação antileishmania;
- ☞ O composto natural isolado ácido úsnico apresentou atividade antileishmania sobre amastigotas axênicas de *L. chagasi*, com IC_{50} igual a 1,16 mM;
- ☞ Não foi observada similaridade da IC_{50} do ácido úsnico e da pentamidina entre as formas amastigotas axênicas e promastigotas.



Referências



ADLER, S.; BER, M. The transmission of *Leishmania tropica* by the bite of *Phlebotomus papatasii*. **Indian J.Med.Res.** v. 29, p. 803-809. 1941.

AJDARY, S. et al. Comparison of the immune profile of non-healing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. **Infection and Immunity**. v. 68, p. 1760-1764. 2000.

ALENCAR, J.E. Expansão do calazar no Brasil. **Ceará Médico**, v. 5, p. 86-92. 1983. In.: MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília; Ministério da Saúde, 120 p. (Série A. Normas e manuais técnicos). 2003.

ALMEIDA, M. C. et al. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 98, p. 861-870. 2003.

ANTOINE, J.C. et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in microbiology**. v. 6, n. 10, p. 392-401. 1998.

ANTOINE, J.C. et al. *Leishmania* spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. **Advances in Parasitology**. v. 58, p. 1-68. 2004.

ASHFORD, R. W. The leishmanias as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**. v. 30(12-13), p. 1269-1281. 2000.

BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**. v. 70, p. 6734-6740. 2002.

BALANCO, J. M. et al. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. **Parasitology**. v. 116, p. 103-13. 1998.

BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**. v. 64, p. 1-109. 2007.

BARAK, E. et al. Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. **Molecular and biochemical parasitology**. v. 141, p. 99-108. 2005.

BARREIRO, E.J. A Descoberta Racional de Fármacos. **Ciência Hoje**. v. 40, n. 235, p. 26-31, 2007.

BASU, M. K.; RAY, M. Macrophage and Leishmania: an unacceptable coexistence. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 31, p. 145-154. 2005.

BATES, P.A.; ROGERS, M.E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. **Current Molecular Medicine**. v. 4, p. 601-609. 2004.

BAUZER, L. G. S. R. et al. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 102, p. 1-12. 2007.

BECKER, I. et al., Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v. 130, p. 65-74. 2003.

BELKAID, Y. et al. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**. v. 97, p. 6704-6709. 2000.

BERMAN, J. D.; DWYER, D. M.; WYLER, D. J. Multiplication of Leishmania in Human Macrophages In Vitro. **Infection and Immunity**. v.26, p. 375-379. 1979.

BERMAN, J. D. Activity of imidazoles against *Leishmania tropica* in human macrophage cultures. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. v. 30, p. 566-569. 1981.

BERMAN, J. D.; WADDELL, D.; HANSON, B. D. Biochemical Mechanisms of the Antileishmanial Activity-of Sodium Stibogluconate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 27, n. 6, p. 916-920. 1985.

BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V.; BEST, J. M. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochemical pharmacology**. v. 36, n. 2, p. 197-201. 1987.

BESTEIRO, S. et al., Protein turnover and differentiation in Leishmania. **International Journal for Parasitology**. v. 37, p. 1063-1075. 2007.

BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. **Infection and immunity**. v. 76, n. 3, p. 1003-1015. 2008.

BIOGRAPHY OF COLONEL WILLIAM B (PROFESSOR, SIR) LEISHMAN. **Royal Army Medical Corps. University of Glasgow.** Biographies. Disponível em: <http://www.archives.gla.ac.uk/honour/biog.php?bid=247>
Acesso em 17 de Janeiro de 2008.

BOELAERT, M. et al. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. **Nature reviews – microbiology.** p. 30-39. 2007.

BRAGA, F. G. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of ethnopharmacology.** v. 111, n. 2, p. 396-402. 2007.

BRAVO, J. A. et al. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry.** v. 50, n. 1, p. 71-74. 1999.

BRITTINGHAM, A.; MOSSER, D. M. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. **Parasitology today.** v. 12, p. 444-447. 1996.

BROBEY, R. K. B. et al. Comparative Two-Dimensional Gel Electrophoresis Maps for Promastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases.** v. 10, n. 1, p. 1-6. 2006.

CALDAS, A. J. M. et al. Infecção por *Leishmania* (Leishmania) chagasi em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luis-MA, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 34, p. 445-451. 2001.

CALLAHAN, H.L.; PORTAL, A.C.; DEVEREAUX, R.; GROGL, M. An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrobial agents and chemotherapy.** v. 41, n. 4, p. 818-822. 1997.

CAMPANELLA, L. et al. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. **Biochimie.** v. 84, n. 4, p. 329-34. 2002.

CARDARELLIA, M. et al. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. **Cellular and molecular life sciences.** v. 53, p. 667-672. 1997.

CARVALHO, E. M. et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Journal of Immunology.** v. 135, p. 4144-4148. 1985.

CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia.** 72(6):599-618. 2001.

CARVALHO, T. M. U.; FEITOSA, L. F. M.; MIRANDA-ROCHA, G. Laminário de Protozoologia – Amastigotas de *Leishmania* sp. Disponível em: <http://www.biof.ufrj.br/laminario.html> Acessado em: 05 de julho de 2008.

CASAGRANDE, F.; DARBON, J. M. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. **Biochemical pharmacology**. v. 61, n. 10, p. 1205-1215. 2001.

CETIN, H. et al. Insecticidal activity of major lichen compounds, (-)- and (+)-usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens* L. **Parasitology research**. v. 102, n. 6, p. 1277-1279. 2008.

CHAKRABORTY, A. K.; MAJUMDER, H. K. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. **Biochemical and biophysical research communications**. v. 152, n. 2, p. 605-611. 1988.

CHAN-BACAB, M. J. and PEÑA-RODRIGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Natural product reports**. v.18, p.674-688. 2001.

CHANCE, M. L. The Six Diseases of WHO: Leishmaniasis. **British Medical Journal**. v. 283, p. 1245-1247. 1981.

COCCHIETTO M. et al. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**. v. 89, n. 4, p. 137-46. 2002.

CONTE, E. et al. Quantitative evaluation of interleukin-12 p40 gene expression in peripheral blood mononuclear cells. **Immunological investigations**. 37(2):143-51. 2008.

COSTA, C. H. et al. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **Journal of Infectious Diseases**. v. 182, p. 997-1000. 2000.

COX, F. E. G. History of Human Parasitology. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15(4), p. 595-612. 2002.

CROFT, S. L., SEIFERT, K.N.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **The Indian journal of medical research**. v. 123, p. 399-410. 2006.

CUNHA, S. et al. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 89, p. 155-158. 1995.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. **Experimental and molecular pathology**. v. 72, p. 132-141. 2002.

CURB, J. D. et al. Reserpine and breast cancer in the Hypertension Detection and Follow-Up Program. **Hypertension**. v. 4, n. 2, p. 307-311. 1982.

CYSNE-FINKELSTEIN, L. et al. *Leishmania amazonensis*: Long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. **Experimental Parasitology**. v.89, p.58-62. 1998.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. **Veterinary parasitology**. v. 149, p. 139-46. 2007.

DAS, B. B. et al. Differential induction of Leishmania donovani bi-subunit topoisomerase I-DNA cleavage complex by selected flavones and camptothecin: activity of flavones against camptothecin-resistant topoisomerase I. **Nucleic acids research**. v. 34, n. 4, p. 1121-1132. 2006.

DELORENZI, J. C. et al. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from Peschiera australis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 45, n. 5, p. 1349-54. 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**. v. 14(5), p. 417-23. 1996.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 95, p. 230-243. 2001.

DONELSON, J. E.; GARDNER, M. J.; EL-SAYED, N. M. More surprises from Kinetoplastida. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 96, p. 2579-2581. 1999.

DRUMMELSMITH, J. et al. Proteome mapping of the protozoan parasite Leishmania and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. **Molecular & cellular proteomics**. v. 2, n. 3, p. 146-155. 2003.

DRUMMELSMITH, J. et al. Differential protein expression analysis of Leishmania major reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. The **Journal of biological chemistry**. v. 279, n. 32, p. 33273-332780. 2004.

ELLIOTT, J. Report on epidemic and remittent fever occurring in parts of Burdwan and Neddea divisions. Bengal Secretarial Office. Calcutta, India p.123. 1863. *Apud COX, F. E. G. History of Human Parasitology. Clinical Microbiology Reviews.* v. 15(4), p. 595-612. 2002.

ELO, H.; MATIKAINEN, J.; PELTTARI, E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Die Naturwissenschaften.** v. 94, n. 6, p. 465-468. 2007.

EPHROS, M. et al. Stage-Specific Activity of Pentavalent Antimony against *Leishmania donovani* Axenic Amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 43, n. 2, p. 278-282. 1999.

ETTINGER, N. A.; WILSO, M. E. Macrophage and T-Cell Gene Expression in a Model of Early Infection with the Protozoan *Leishmania chagasi*. **PLoS neglected tropical diseases.** v. 2, n. 6, p. e252. 2008.

EVANS, T. G. et al. Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. **Journal of immunology.** v. 151, p. 907-915. 1993.

FIGUEIREDO, E. M.; SILVA, J. C.; BRAZIL, R. P. Experimental treatment with sodium stibogluconate of hamsters infected with *Leishmania (Leishmania) amzonensis* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.32, n.2, p.191-193, 1999.

FIOCRUZ. As leishmanioses. Laboratório de imunomodulação – Depto. de Protozoologia/IOC – Fiocruz. 2007. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/index.htm> Acesso em: 20 de janeiro de 2008.

FORGET, G. et al. Role of Host Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-Induced Inhibition of Nitric Oxide Production. **Infection and Immunity.** v. 74, p. 6272-6279. 2006.

FOURNET, A. et al. Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. **Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology.** v. 116, n. 1, p. 51-54. 1997.

FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONÍSIO, O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Research in microbiology.** v. 155, p. 224-230. 2004.

GENERAL SIR WILLIAM BOOG LEISHMAN. Lieut. Editorial Section. **American Journal of Public Health.** v. 16(8), p. 826. 1926.

GHALIB, H. W. et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **Journal of Clinical Investigation**. v. 92, p. 324-329. 1993.

GHAZANFARI, T. et al. Garlic induces a shift in cytokine pattern in *Leishmania* major-infected BALB/c mice. **Scandinavian journal of immunology**. v. 52, n. 5, p. 491-495. 2000.

GILLESPIE, R. D.; MBOW, M. L.; TITUS, R. G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite Immunology**. v. 22, p. 319-331. 2000.

GOHLKE-BÄRWOLF, C. et al. Anticoagulation and thrombophilia in pregnancy. **Der Internist**. [Resumo]. 2008.

GREEN, S. J. et al. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania* major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **Journal of Immunology**. v. 144, p. 278-283. 1990.

GUPTA, N. et al. Membrane characterization of amastigote-like forms of *Leishmania donovani*. **Tropical medicine & international health**. v. 1, n. 4, p. 495-502. 1996.

GUPTA, N. et al. Characterization of intracellular metabolites of axenic amastigotes of *Leishmania donovani* by ^1H NMR spectroscopy. **Acta tropica**. v. 73, n. 2, p. 121-133. 1999.

GUPTA, N.; GOYAL, N.; RASTOGI, A. K. In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. **Trends in parasitology**. v. 17, p. 150-153. 2001.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. **Adv. Parasitol.** v. 44, p. 1-39, 2000.

HANNAERT, V. et al. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. **Kinetoplastid Biology and Disease**. v. 2(11). 2003.

HAVSTEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical pharmacology**. v. 32, n. 7, p. 1141-1148. 1983.

HAWORTH, R. D.; WHALLEY, W. B. Alexander Robertson. 1896-1970. **Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society**. v. 17, p. 617-642. 1971.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; MUTHA, S. S. and LOCKSLEY, R. M. Production of interferon gamma, interleukin2, interleukin 4 and interleukin

10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v.88, n.16, p.7011-7015, 1991.

HODGKINSON, V. H. et al. Leishmania amazonensis: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. **Experimental parasitology.** v. 83, n. 1, p. 94-105. 1996.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry.** v. 61, n. 7, p. 729-736. 2002.

JAKUBOWICZ-GIL, J. et al. Cell death and neuronal arborization upon quercetin treatment in rat neurons. **Acta neurobiologiae experimentalis.** v. 68, p. 139-146. 2008.

JAYAKUMAR, A. et al. Leishmania major infection activates NF-kappaB and interferon regulatory factors 1 and 8 in human dendritic cells. **Infection and Immunity.** v. 76, p. 2138-2148. 2008.

JI, J. et al. Analysis of T helper cell responses during infection with Leishmania amazonensis. **The American journal of tropical medicine and hygiene.** v. 66, p. 338-345. 2002.

KAMHAWI, S. et al. The vectorial competence of Phlebotomus sergenti is specific for Leishmania tropica and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. **Parasitology.** v. 121, p. 25-33. 2000.

KAMHAWI, S. et al. A Role for Insect Galectins in Parasite Survival. **Cell.** v. 119, p. 329-341. 2004.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology.** v.22, p. 439-445. 2006.

KEMP, K. et al. Leishmania-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN- γ) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. **Clinical and experimental immunology.** v. 116, p. 500-504. 1999.

KYAN, C. M. Crescimento microbiano, 2003. Disponível em <http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/crescimento/crescimento.html> Acesso em: 12 de janeiro de 2008.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. 1987. *Apud* BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology.** v. 64, p. 1-109. 2007.

LAUTERWEIN, M. et al. In Vitro Activities of the Lichen Secondary Metabolites Vulpinic Acid, (1)-Usnic Acid, and (2)-Usnic Acid against Aerobic and Anaerobic Microorganisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 39, n. 11, p. 2541-2543. 1995.

LEBARBENCHON, C.; BROWN, S. P.; POULIN, R.; GAUTHIER-CLERC, M.; THOMAS, F. Evolution of pathogens in a man-made world. **Molecular Ecology**. v. 17, p. 475-484. 2008.

LEISHMANIASIS. Secretariat of The League of Red Cross Societie. **The British Journal of Nursing**. 1936.

LOCKSLEY, R. M.; SCOTT, P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis induction, expansion and effect function. **Immunology Today**. v.7, n.3, p.58-61, 1991.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study. **Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents**. v. 2, n. 6, p. 691-714. 2002.

LÓPEZ-MUÑOZ, F. et al. Historical approach to reserpine discovery and its introduction in psychiatry. **Actas españolas de psiquiatría**. v. 32, n. 6, p. 387-395. 2004.

MARTIN-SANCHEZ, J. et al. Detection of Leishmania infantum kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other Leishmania infection markers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 70, p. 545-548. 2004.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. S.; AMENDOEIRA, M. R. R. Leishmaniose Visceral (calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**. v.41, n.5, p.69-84. 1981.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and Visceral Leishmaniases in Brazil - Emerging Anthropozoonosis and Possibilities for Their Control. **Cad. Saúde Públ.** v. 10 (2), p. 359-375. 1994.

MATTNER, J. et al. NKT cells mediate organ-specific resistance against *Leishmania major* infection. **Microbes and Infection**. v. 8, p. 354-362. 2006.

MAUEL, J. et al. Studies on protective cell-mediated mechanisms in experimental Leishmania infections, p. 663-672. 1975. In.: PEARSON, R. D. et al. Interaction of Leishmania donovani Promastigotes with Human Monocyte-Derived Macrophages: Parasite Entry, Intracellular Survival, and Multiplication. **Infection and Immunity**. v. 32, p. 1249-1253. 1981.

MCNAUGHT, A. D.; WILKINSON, A. IUPAC Compendium of Chemical Terminology. IUPAC. 2a Ed. 1997.

MENDONÇA-FILHO, R. R. et al. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). **Research in microbiology**. v. 155, n. 3, p. 136-143. 2004.

MERCER, L. D. et al. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. **Biochemical pharmacology**. v. 69, n. 2, p. 339-345. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília; Ministério da Saúde. 120 p. (Série A. Normas e manuais técnicos). 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral Grave Normas e Condutas. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 1^a Ed., 60 p. 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2^a Ed., 184 p. 2007.

MINJA, M. M. Medicinal plants used in the promotion of animal health in Tanzania. **Revue scientifique et technique**. v. 13, n. 3, p. 905-25. 1994.

MITTRA B. et al. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular Medicine**. v. 6, n. 6, p. 527-541. 2000.

MOHAREB, E. W. et al. Viscerotropic Leishmania tropical: transformation to amastigotes in cell-free media. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**. 25(3):883-91. 1995.

MOHAREB, E. W.; MIKHAIL, E. M.; MANSOUR, N. S. Leishmania major: amastigote formation in cell-free media. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**. v. 26 p. 155-159. 1996.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 105-111. 2001.

MONZOTE, L. et al. In vitro activity of an essential oil against *Leishmania donovani*. **Phytotherapy research**. v. 21, n. 11, p. 1055-1058. 2007.

MORENO, E. C. et al. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39, n. 5, p. 421-427.2006

MORRIS, R. V. et al. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. **Journal of immunology**. v. 167, p. 5226-5230. 2001.

MOSMANN, T.R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**. v. 136, p. 2348-2357. 1986.

NICOLAS, L. et al. *Leishmania major* reaches distant cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph node: a study with laboratory mice. **Infection and immunity**. v. 68, p. 6561-6566. 2000.

NYLÉN, S. et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 204, p. 805-807. 2007.

OTERO, A. C. S. et al. Short report: occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 62, p. 128-131. 2000.

OUELLETTE, M. et al. Le parasite *Leishmania* à l'ère de la post-génomique. **M/S : médecine sciences**. v. 19, n 10, p. 900-909. 2003.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOLOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**. v. 7, n. 4-5, p. 257-266. 2004.

PAN, A. A.; MCMAHON-PRATT, D.; HONIGBERG, B. M. *Leishmania mexicana pifanoi*: antigenic characterization of promastigote and amastigote stages by solid phase radioimmunoassay. **The Journal of parasitology**. v. 70, p. 834-835. 1984.

PAN, A. et al. Developmental life cycle of *Leishmania* – Cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. v. 40(2), p. 213-223. 1993.

PANARO, M. A. et al. Canine leishmaniasis in Southern Italy: a role for nitric oxide released from activated macrophages in asymptomatic infection? **Parasites & Vectors**. v. 1, n. 1, p. 10. 2008.

PANDA, S.; KAR, A. Amelioration of L-thyroxine-induced hyperthyroidism by coumarin (1,2-benzopyrone) in female rats. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**. v. 34, n. 11, p. 1217-1279. 2007.

PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. **Journal of immunology**. v. 125, p. 2195-2201. 1980.

PEARSON, R. D. et al. Interaction of *Leishmania donovani* Promastigotes with Human Monocyte-Derived Macrophages: Parasite Entry, Intracellular Survival, and Multiplication. **Infection and Immunity**. v. 32, p. 1249-1253. 1981.

PEELING, R. W., SMITH, P. G.; BOSSUYT, P. M. M.. Evaluating Diagnostics: A guide for diagnostic evaluations. **Nature reviews - microbiology**. p. 2-6. 2007.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil-Médico**. v. 48, p. 949-950. 1934. In.: MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília; Ministério da Saúde. 120 p. (Série A. Normas e manuais técnicos). 2003.

PIARROUX, R. et al. Comparison of PCR with direct examinations of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 32, p. 746-749. 1994.

PIMENTA, P.F. et al. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**. v. 91, p. 9155-9159. 1994.

PIÑERO, J. et al. New administration model of trans-chalcone biodegradable polymers for the treatment of experimental leishmaniasis. **Acta tropica**. v. 98, n. 1, p. 59-65. 2006.

PONTIN, K. et al. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitology research**. v. 103, n. 3, p. 487-492. 2008.

POULTER, L. W.; PANDOLPH, C. R. Mechanisms of immunity to leishmaniasis. IV. Significance of lymphatic drainage from the site of infection. **Clinical and experimental immunology**. v. 48, p. 396-402. 1982.

PROUDFOOT, L. et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**. v. 93, p. 10984-10989. 1996.

PUECHBERTY, J. et al. Compared genomics of the strand switch region of *Leishmania* chromosome 1 reveal a novel genus-specific gene and conserved structural features and sequence motifs. **BMC Genomics**. v. 8(57). 2007.

RAMANITRAHASIMBOLA, D. et al. Bronchodilator activity of Phymatodes scolopendria (Burm.) Ching and its bioactive constituent. **Journal of ethnopharmacology**. v. 102, n. 3, p. 400-7. 2005.

RANELLETTI, F. O. et al. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors. **International journal of cancer**. v. 85, n. 3, p. 438-445. 2000.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v.26, n.4, p.550-555, 2003.

RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual review of entomology**. v. 32, p. 463-78. 1987.

RIDLEY, R. Evaluating diagnostics: VL. **Nature reviews - microbiology**. p. 1. 2007.

RIERA, C. et al. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 98, p. 102-110. 2004.

RIOUX, J. A. et al. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**. v. 65, p. 111-125. 1990.

ROBERTS, W. L.; BERMAN, J. D.; RAINY, P. M. In Vitro Antileishmanial Properties of Tri- and Pentavalent Antimonial Preparations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 39, n. 6, p. 1234-1239. 1995.

ROBERTS, L. J.; HANDMAN, E.; FOOTE, S. J. Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. **BMJ Clinical Research ed.** v. 321, p. 801-804. 2000.

ROCHA, L. G. et al. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**. v. 12(6-7), p. 514-535. 2005.

ROGERS, M.E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**. v. 430, p. 463-467. 2004.

ROJAS, E.; SCORZA, J. V. Presencia de nectomonadas metacíclicas de *L. pifanoi* en la hipofaringe de *Lutzomyia youngi* y la ingestión de azúcares. **Rev. Saude Pública**. v. 30, p. 240-247. 1996.

ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. **Expert opinion on drug delivery**. v. 5, n. 7, p. 805-823. 2008.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual review of nutrition**. v. 22, p. 19-34. 2002.

ROTUREAU, B. et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main New World Leishmania species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, p. 459-467. 2006.

SADLOVA, J.; HAJMOVA, M.; VOLF, P. Phlebotomus (Adlerius) halepensis vector competence for Leishmania major and Le. tropica. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 17, p. 244-250. 2003.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. A Análise Proteómica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos. **Boletim de Biotecnologia**. v. 77, p. 7-17, 2004

SANTOS, S. N. P. et al. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**. v. 64, n. 2, p. 154-60. 2006.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, cap. 15, p. 371-400. 2003.

SCHULDINER, S.; LIU, Y.; EDWARDS, R. H. Reserpine binding to a vesicular amine transporter expressed in Chinese hamster ovary

fibroblasts. **The Journal of biological chemistry.** v. 268, n. 1, p. 29-34. 1993.

SEIFERT, K. et al. Antileishmanial structure-activity relationships of synthetic phospholipids: in vitro and in vivo activities of selected derivatives. **Antimicrobial agents and chemotherapy.** v. 12, p. 4525-4528. 2007.

SELVAPANDIYAN, A., et al. Genetically modified live attenuated parasites as vaccines for leishmaniasis. **Indian J Med Res.** v. 123, p. 455-466. 2006.

SEN, G. et al. Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. **The Journal of antimicrobial chemotherapy.** v. 61, n. 5, p. 1066-1075. 2008.

SERENO, D.; LEMESRE, J. L. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy.** v. 41, n. 5, p. 972-976. 1997.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annual review of microbiology.** v. 49, p. 117-143. 1995.

SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their applications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 89, p. 471-478. 1994.

SHAW, J. Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. **Brazilian Journal of Genetics.** v. 20, p. 123-128. 1997.

SHORR, R. I. et al. Reserpine reconsidered. **Journal of General Internal Medicine.** v. 8, n. 9. 1993.

SILVA B. et al. Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults. **Neurotoxicity research.** v. 13, n. 3-4, p. 265-279. 2008.

SILVA, D. G. Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas. **Universidade de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.** Dissertação. p. 120. 2008.

SIMPSON, A. G. B.; LUKES, J.; ROGER, A. J. The Evolutionary History of Kinetoplastids and Their Kinetoplasts. **Mol. Biol. Evol.** v. 19(12), p. 2071-2083. 2002.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual review of microbiology**. v.41, p. 363-382. 1987.

SINGH, G.; CHAVAN, H. D.; DEY, C. S. Proteomic analysis of miltefosine-resistant *Leishmania* reveals the possible involvement of eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A). **International journal of antimicrobial agents**. v. 31, n. 6, p. 584-586. 2008.

SRIVASTAVA, D. et al. Reserpine can confer stress tolerance and lifespan extension in the nematode *C. elegans*. **Biogerontology**. 2008.

SUNDAR, S. et al. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **The Lancet**. v. 351, p. 563-565. 1998.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis – current therapeutic modalities. **Indian J Med Res**. v. 123, p. 345-352. 2006.

TASDEMIR, D. et al. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, n. 4, p. 1352-1364. 2006.

TEIXEIRA, M. C. et al. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. **Parasitology research**. v. 88, n. 11, p. 963-968. 2002.

TORRES-SANTOS, E. C. et al. Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly(D,L-lactide) nanoparticles. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 43, n. 7, p. 1776-1778. 1999.

VALENZUELA, J. G. et al. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel *Cimex* family of apyrases. **The Journal of Experimental Biology**. v. 204, P. 229-237. 2001.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania*. **Bras.Med.** v. 25, p. 411. 1911. Apud COX, F. E. G. History of Human Parasitology. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15(4), p. 595-612. 2002.

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

WARBURG, A. The structure of the female sand fly (*Phlebotomus papatasi*) alimentary canal. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 102, p. 161-166. 2008.

WEI, X. Q. et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**. v. 375, p. 408-411. 1995.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) - Report on Global Surveillance of Epidemic-prone infectious diseases, WHO/CDS/CSR/2000.1, 2000. Disponível em: <http://www.who.int/emc> Acesso em 10 de janeiro de 2008.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) - Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly Epidemiological Record**, 2002. Disponível em: <http://www.who.int/wer> Acesso em 11 de Janeiro de 2008.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) - Special Programme for research and training in tropical diseases – TDR. **Disease Information**, 2004. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm> Acesso em 10 de Janeiro de 2008.

WITTMANN-LIEBOLD, B.; GRAACK, H. R.; POHL, T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**. v. 7, n. 5, p. 4688-4703. 2006.

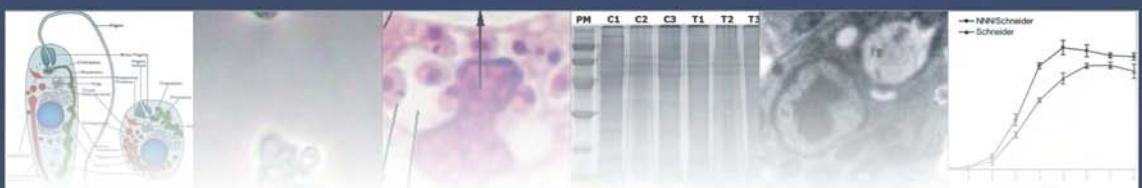
WONG, I. L. et al. Flavonoid dimers as bivalent modulators for pentamidine and sodium stiboglucanate resistance in leishmania. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 51, n. 3, p. 930-940. 2007.

ZANDBERGEN, G. et al. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. **The Journal of Immunology**. v. 173, p. 6521-6525. 2004.

ZINKERNAGEL, R. M.; HENGARTNER, H. Regulation of the immune response by antigen. **Science**. v. 293, p. 251-253. 2001.



Anexos





UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
C E R T I DÃO

João Pessoa, 16 de março de 2007

CEPA Nº. 0403/07

Ilmo(a). Sr(a).

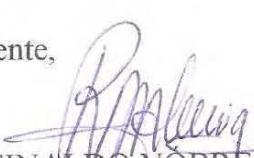
Pesquisadores: Orientador: Prof. Dr. Demétrius Antônio M. Araújo; Mestranda: Amely Branquinho Martins

Departamento/Setor: DBM/LTF/UFPB

Ref.: Projeto de Pesquisa: "ANÁLISE PROTEÔMICA EM LEISHMANIA CHAGASI: AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS VEGETAIS ISOLADOS COM PERSPECTIVA FARMACOLÓGICA"

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU** e **APROVOU** a execução do projeto acima.

Atenciosamente,


Prof. Dr. REINALDO NÓBREGA DE ALMEIDA
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB