



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA PROF. DELBY
FERNANDES DE MEDEIROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

ANTÔNIA ROSÂNGELA SOARES PENHA

ESTUDO DA POTENCIALIDADE DA LIGNANA IANGAMBINA E DA
QUITOSANA NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS

JOÃO PESSOA – PB

2010

ANTÔNIA ROSÂNGELA SOARES PENHA

**ESTUDO DA POTENCIALIDADE DA LIGNANA IANGAMBINA E DA
QUITOSANA NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS**

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.

Orientadora: Dra. Márcia Rosa de Oliveira

João Pessoa – PB

2010

P399e Penha, Antônia Rosângela Soares.
Estudo da Potencialidade da Lignana langambina e da
Quitossana no Tratamento da Leishmaniose Experimental em
Camundongos Suiços/ Antônia Rosângela Soares Penha. – João
Pessoa, 2010.
119f. :il.
Orientadora: Márcia Rosa de Oliveira
Dissertação (Mestrado) – UFPb – CCS/LTF

1. Leishmaniose. 2. Langambina. 3. Quitossana.

UFPb/BC

CDU: 616.993.161(043)

Responsável pela catalogação: Maria de Fátima dos Santos Alves-CRB -15/149

ANTÔNIA ROSÂNGELA SOARES PENHA

**ESTUDO DA POTENCIALIDADE DA LIGNANA IANGAMBINA E DA
QUITOSANA NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS**

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: 10/03/2010

Banca Examinadora:

Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB)

Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa
(Departamento de Biologia Molecular – UFPB)

Dra. Márcia Rosa de Oliveira (Orientadora)
(Departamento de Biologia Molecular – UFPB)

Com amor, para meus pais e
meus irmãos que sempre se
orgulharam da “filha/irmã
cientista”...

Aos meus amigos, pela força
e incentivo que sempre
depositaram em mim.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor e carinho que sempre me fortalece. Mesmo distantes vocês sempre estiveram presentes em minha mente e coração. Vocês representam a razão de tudo que sou e de tudo que me tornarei, em vocês me fortaleço e sei também que vocês se fortalecem com o meu sucesso.

À Profa. Dra. Márcia Rosa de Oliveira, pela confiança, dedicação e apoio fundamental durante a realização deste trabalho.

As Profs. Dra. Alice Maria Costa Martins da Universidade Federal do Ceará e Dra. Rosa Valéria da Silva Amorim da Universidade Federal do Pernambuco pela fundamental parceria e colaboração.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho por ceder a substância iangambina.

Ao Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACON) da Universidade Federal da Paraíba e a técnica Lúcia pelo estudo da interação iangambina e complexo de quitosana pelo método calorimétrico exploratório diferencial (DSC).

Ao Prof. Dr. Fábio Santos de Souza por auxiliar na análise do DSC.

Aos amigos (as) do Laboratório de Leishmanioses e pesquisa, André, Priscilla, Patrícia, Yara, Francianne, Paula, John e Alba, pela ajuda nos inúmeros experimentos e também por tornarem as horas de trabalho mais divertidas.

Às técnicas dona Alda, Gláucia e Teresa Cristina, pelo auxílio dado em todos os momentos que precisei, e em especial a dona Rosângela, pela amizade e confiança depositadas em mim.

À Crispim, do Biotério Thomas George (LTF/UFPB), pela amizade e apoio na disponibilidade dos animais.

Agradeço aos colegas da Pós-graduação pelo ótimo relacionamento e por tornarem o curso de mestrado uma experiência inesquecível em minha vida.

Por fim, o mais importante agradecimento a Deus, por ter permitido a realização de mais uma etapa de minha vida, assim como por ter colocado em meu caminho todas essas pessoas maravilhosas que auxiliaram em meu desenvolvimento.

“Lembrem-se de que a ciência exige que as pessoas se dediquem a ela durante a vida inteira. E se tivessem duas vidas, ainda assim não seria suficiente. A ciência demanda dos indivíduos grande tensão e forte paixão. Sejam apaixonados por suas ciências e por suas pesquisas.”

Ivan Pavlov

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania* que afetam mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo. As manifestações clínicas podem variar desde simples lesões cutâneas à leishmaniose visceral que pode ser fatal. A quimioterapia convencional baseia-se em múltiplas injeções parenterais com antimoniais pentavalentes que são consideravelmente tóxicos e propensos a induzir resistência nos parasitas. A iangambina é uma lignana furofurânica isolada das folhas da *Ocotea duckei* que apresenta várias potencialidades farmacológicas. A quitosana, um polissacarídeo natural composto de glicosamina e N-acetil-D glicosamina, tem demonstrado propriedades farmacêuticas relacionadas à liberação controlada de drogas. Considerando que a busca de drogas mais eficazes contra *Leishmania* tornou-se extremamente necessária, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antileishmania da iangambina e da quitosana assim como a associação da iangambina com a quitosana em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Estas substâncias foram testadas sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, sobre macrófagos murinos e células epiteliais de rim canino (MDCK), sobre a infecção de macrófagos murinos com *L. chagasi* e em camundongos suíços infectados com *L. amazonensis*. A iangambina apresentou atividade antipromastigota sobre as duas espécies e a quitosana apresentou atividade antipromastigota para a espécie *L. chagasi*. A associação da iangambina com a quitosana não interferiu com a atividade antipromastigota da iangambina. Quanto a citotoxicidade para as células de mamíferos, não houve atividade citotóxica da iangambina sobre macrófagos e células MDCK no tempo de exposição de 24h; a quitosana não apresentou um efeito citotóxico para os macrófagos quando estes foram expostos por 24h, no entanto para o tempo de exposição de 48h, esse carboidrato apresentou uma citotoxicidade significativa para macrófagos. A iangambina e a quitosana apresentaram atividade anti-amastigota em macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* nos tempos de 48h e 72h de incubação. Esta redução não foi dependente da produção de óxido nítrico (NO) e nem do fator de necrose tumoral- α (TNF- α). No modelo de camundongos suíços infectados na pata com *L. amazonensis* o grupo de animais que recebeu tratamento da associação da iangambina com a quitosana e o grupo que recebeu quitosana apresentaram uma redução significativa no tamanho das lesões da pata na oitava semana de tratamento e uma diminuição na carga parasitária da pata e linfonodo poplíteo. O grupo de animais tratados com a iangambina, embora não tenha apresentado diminuição de lesão, também teve uma redução da carga parasitária da pata e linfonodo. Dessa forma, pode-se concluir que a iangambina e a quitosana apresentam uma potencialidade na terapêutica das leishmanioses, caracterizada por uma atividade antileishmania tanto *in vitro* como *in vivo*.

Palavras-chave: *Leishmania*. Iangambina. Quitosana

ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of parasitic diseases caused by different species of the genus *Leishmania* and affect over 12 million people throughout the world. Clinical manifestations may vary from simple cutaneous lesions to visceral leishmaniasis, which may be fatal. Conventional chemotherapy is based on several parenteral injections of pentavalent antimonials, drugs that are considerably toxic and prone to induce parasite resistance. Yangambin is a furofuranic lignan, isolated from the leaves of *Ocotea duckei*, which presents several pharmacological potentialities. Chitosan, a natural polysaccharide composed of glucosamine and n-acetyl-d-glucosamine, has been demonstrating pharmaceutical properties related to controlled drug release. Taking into account that the search for more effective drugs against *Leishmania* has become necessary, this study aimed to evaluate the antileishmanial activity of yangambin and chitosan, as well as the association of yangambin and chitosan on *in vitro* and *in vivo* experimental models. The molecules were tested on: promastigote forms of *L. amazonensis* and *L. chagasi*; murine macrophages and epithelial cells of canine kidney (MDCK cells); macrophages infected with *L. chagasi*; and Swiss mice infected with *L. amazonensis*. Yangambin presented antipromastigote activity against both *Leishmania* species, and chitosan against *L. chagasi*. The association yangambin-chitosan did not interfere with the antipromastigote activity of yangambin. Concerning cytotoxicity on mammalian cells, no cytotoxic activity of yangambin was registered on murine macrophages nor MDCK cells at a 24-hour exposure time. Chitosan was not cytotoxic for macrophages exposed to it for 24 hours, however, it presented significant cytotoxic activity for macrophages at a 48-hour exposure time. Yangambin and chitosan presented anti-amastigote activity on murine macrophages infected with *L. chagasi* at a 48 and 72-hour incubation time. Such activity was independent of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production. On the model of Swiss mice infected on the footpad with *L. amazonensis*, the group treated with the association yangambin-chitosan and the group treated with chitosan presented a significant reduction of the paw lesion size at the eighth week of treatment, as well as a reduced parasite load at the footpad and lymph node. Although the group of animals treated with yangambin did not present reduction of the footpad lesion size, a reduced parasite load was observed at the footpad and lymph node. Thus, it can be concluded that yangambin and chitosan present a potentiality in the therapeutics of leishmaniasis, characterized by antileishmanial activity both *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: *Leishmania*. Yangambin. Chitosan.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Manifestações clínicas das leishmanioses. (A) leishmaniose cutânea simples, caracterizada por lesão única de borda elevada e fundo granulomatoso na região maleolar externa; (B) leishmaniose cutânea difusa, apresentando lesões pápulo-nodulosas com descamação e algumas crostas; (C) leishmaniose mucocutânea, apresentando destruição parcial da região nasolabial; (D) leishmaniose visceral no período final, caracterizada pela intensa desnutrição e hepatoesplenomegalia (Fonte: BRASIL, 2007a; BRASIL, 2006).....25
- Figura 2.** Mapa de distribuição das leishmanioses em 88 países no mundo (Fonte: WHO/TDR, 2004a).....26
- Figura 3.** Estratificação dos casos de leishmaniose visceral no Brasil em áreas de transmissão de LV (2005-2007), segundo risco epidemiológico, em: esporádica (< 2,4 casos), moderada ($\geq 2,4$ e < 4,4 casos) e intensa ($\geq 4,4$ casos). Fonte: SVS/MS. (Extraído de: BRASIL, 2009).....26
- Figura 4.** Densidade de casos e circuitos de leishmaniose tegumentar americana por município, Brasil – 2004 a 2006 e casos de 2007. Fonte: Sinan - SVS/MS (Extraído de: BRASIL, 2009).....27
- Figura 5.** Ciclo de vida de *Leishmania* sp. (Fonte: WHO/TDR, 2004b).....29
- Figura 6.** Fotomicrografia de diferentes estágios de desenvolvimento de *Leishmania* sp. (A) cultura de promastigotas de *Leishmania chagasi*. Coloração hematológica panótico rápido. Aumento: 1000x. (B) Fotomicrografia do aspirado de medula óssea humana. Macrófago infectado com formas amastigotas de *Leishmania* (seta). Coloração hematológica panótico rápido. AF: 1000x.....30
- Figura 7.** Fêmea de flebotomíneo (*Lutzomyia longipalpis*) durante o repasto sanguíneo (Fonte: <http://www.keele.ac.uk/research/istm/tripet.html>).....31
- Figura 8.** Estrutura química da iangambina.....40
- Figura 9.** Estrutura química do glicol de quitosana.....44
- Figura 10.** Isolamento da iangambina a parti das folhas de *Ocotea duckei* vattino.....49
- Figura 11.** Ensaio para atividade citotóxica sobre formas promastigotas de *Leishmania*.....52
- Figura 12.** Procedimento para coleta de macrófagos peritoneais de camundongos Suíços.....53
- Figura 13.** Ensaio de toxicidade com MTT sobre macrófagos murinos.....55

| | |
|---|----|
| Figura 14. Infecção de macrófagos murinos com <i>L. chagasi</i> | 58 |
| Figura 15. Semanalmente as patas foram medidas e determinado o tamanho da lesão (diferença entre a espessura da pata infectada e da não infectada)..... | 60 |
| Figura 16. Tratamento dos animais por via oral..... | 61 |
| Figura 17. Curvas de DSC das amostras de iangambina, quitosana e iangambina associada à quitosana sob fluxo de nitrogênio de 50mL.min ⁻¹ . Massa das amostras de aproximadamente 4,3mg, razão de aquecimento de 10°C min ⁻¹ , suporte de amostra de platina..... | 64 |
| Figura 18. Inibição de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> na presença de diferentes concentrações da iangambina obtida da <i>Ocotea duckei</i> . Os parasitos foram cultivados em meio Schneider a 25°C por 72 horas. O inóculo inicial foi de x10 ⁶ promastigotas/mL. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. (*P < 0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 no teste “t –Student”)..... | 66 |
| Figura 19. Inibição de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> na presença de diferentes concentrações da iangambina obtida da <i>Ocotea duckei</i> . Os parasitos foram cultivados em meio Schneider a 26°C por 72 horas. O inóculo inicial foi de x10 ⁶ promastigotas/mL. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. (*P < 0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 no teste “t –Student”)..... | 66 |
| Figura 20. Inibição de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> , na presença de diferentes concentrações da quitosana. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider a 26°C por 72 horas. O inoculo inicial foi de 1x10 ⁶ promastigotas/mL. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. (*P < 0.05 e ***p<0.001 no teste “t –Student”)..... | 67 |
| Figura 21. Inibição de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> , na presença de diferentes concentrações da quitosana. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider a 26°C por 72 horas. O inoculo inicial foi de 1x10 ⁶ promastigotas/mL. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. (*P < 0.05 e ***p<0.001 no teste “t –Student”)..... | 68 |
| Figura 22. Inibição de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> na presença de iangambina associada à quitosana. A concentração utilizada foi o IC ₅₀ da iangambina de 67,66 µg/mL encontrada para <i>L. amazonensis</i> e 2x esse valor para o complexo de quitosana. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider a 26°C por 72 horas. O inoculo inicial foi de 1x10 ⁶ promastigotas/mL. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. Teste “t –Student”..... | 69 |

Figura 23. Inibição de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* na presença de iangambina associada à quitosana. A concentração utilizada foi o IC₅₀ da iangambina de 22,53µg/mL encontrada para *L. chagasi* e 2x esse valor para o complexo de quitosana. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider a 26°C por 72 horas. O inoculo inicial foi de 1x10⁶ promastigotas/mL. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. Teste “t –Student”69

Figura 24. Efeito da iangambina na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos suíços avaliados com o corante azul de trypan. Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI na presença da lignana por 24h em estuda a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata (N=4).71

Figura 25. Efeito da iangambina na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos suíços avaliados pelo ensaio por MTT. Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI na presença da lignana por 24h em estuda a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata (n=4).....72

Figura 26. Efeito da langambina em células tubulares renais (MDCK) em ensaio com MTT. As células MDCK foram mantidas em meio RPMI na presença da lignana por 24h em estuda a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.....73

Figura 27. Efeito da langambina em células tubulares renais (MDCK) em ensaio com LDH (enzima lactato desidrogenase). As células MDCK foram mantidas em meio RPMI na presença da lignana por 24h em estuda a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata (n=4).....74

Figura 28. Efeito da quitosana na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos suíços avaliada após 24h de exposição, pelo corante azul de trypan. Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI na presença da lignana por 24h em estuda a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata (n=2). Teste “t –Student”75

Figura 29. Efeito da quitosana na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos suíços avaliada após 24h de exposição, pelo ensaio do MTT. Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI na presença da lignana por 24h em estuda a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata (n=2).....76

Figura 30. Efeito da quitosana na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos suíços avaliada após 48h de exposição, pelo ensaio de exclusão do corante azul de trypan. Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI na presença do carboidrato por 48h em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata (n=2). (*P < 0.05 no teste “t – Student”).....76

Figura 31. Efeito da quitosana na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos suíços avaliada após 48h de exposição, pelo ensaio do MTT. Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI na presença do carboidrato por 48h em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata (n=2). (*P < 0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 no teste “t – Student”).....77

Figura 32. Efeito do Glucantime na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos suíços avaliado após 24h de exposição pelo corante azul de trypan. Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI na presença da lignana por 24h em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata (n=4). (**p<0.001 no teste “t – Student”).....78

Figura 33. Redução da percentagem de macrófagos infectados na presença de iangambina em relação ao controle após 24h de incubação. Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. chagasi* na proporção 10 promastigotas por macrófago, e mantidos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). Teste “t – Student”.....79

Figura 34. Número de amastigotas por macrófagos infectados em cultura de macrófagos infectados com *L. chagasi* e incubados na presença de diferentes concentrações de iangambina por 24h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6).....80

Figura 35. Redução da percentagem de macrófagos infectados na presença de iangambina em relação ao controle após 48h de incubação. Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. chagasi* na proporção 10 promastigotas por macrófago, e mantidos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). (*P < 0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 no teste “t – Student”).....80

Figura 36. Número de amastigotas por macrófagos infectados em cultura de macrófagos infectados com *L. chagasi* e incubados na presença de diferentes concentrações de iangambina por 48h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6).....81

Figura 37. Redução da percentagem de macrófagos infectados na presença de iangambina em relação ao controle após 72h de incubação. Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. chagasi* na proporção 10 promastigotas por macrófago, e mantidos a 37^oC em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). (*P < 0.05, **p<0.01 e **p<0.001 no teste “t –Student”).....81

Figura 38. Número de amastigotas por macrófagos infectados em cultura de macrófagos infectados com *L. chagasi* e incubados na presença de diferentes concentrações de iangambina por 72h a 37^oC em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6).....82

Figura 39. Macrófagos infectados experimentalmente com formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (10:1) e incubados durante 72 horas a 37^oC em atmosfera de 5% CO₂. (A) Controle. (B) Presença da iangambina na concentração de 50µg/mL. (C) Presença da iangambina na concentração de 100µg/mL. (D) Presença da iangambina na concentração de 200µg/mL. (E) Presença do Glucantime na concentração de 100µg/mL. (F) Presença do Glucantime na concentração de 200µg/mL. As setas indicam as formas amastigotas internalizadas. AF = 1000x.....83

Figura 40. Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* na presença de diferentes concentrações da iangambina após 24h de incubação. As células foram cultivadas a 37^oC em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de três experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). A produção de NO foi mensurada utilizando reagente de Griess. (Teste “t –Student”).....85

Figura 41. Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* na presença de diferentes concentrações da iangambina após 48h de incubação. As células foram cultivadas a 37^oC em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de três experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). A produção de NO foi mensurada utilizando reagente de Griess. (*P < 0.05 no teste “t –Student”)....86

Figura 42. Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* na presença de diferentes concentrações da iangambina após 72h de incubação. As células foram cultivadas a 37^oC em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de três experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). A produção de NO foi mensurada utilizando reagente de Griess. (*P < 0.05 no teste “t –Student”)....86

Figura 43. Produção do fator de necrose tumoral α (TNF-α) por macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* na presença de diferentes concentrações da iangambina. As células foram cultivadas por 72h a 37^oC em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de três experimentos independentes realizados em duplicata (n=6).88

Figura 44. Redução da percentagem de macrófagos infectados e incubados na presença de quitosana em relação ao controle após 48h de exposição. Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. chagasi* na proporção 10 promastigotas por macrófago, e mantidos a 37⁰C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). (*P < 0.05 no teste “t – Student”).....89

Figura 45. Número de amastigotas por macrófagos infectados em cultura de macrófagos infectados com *L. chagasi* e incubados na presença de diferentes concentrações de quitosana por 48h a 37⁰C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6).....89

Figura 46. Redução da percentagem de macrófagos infectados e incubados na presença de quitosana em relação ao controle após 72h de exposição. Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. chagasi* na proporção 10 promastigotas por macrófago, e mantidos a 37⁰C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). (*P < 0.05 e *P < 0.01 no teste “t –Student”).....90

Figura 47. Número de amastigotas por macrófagos infectados em cultura de macrófagos infectados com *L. chagasi* e incubados na presença de diferentes concentrações de quitosana por 72h a 37⁰C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). (*P < 0.05 no teste “t –Student”).....90

Figura 48. Macrófagos infectados experimentalmente com formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (10:1) e incubados durante 72 horas a 37⁰C em atmosfera de 5% CO₂. (A) Controle. (B) Presença da quitosana na concentração de 25µg/mL. (C) Presença da quitosana na concentração de 50µg/mL. As setas indicam as formas amastigotas internalizadas. AF = 1000x.....91

Figura 49 - Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* na presença de diferentes concentrações de quitosana. As células foram cultivadas por 48h a 37⁰C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de três experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). (*P < 0.05 no teste “t –Student”).....93

Figura 50 - Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* na presença de diferentes concentrações de quitosana. As células foram cultivadas por 72h a 37⁰C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de três experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). (*P < 0.05 no teste “t –Student”).....94

Figura 51 – Produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α) por macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* na presença de diferentes concentrações da quitosana. As células foram cultivadas por 72h a 37^oC em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de três experimentos independentes realizados em duplicata (n=5).....95

Figura 52. Efeito da iangambina, iangambina associada à quitosana e quitosana na espessura da pata de camundongos infectados com 1x10⁶ promastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados via oral. A espessura da pata foi medida semanalmente. Dados representativos da média de oito animais por grupo. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com água destilada. (*P < 0.05 e **p<0.01 no teste “t –Student”).....97

Figura 53. Efeito da iangambina, iangambina associada à quitosana e quitosana sobre o peso dos camundongos infectados com 1x10⁶ promastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados via oral. O peso dos animais foi medido semanalmente. Dados representativos da média de oito animais por grupo. (Teste “t –Student”).....97

Figura 54. Efeito da iangambina, iangambina associada à quitosana e quitosana na carga parasitária da pata dos animais infectados com 1x10⁶ promastigotas de *L. amazonensis* e tratados via oral. Dados representativos da média de 5 animais por grupo. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com água destilada. (*P < 0.05 no teste “t – Student”).....98

Figura 55. Efeito da iangambina, iangambina associada à quitosana e quitosana na carga parasitária do linfonodo dos animais infectados com 1x10⁶ promastigotas *L. amazonensis* e tratados via oral. Dados representativos da média de 5 animais por grupo. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com água destilada. (*P < 0.05 no teste “t –Student”)...99

Figura 56. Efeito de diferentes doses da quitosana na espessura da pata de camundongos infectados com 1x10⁶ promastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados durante dez semanas. Espessura da pata foi medida semanalmente. Dados representativos da média de oito animais por grupo. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com água destilada. (*P < 0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 no teste “t –Student”).....102

Figura 57. Efeito de diferentes doses da quitosana sobre o peso dos animais infectados com 1x10⁶ promastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados durante dez semanas. O peso foi medido semanalmente. Dados representativos da média de oito animais por grupo. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com água destilada. (Teste “t –Student”).....102

Figura 58. Efeito de diferentes doses da quitosana na carga parasitária da pata de camundongos infectados com 1×10^6 promastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados via oral. Dados representativos da média de cinco animais por grupo. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com água destilada. (*P < 0.05 no teste “t –Student”).....103

Figura 59. Efeito de diferentes doses da quitosana na carga parasitária do linfonodo de camundongos infectados com 1×10^6 promastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados via oral. Dados representativos da média de cinco animais por grupo. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com água destilada. (*P < 0.05 no teste “t –Student”).....104

LISTA DE TABELA

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Resultados de DSC para a decomposição térmica das amostras de iangambina, quitosana e iangambina associada à quitosana em atmosfera de nitrogênio..... | 64 |
|---|----|

LISTA DE QUADRO

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Fármacos protótipos de categorias terapêuticas, a partir de plantas..... | 36 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP – trifosfato de adenosina (**a**denosine **t**ri**p**hosphate)
- CD4⁺ – linfócito T auxiliar dotado do receptor CD4.
- CEPA – Comitê de Ética em Pesquisa Animal
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DSC - Análise calorimétrica exploratória diferencial (DSC)
- IFN- γ – interferon gama
- IC₅₀ – Concentração inibitória de 50% do crescimento
- IL-4 – interleucina 4
- IL-10 – interleucina 10
- JP15 – Isolado de *Leishmania chagasi* (MCAN/BR/99/JP15)
- LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
- LV – Leishmaniose Visceral
- LC – Leishmaniose cutânea
- LMC – Leishmaniose mucocutânea
- LCD – Leishmaniose cutânea difusa
- LTF – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
- MDCK - Células Epiteliais de Rim Canino (Madin–Darby canine kidney)
- NO – óxido nítrico (**n**itric **o**xide)
- NNN – Meio sólido Novy, McNeal e Nicolle
- PBS – tampão fosfato salino (**p**hosphate **b**uffered **s**aline)
- PAF – Fator de agregação plaquetária
- PH8 – Isolado de *Leishmania amazonensis* (MHOM/IFLA/BR/67/PH8)
- SbIII – antimoniais trivalentes
- SbV – antimoniais pentavalentes
- SVS – Secretaria de vigilância sanitária
- TGF- β – Fator de transformação de crescimento
- Th1 – linfócito T auxiliar tipo 1
- Th2 – linfócito T auxiliar tipo 2
- TNF- α – fator de necrose tumoral α (**t**umour **n**ecrosis **f**actor α)
- WHO – Organização Mundial da Saúde (**W**orld **H**ealth **O**rganization)

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 24 |
| 1.1 Leishmanioses..... | 24 |
| 1.2. Potencialidades terapêuticas dos produtos naturais..... | 34 |
| 1.2.1 – Derivados de plantas com atividade antileishmania..... | 36 |
| 1.2.1.1. Potencialidades farmacológicas da iangambina..... | 39 |
| 1.2.2. Propriedades biológicas de complexos de quitosana..... | 41 |
| | |
| 2. OBJETIVOS..... | 46 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 46 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 46 |
| | |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 47 |
| 3.1. Parasitas e sua manutenção <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> | 47 |
| 3.2. Isolamento da iangambina a partir das folhas de <i>Ocotea duckei</i> Vattimo..... | 47 |
| 3.3. Complexo de Quitosana..... | 50 |
| 3.4. Avaliação calorimétrica exploratória diferencial (DSC) da associação iangambina e complexos de quitosana..... | 50 |
| 3.5. Preparo das soluções iangambina e quitosana para os ensaios biológicos..... | 50 |
| 3.6. Glucantime® (antimoniato de meglumina)..... | 51 |
| 3.7. Análise da atividade antileishmania sobre formas promastigotas de <i>Leishmania</i> | 51 |
| 3.8. Avaliação da toxicidade sobre células de mamíferos..... | 53 |
| 3.8.1. Avaliação da toxicidade sobre macrófagos murinos..... | 54 |
| 3.8.1.1. Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)..... | 54 |
| 3.8.1.2. Ensaio com o corante vital Azul de Trypan..... | 55 |
| 3.8.2. Avaliação da citotoxicidade sobre células renais de cães..... | 56 |
| 3.9. Infecção de macrófagos com promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> e tratados com os compostos em teste..... | 57 |
| 3.10. Dosagem de óxido nítrico..... | 58 |
| 3.11. Dosagem de TNF- α | 58 |

| | |
|--|----|
| 3.12. Avaliação da atividade antileishmania <i>in vivo</i> em modelos murinos infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> | 59 |
| 3.12.1. Tratamento dos animais..... | 60 |
| 3.12.2. Quantificação da carga parasitária..... | 61 |
| 3.13. Análise estatística..... | 62 |
| | |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 63 |
| 4.1. Análise da interação entre a iangambina e complexos de quitosana..... | 63 |
| 4.2. Atividade antileishmania sobre as formas promastigotas dos parasitos.... | 64 |
| 4.2.1. Efeito da lignana iangambina sobre o crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania chagasi</i> | 64 |
| 4.2.2. Efeito da quitosana sobre o crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania chagasi</i> | 67 |
| 4.2.3. Efeito da iangambina associada à quitosana sobre o crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania chagasi</i> | 68 |
| 4.3. Avaliação da citotoxicidade da iangambina sobre células de mamíferos..... | 70 |
| 4.3.1. Avaliação da citotoxicidade da iangambina sobre macrófagos murinos. | 70 |
| 4.3.2. Avaliação da citotoxicidade da iangambina sobre células renais de cães | 72 |
| 4.4. Avaliação da toxicidade da quitosana sobre macrófagos murinos..... | 74 |
| 4.5. Avaliação da citotoxicidade do Glucantime sobre macrófagos murinos.... | 77 |
| 4.6. Modulação da infecção de macrófagos murinos com promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> | 78 |
| 4.6.1. Efeito da lignana iangambina sobre a infecção de macrófagos infectados com promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> | 78 |
| 4.6.1.1. Avaliação da produção de óxido nítrico na presença da iangambina.. | 85 |
| 4.6.1.2. Avaliação da produção do fator de necrose tumoral α na presença da iangambina..... | 87 |
| 4.6.2. Efeito de complexos de quitosana sobre a infecção de macrófagos infectados com promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> | 88 |
| 4.6.2.1. Avaliação da produção de NO na presença de quitosana..... | 92 |
| 4.6.2.2. Avaliação da produção de TNF- α na presença de complexos de quitosana..... | 94 |
| 4.7. Avaliação da atividade antileishmania em camundongos suíços infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> | 95 |

| | |
|--|-----|
| 4.7.1. Atividade da iangambina e complexos de quitosana no tratamento dos animais..... | 95 |
| 4.7. 2. Avaliação de complexos de quitosana no tratamento dos animais..... | 100 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 105 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 106 |
| ANEXO..... | 118 |
| Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Animal..... | 119 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

Leishmanioses são enfermidades causadas por parasitas protozoários do gênero *Leishmania*, encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo endêmicas em 88 países ameaçando 350 milhões de pessoas. É estimado que 14 milhões de pessoas estejam infectados e cerca de 2 milhões de novos casos ocorrem anualmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

As formas clínicas de leishmaniose são variáveis e dependem da associação entre as características de virulência da espécie de *Leishmania* infectante e da resposta imunológica do hospedeiro (PEARSON & SOUZA, 1996). Considerando o quadro clínico, as leishmanioses são classificadas em quatro formas básicas: cutânea simples, cutânea difusa, mucocutânea e visceral (Figura 1), variando, portanto desde lesões simples na pele, comumente de cura espontânea, às lesões mutilantes com destruição nasobuco-faringeana e lesões nas vísceras, podendo em muitos casos ser fatal.

As leishmanioses apresentam incidência importante e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados, crianças desnutridas e pessoas com HIV. Tem ampla distribuição ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas (Figura 2). Na América Latina, a leishmaniose visceral (LV) já foi descrita em 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na região Nordeste (BRASIL, 2006). Mais de 3000 novos casos de leishmaniose visceral americana (LVA) são notificados todo ano em cerca de 20 estados brasileiros (BRASIL, 2008) (Figura 3). O nordeste representa 70-90% da população parasitada, especialmente Bahia, Ceará, Piauí, e Maranhão, apresentando prevalência de 25 casos/100 mil habitantes. A leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil no período de 1985 a 2003 vem apresentando coeficientes de detecção que oscilam entre 10,45 a 21,23 por 100 mil habitantes (Figura 4). A região Nordeste vem contribuindo com o maior número de casos (cerca de 37,2% do total registrado no período) e a região Norte com os coeficientes mais elevados (93,84 por 100 mil

habitantes), seguidas pela região Centro-Oeste (42,70 por 100 mil habitantes) (BRASIL, 2007).

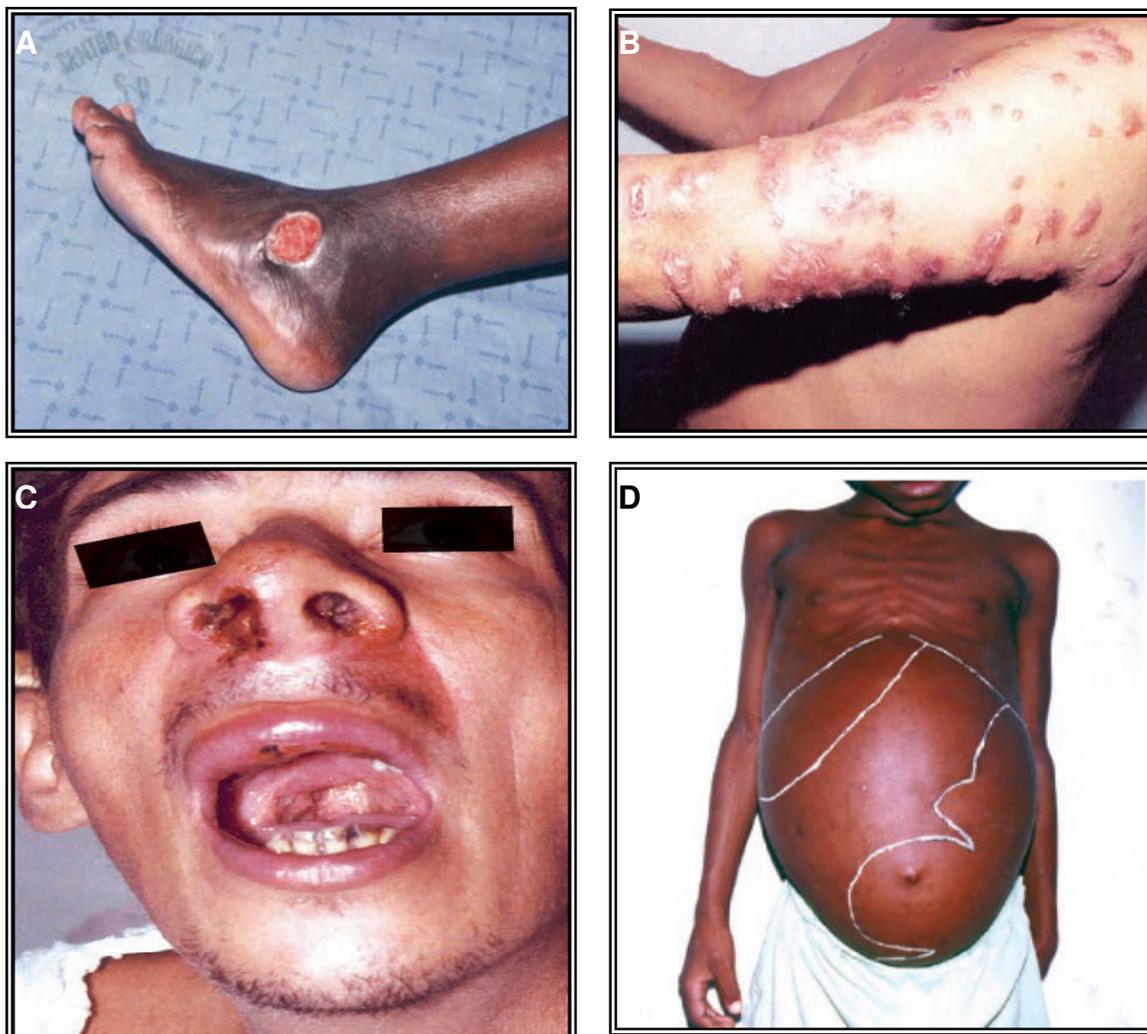


Figura 1 – Manifestações clínicas das leishmanioses. (A) leishmaniose cutânea simples, caracterizada por lesão única de borda elevada e fundo granulomatoso na região maleolar externa; (B) leishmaniose cutânea difusa, apresentando lesões pápulo-nodulosas com descamação e algumas crostas; (C) leishmaniose mucocutânea, apresentando destruição parcial da região nasolabial; (D) leishmaniose visceral no período final, caracterizada pela intensa desnutrição e hepatoesplenomegalia (Fonte: BRASIL, 2007a; BRASIL, 2006).

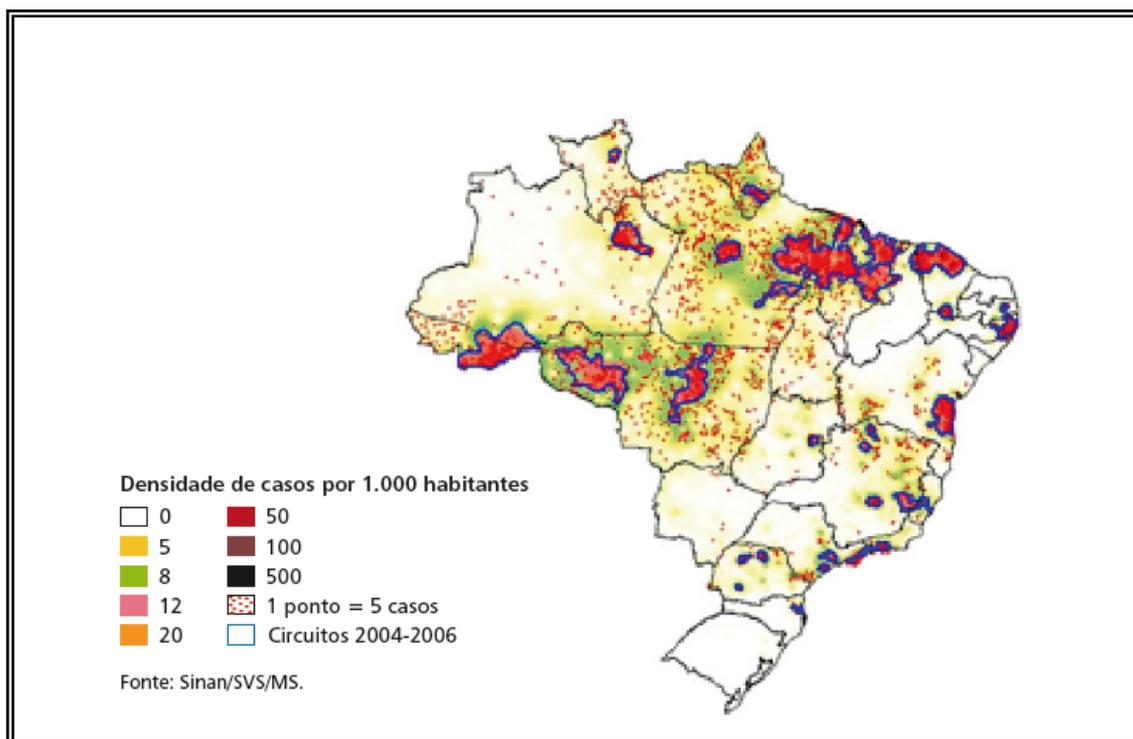


Figura 4 – Densidade de casos e circuitos de leishmaniose tegumentar americana por município, Brasil – 2004 a 2006 e casos de 2007. Fonte: Sinan - SVS/MS (Extraído de: BRASIL, 2009).

Os parasitas causadores da leishmaniose são protozoários do gênero *Leishmania* representando um grupo com várias espécies pertencentes à ordem *Kinetoplastida* e a família *Trypanosomatidae*. Este gênero pode ser dividido em dois subgêneros, *Leishmania* (*Leishmania*) spp., e *Leishmania* (*Viannia*) spp. Lainson e Shaw (1987) propuseram essa divisão de acordo com observações do desenvolvimento dos parasitos no interior do inseto vetor. Este processo de diferenciação ocorre na porção anterior, média e posterior do tubo digestivo do flebótomo, nos parasitas pertencentes ao subgênero *Viannia* e nas porções anterior e média naqueles agrupados no subgênero *Leishmania*.

No subgênero *Viannia* são encontradas as espécies do complexo *brasiliensis*, como por exemplo, *Leishmania* (V.) *guyanensis*, *Leishmania* (V.) *brasiliensis* e *Leishmania* (V.) *panamensis*. No subgênero *Leishmania* encontram-se as espécies do complexo *donovani*, como por exemplo *Leishmania* (L.) *donovani* e *Leishmania* (L.) *chagasi*, e do complexo *mexicana* que incluem as espécies como a *L. (L.) amazonensis*, e *L. (L.) mexicana*.

No Brasil, a espécie *L. amazonensis* tem sido associada a todas as formas clínicas de leishmanioses em humanos (BARRAL et al., 1991; LEON et al., 1992), sendo a de maior gravidade a cutânea difusa, uma doença caracterizada por uma deficiência da resposta imune celular nos pacientes infectados (CONVIT et al., 1972). A forma sintomática da leishmaniose visceral no Brasil tem como agente etiológico principal a espécie *L. chagasi* e é caracterizada por uma deficiente resposta imune celular associada a uma significativa produção de anticorpos (PERSON et al., 1996).

Os protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* são transmitidos ao homem por fêmeas de insetos flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). Esses protozoários são organismos unicelulares que apresentam um ciclo de vida heteroxênico (Figura 5). Estes parasitas apresentam-se sob duas formas evolutivas básicas: as promastigotas e as amastigotas (Figura 6). As formas promastigotas são formas alongadas em cuja região anterior emerge um flagelo livre, com tamanho aproximado entre 14 e 20 μ m, encontradas no trato digestivo dos insetos vetores e as formas amastigotas são parasitos intracelulares obrigatórios ovóides ou esféricos, com flagelo curto que não se exterioriza, medindo entre 2,1 e 3,2 μ m, encontradas nas células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) (BATES, 1994; SCHLEIN, 1993).

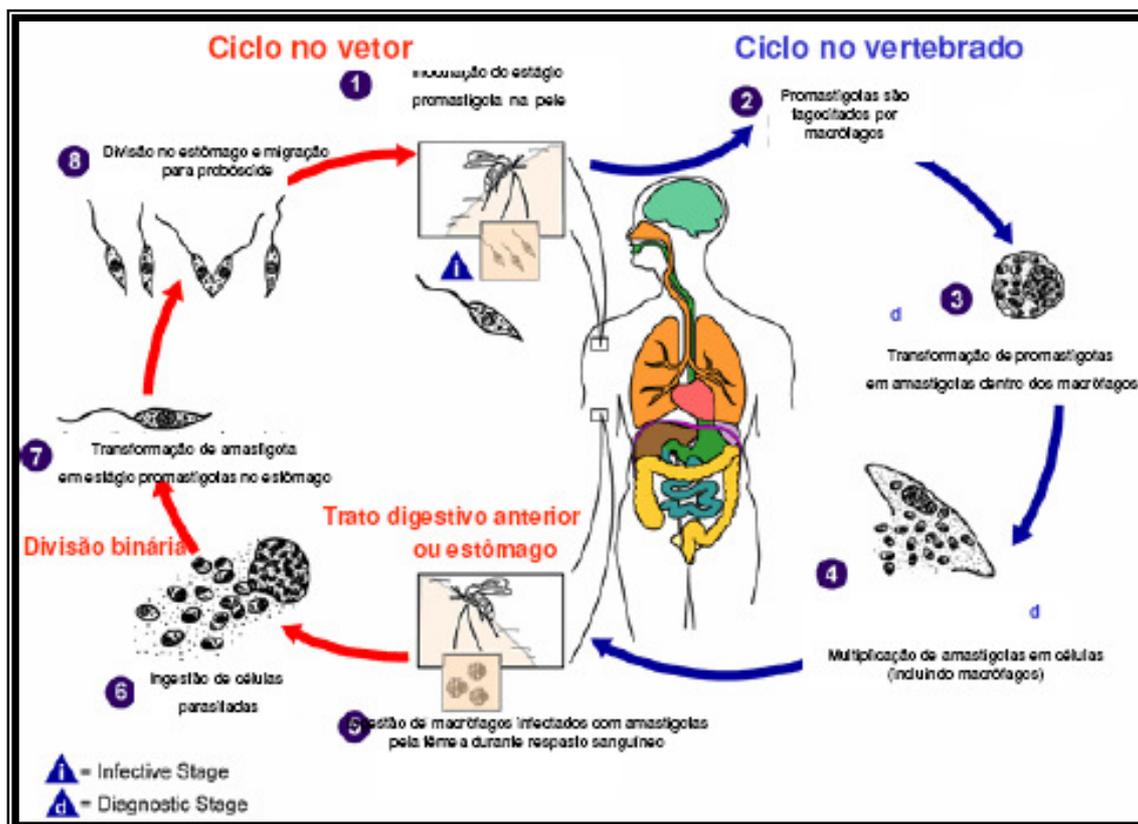


Figura 5 – Ciclo de vida de *Leishmania* sp. (Fonte: WHO/TDR, 2004b).

A multiplicação das leishmanias nos seus hospedeiros ocorre por fissão binária, não tendo sido descrito nenhum ciclo sexual. Uma vez a forma promastigota inoculada na pele do hospedeiro mamífero pela picada do inseto vetor (Figura 7), e usando um processo que envolve o reconhecimento de componentes da superfície celular, essa forma é fagocitada pelo macrófago e induz a formação de vacúolos citoplasmáticos denominados fagolisossomos (RUSSEL, 1995). No interior dos fagolisossomos, as promastigotas diferenciam-se em amastigotas e multiplicam por divisão binária. Quando a célula do hospedeiro está densamente parasitada, há o rompimento de sua membrana e amastigotas disseminam-se pelo tecido, infectando novos macrófagos, exacerbando assim, o quadro da infecção.

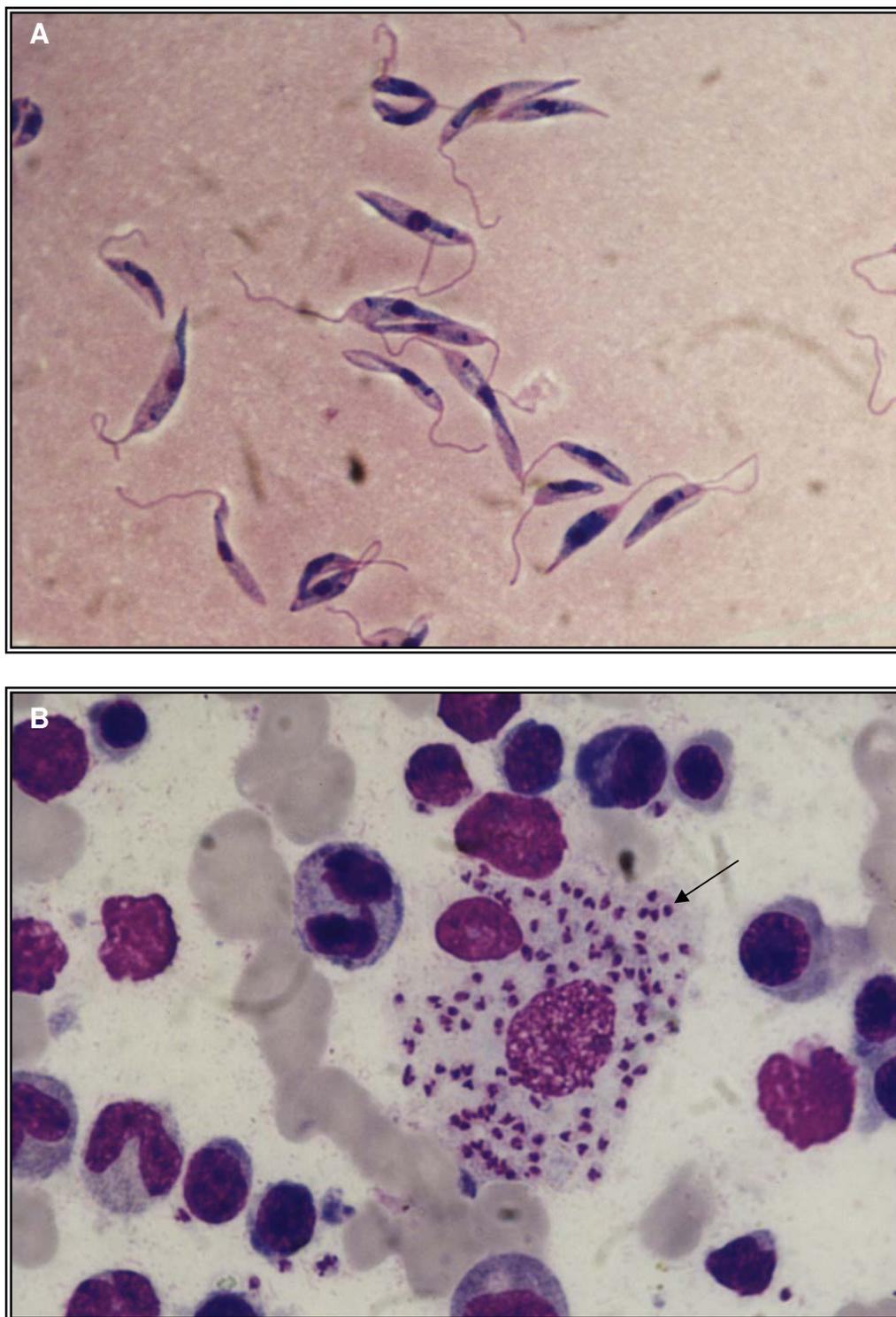


Figura 6 – Fotomicrografia de diferentes estágios de desenvolvimento de *Leishmania* sp. (A) cultura de promastigotas de *Leishmania chagasi*. Coloração hematológica panótico rápido. Aumento: 1000x. (B) Fotomicrografia do aspirado de medula óssea humana. Macrófago infectado com formas amastigotas de *Leishmania* (seta). Coloração hematológica panótico rápido. AF: 1000x.

No mamífero hospedeiro, o estilo de vida da *Leishmania* faz desta um patógeno intracelular obrigatório infectando células hematopoiéticas da

linhagem monócitos/macrófagos, os quais entram por fagocitose. A *Leishmania* tem uma gama de mecanismos sofisticados para subverter a função normal dos macrófagos. Estes incluem prevenção da ativação de agentes microbianos letais tais como o óxido nítrico (NO) e também inibição de citocinas induzidas por macrófagos necessárias para função de desenvolvimento de uma resposta imune efetiva (OLIVIER et al., 2005).



Figura 7 – Fêmea de flebotomíneo (*Lutzomyia longipalpis*) durante o repasto sangüíneo (Fonte: <http://www.keele.ac.uk/research/istm/tripet.html>).

A importância da resposta celular no controle da leishmaniose tem sido demonstrada na literatura ao longo dos últimos anos. Em experimentos com modelos murinos de leishmaniose tegumentar, pode-se observar que os linfócitos T auxiliares (Th) CD4⁺ estão subdivididos em duas subpopulações funcionalmente diferentes no que se refere à secreção de citocinas, diretamente correlacionadas com a resistência ou a susceptibilidade à infecção por *Leishmania*: o subtipo Th1, que secreta principalmente interleucina (IL-2) e interferon gama (IFN- γ); e o subtipo Th2, secretor de interleucina (IL-4), interleucina (IL-5) e interleucina (IL-10) (WILSON et al., 2005). Vários fatores têm sido implicados na diferenciação da célula T CD4⁺ em Th1 ou Th2, como

o tipo de célula apresentadora de antígeno, os níveis de citocinas endógenas e a natureza do antígeno reconhecido.

O IFN- γ secretado por linfócitos Th1, tem papel importante na defesa contra microrganismos intracelulares como a *Leishmania*, ativando macrófagos e estimulando a liberação de outras citocinas como fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α), que estimula os macrófagos a matarem parasitas intracelulares. Liew e colaboradores (1990) observaram que a atividade antileishmania do TNF- α é diretamente correlacionada com a produção de NO, em modelos murinos de infecção com *Leishmania major*. Murray e colaboradores (2000) verificaram em estudos de infecção com *Leishmania donovani* em modelos murinos, que o TNF- α endógeno é requerido inicialmente para controlar a infecção. Além disto, medeia uma ótima resposta inicial para o tratamento da infecção com os quimioterápicos derivados do antimônio e previne uma recaída depois de um tratamento efetivo com anfoterecina B em camundongos.

Estudos feitos por Padigel e colaboradores (2003), demonstraram a função crítica da IL-10 na suscetibilidade e patogênese para leishmaniose cutânea causadas por espécies de *Leishmania mexicana* e *Leishmania amazonensis* em animais Balb/c. Eles verificaram que camundongos deficientes em IL-10 tiveram baixos níveis de infecção com aumento na produção de IFN- γ e NO. Esses resultados foram mais eficazes quando neutralizaram IL-4, mostrando uma regulação significativa no desenvolvimento de uma resposta protetora Th-1. Portanto, a resolução efetiva da infecção com esses parasitas requer a neutralização de ambas as IL-4 e IL-10.

A infecção experimental de camundongos com *Leishmania* tem sido realizada com o intuito de reproduzir as diferentes formas clínicas encontradas em humanos e pesquisar novas drogas para o tratamento das leishmanioses. Camundongos Balb/c quando infectados com *L. amazonensis* desenvolvem uma doença severa e disseminada, resultando na morte dos animais (POMPEU et al., 1992). Por outro lado, estes mesmos camundongos quando infectados com *L. chagasi* (WILSON et al., 2005) apresentam uma lesão incipiente, muito diferente da infecção por *L. amazonensis*, sugerindo a presença de diferentes fatores de virulência nestas diferentes espécies de *Leishmania* (MCMAHON-PRAT e ALEXANDER, 2004).

A primeira linha de drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (Sbv): antimoniato de n-metil-glucamina (Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) (CARRIÓ et al.; 2000), sendo que destes o mais utilizado no Brasil é o Glucantime[®]. Estes fármacos, apesar de serem altamente tóxicos, têm sido utilizados por mais de 50 anos no tratamento das leishmanioses humanas nos diversos países em que a doença é encontrada.

O mecanismo de ação dessas drogas antimoniais pentavalentes não é bem conhecido. Sabe-se que os SbV são convertidos no interior do macrófago em formas trivalentes (SbIII), mais tóxicas, e que a depleção intracelular dos níveis de ATP devido a interferência na glicólise e β -oxidação nos ácidos graxos em amastigotas é um provável modo de ação dessas drogas de escolha no tratamento de diferentes espécies de parasitas de *Leishmania* (VAN-VOORHIS, 1990).

Muitos pacientes não respondem bem ao tratamento com derivados antimoniais. Este fato tem sido atribuído a uma maior susceptibilidade do hospedeiro aos efeitos colaterais do medicamento e/ou à resistência da linhagem do parasita. Estas dificuldades implicam em tratamentos alternativos como a administração do antifúngico anfotericina B (MBONGO et al., 1998) e a pentamidina (THAKUR et al., 1991, apud REGUERA et al., 1998) na forma injetável as quais apresentam bons resultados no tratamento das leishmanioses especialmente nos casos de reincidência. A anfotericina B é um agente antiparasítico muito potente, porém só deve ser administrado quando o tratamento de primeira linha não surte efeito, pois é um medicamento altamente tóxico, particularmente nefrotóxico além de apresentar outros efeitos colaterais (SUNDAR et al., 2001).

Mais recentemente, a Miltefosina, um medicamento inicialmente desenvolvido para o tratamento de tumores, demonstrou-se eficaz no tratamento com administração por via oral contra *L. donovani*, e está em fase IV de estudo na Índia. No entanto, já há relatos de resistência (CROFT et al., 2006).

Pelo exposto acima, os medicamentos hoje disponíveis para o tratamento das leishmanioses apresentam uma série de efeitos colaterais além de uma eficácia duvidosa. Percebe-se, portanto a necessidade urgente para

pesquisar por novas drogas alternativas que sejam mais efetivas contra o parasita, aliada a uma baixa toxicidade para o paciente (hospedeiro vertebrado).

Considerando também que as leishmanioses ocorrem principalmente em países subdesenvolvidos, atingindo principalmente uma população economicamente carente, o desenvolvimento de novos medicamentos é pouco atraente para as indústrias farmacêuticas.

Assim, é necessário que a busca por novas drogas para as leishmanioses seja uma das prioridades de pesquisa nos países atingidos por estas enfermidades.

1.2. Potencialidades terapêuticas dos produtos naturais

Os produtos naturais, tais como plantas, animais, micróbios, minerais e mais recentemente organismos marinhos, têm sido a mais bem sucedida fonte de novas drogas. Historicamente, a mais importante fonte natural têm sido as plantas. A pesquisa utilizando plantas medicinais tem avançado em duas linhas principais: etnofarmacologia e toxicologia. Estas estratégias têm produzido muitas substâncias valiosas e provavelmente ainda produzirão muitas outras (TULP & BOHLIN, 2004).

A utilização de plantas como fonte de agentes terapêuticos baseia-se em: i) isolar compostos bioativos para uso direto como droga, por exemplo, digoxina, digitoxina, morfina, reserpina, taxol, vimblastina, vincristina; ii) produzir compostos bioativos a partir de estrutura nova ou conhecida como protótipo para semi-síntese na produção de entidades patenteáveis com alta atividade e/ou baixa toxicidade. Como exemplos, podem-se citar as drogas: metformina, nabilona, oxicodona, taxotere, teniposídeo, verapamil, amiodarona, cujas estruturas foram baseadas em galegina, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, morfina, taxol, pofilotoxina, khellina; respectivamente; iii) utilizar como ferramentas farmacológicas, por exemplo, dietilamina do ácido lisérgico, mescalina, ioimbina e, iv) utilizar toda a planta ou parte desta como fitoterápico, por exemplo, equinácea, alho, ginkgo biloba, erva de São João (FABRICANT & FARNSWORTH, 2001).

O Brasil abriga 55 mil espécies de plantas, aproximadamente um quarto de todas as espécies conhecidas. Destas, 10 mil podem ser medicinais, aromáticas e úteis, sendo que um percentual muito pequeno destas já foi estudado do ponto de vista químico-farmacológico. Como conseqüências, podem-se esperar potenciais descobertas de novos produtos naturais biologicamente ativos nas florestas tropicais. Com este número de espécies, não é surpresa o descobrimento de plantas ricas em produtos bioativos, que podem ter aplicação direta em medicina ou servirem de modelos para a síntese de novos medicamentos (IBD, 2009).

Ao se considerar as perspectivas de obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos naturais dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que, apesar dos avanços consideráveis, ainda é limitada (NISBET & MOORE, 1997)

A descoberta de novos fármacos, ou de fármacos acessíveis, pode determinar a melhoria da qualidade de vida em doenças crônicas ou a própria sobrevivência do paciente afetado. Socialmente, a descoberta de fontes naturais de compostos químicos usualmente importados e/ou o desenvolvimento de fitoterápicos de fabricação nacional, podem ter conseqüências econômicas significativas, além de possibilitar a autonomia de cada país no gerenciamento de suas políticas de saúde (ELIZABETSKY, 2001).

A importância histórica das substâncias ativas obtidas de plantas como protótipo para o desenvolvimento de fármacos pode ser demonstrado no Quadro 1. A descoberta da atividade dessas substâncias não representou apenas o surgimento de um grupo novo de substâncias, mas originou a identificação de uma nova possibilidade de intervenção terapêutica. Por exemplo, não se conhecia anestésicos locais, bloqueadores musculares, anticolinérgicos, entre outras categorias terapêuticas, antes do isolamento e estudo da atividade da cocaína, tubocurarina e atropina respectivamente. A terapêutica atual seria muito deficiente, não tivesse ocorrido à descoberta dessas substâncias ativas (ROCHA e SILVA, 1973)

QUADRO 1 – Fármacos protótipos de categorias terapêuticas, a partir de plantas

| Gênero | Fármaco | Data do isolamento | Categoria Terapêutica |
|-----------------------|--------------|--------------------|--------------------------|
| <i>Digitalis</i> | digitoxina | 1785-1875 | Cardiotônico |
| <i>Papaver</i> | morfina | 1805 | Hipnoanalgésico |
| <i>Cinchona</i> | quinina | 1820 | Antimalárico |
| <i>Atropa</i> | atropina | 1833 | Anticolinérgico |
| <i>Physostigmina</i> | fisostigmina | 1864 | Anticolinesterásico |
| <i>Pilocarpus</i> | pilocarpina | 1875 | Colinérgico |
| <i>Ephedra</i> | efedrina | 1887 | Adrenérgico |
| <i>Erythroxylon</i> | cocaína | 1895 | anestésico local |
| <i>Chondrodendrum</i> | tubocurarina | 1895 | Bloqueador neuromuscular |
| <i>Claviceps</i> | ergotamina | 1922 | Bloqueador adrenérgico |
| <i>Melilotus</i> | dicumarol | 1941 | Anticoagulante |
| <i>Rauvolfia</i> | reserpina | 1952 | Neuroléptico |

Fonte: Schenkel et al., 2003

Tendo em vista que o Brasil conta com uma das maiores riquezas em biodiversidade do planeta, tendo nos vegetais uma fonte sustentável para a busca de novas moléculas bioativas, este é um campo de pesquisa bastante promissor a ser explorado.

1.2.1 – Derivados de plantas com atividade antileishmania

Na medicina tradicional, o tratamento de leishmanioses usualmente consiste da administração oral de extratos brutos de plantas na forma sistêmica da doença e como preparações tópicas correspondendo a extratos para o tratamento de infecções da pele (Chan-Bacab & Peña-Rodríguez, 2001).

Muitos dos estudos direcionados a detecção de alvos de metabólicos secundários de plantas medicinais com atividade leishmanicida, tem utilizado formas promastigotas do parasita devido ser mais fácil os manter nas condições *in vitro*. Porém, as formas promastigotas não são as formas infectantes do parasita em hospedeiros vertebrados, devido a isso avaliações com promastigotas têm somente valores indicativos da possível atividade leishmanicida do metabólito testado. Como resultado, estudos preliminares usando promastigotas têm sido complementados com avaliações utilizando amastigotas intracelulares em macrófagos. Ao mesmo tempo, uma avaliação da possível citotoxicidade do metabólito pode ser feita utilizando macrófagos não infectados. Isto para estabelecer se à atividade *in vitro* do metabólito é devido a sua atividade citotóxica geral ou se possui uma atividade seletiva contra o parasita de *Leishmania* (SAUVAIN et al, 1993)

Extratos de própolis coletadas no Brasil e Bulgária foram analisados contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. major*. Considerando as diferenças químicas entre as amostras dos extratos e o comportamento dos parasitas, foi observado diferenças na atividade leishmanicida com IC₅₀ entre 2,8 a 229,3 µg/mL. As análises mostram que para todas as espécies avaliadas, os extratos da Bulgária foram mais ativos do que os extratos do Brasil (MACHADO et al, 2007).

O extrato de *Galipea longiflora*, conhecida popularmente como Evanta, cujo extrato é rico em alcalóides, é uma planta usada tradicionalmente como agente antileishmania na Bolívia, inibiu a proliferação celular dos parasitas de *Leishmania braziliensis* e estimulou a produção de IFN-γ em células policlonais ativadas (CALLA-MAGARINOS et al, 2009).

Jaramilo e colaboradores (2000) estudaram a atividade antileishmania de extratos do pericarpo de *Annona muricata*, e verificaram que o extrato de acetato de etila bruto foi mais ativo do que o Glucantime contra promastigotas de *L. braziliensis* e *L. panamensis*.

Nakamura e colaboradores (2006) pesquisaram a atividade biológica do extrato bruto e de várias frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* Yunck sobre formas promastigotas da espécie de *Leishmania amazonensis*. Os resultados do presente trabalho demonstram que o extrato e frações obtidas de folhas de *P. regnellii* var *pallescens* apresentam atividade antipromastigota.

A atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico de *Stachytarpheta cayennensis*, espécie utilizada popularmente no tratamento de lesões cutâneas causadas por *Leishmania* sp, foi testado em ensaios *in vitro* utilizando formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *L. amazonensis*. O extrato apresentou efeito leishmanicida dose e espécie-dependente para promastigotas de *Leishmania* sendo mais eficaz para *L. braziliensis* (MOREIRA et al., 2007).

Neto e colaboradores (2004) estudaram o extrato bruto hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata* utilizando três diferentes concentrações (1, 10 e 50 mg/ml) contra formas promastigotas de *L. braziliensis* *in vitro*. Sendo observado que o extrato apresentou atividade antileishmania.

Além dos extratos de plantas, compostos purificados têm sido testados com relação à atividade antileishmania. Muitos dos metabólitos obtidos de plantas utilizadas no tratamento de doenças causadas por protozoários incluem, entre outros, quinonas, alcalóides, terpenóides e flavonóides (CHAN-BACAB; PEÑARODRIGUEZ, 2001).

Kedzierski e colaboradores (2007) estudaram o resveratrol, um tipo de composto fenólico, e análogos hidroxilados contra promastigotas e amastigotas de *L. major*. O resveratrol mostrou atividade antileishmania contra promastigotas *in vitro*, e mais importante, foi efetivo contra amastigotas intracelular. Os estilbenos hidroxilados neste estudo também mostraram atividade antileishmania contra promastigotas.

O espintanol, um monoterpene purificado de *Oxandra spinata* (Annonaceae), apresentou atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (HOCQUEMILLER et al., 1991).

Barata e colaboradores (2000) mostraram que uma neolignana obtida da *Virola pavonis* (Myristicaceae) e análogos sintéticos apresentaram atividade leishmanicida sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani*. Outros ensaios, utilizando nove neolignanas sintéticas, evidenciaram atividade antileishmania em macrófagos infectados, *in vitro*, com *L. donovani* (COSTA, 1998). Estudos realizados com derivados de lignanas diidrobzofurânicas apresentaram resultados mostrando atividade antiparasitária sobre os parasitas *Plasmodium falciparum* (IC₅₀ 0,43µg/mL) e

formas amastigotas axenicas de *L. donovani* (IC₅₀ 0,12µg/mL) (VAN et al., 2005).

Gamboa-León e colaboradores (2007) estudando extratos de alho verificaram redução das lesões da pata de animais BALB/c infectados com *L. mexicana* induzindo a produção de IFN-γ produzido por células T. *In vitro*, o extrato do alho reduziu a infecção de macrófagos através da indução da produção de NO. O extrato do alho pode atuar em ambas as células T e macrófagos para estimular a produção de IFN-γ e a síntese de NO, respectivamente, matando assim os parasitas.

Chen e colaboradores (1994), estudando a atividade antileishmania de licochalcona A, um tipo de flavonóide, em animais infectados com *L. major* e hamsters infectados com *L. donovani*, verificaram no presente trabalho o potencial da licochalcona A para o controle de infecções de *Leishmania in vivo*. Os resultados mostram que licochalcona A preveniu o desenvolvimento das lesões em animais infectados com *L. major* e inibiu o crescimento de parasitas de *L. donovani* em hamsters.

1.2.1.1. Potencialidades farmacológicas da iangambina

A iangambina, uma lignana furofurânica isolada das folhas da *Ocotea duckei* (Lauraceae) (MORAIS et al., 1999), constitui o maior constituinte da fração total de lignóides isoladas desse material (MORAIS et al., 1999; BARBOSA-FILHO et al., 1999).

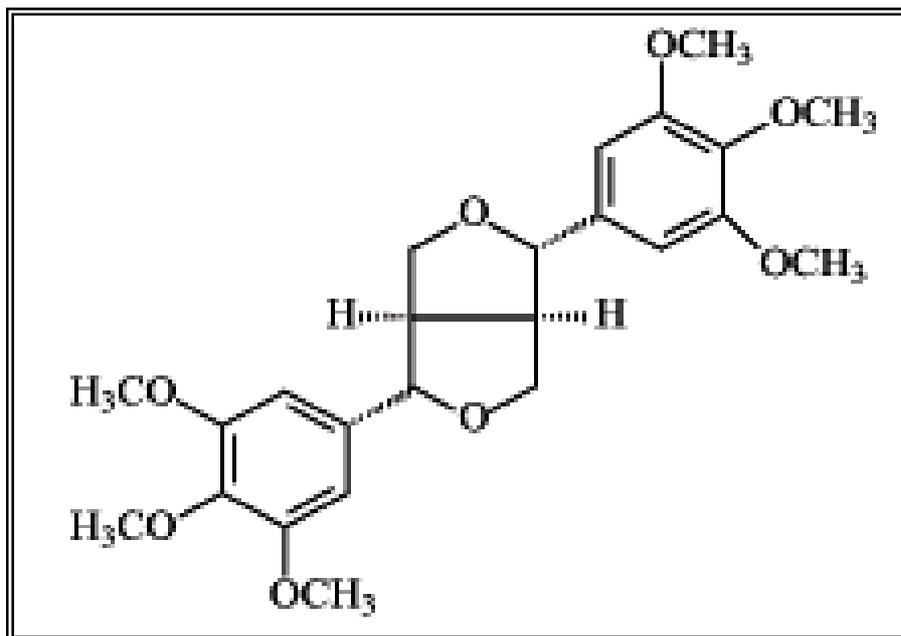


Figura 8- Estrutura química da iangambina

Várias atividades biológicas têm sido atribuídas a essa substância, dentre elas: propriedade antialérgica (SERRA et al., 1997); possível atividade analgésica (ALMEIDA et al., 1995); aumento do tempo de sono induzido por pentobarbital e pode atuar como um depressor do sistema nervoso central, anticonvulsivante e sedativo-hipnótico (PACHÚ, 1993); efeito farmacológico contra colapso cardiovascular e mortalidade devido ao choque por endotoxinas (ARAÚJO et al., 2001); apresenta atividade antitumoral em celular coloretais induzindo apoptose (HAUSSOT et al., 2003).

Faria Neto e colaboradores (1995a e 1995b) evidenciaram atividade anti-PAF (Fator de Agregação Plaquetária) da iangambina em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Estudos farmacológicos feitos por Herbert e colaboradores (1997) observaram que existem dois subtipos diferentes de receptores de PAF em plaquetas e leucócitos, estudos esses realizados com a iangambina. O trabalho mostra que a iangambina é um antagonista seletivo para o receptor de PAF em plaquetas, e esta lignana falhou em inibir o PAF em PMNs humanos.

Ensaio de mutagenicidade mostraram que a iangambina não apresenta potencial mutagênico em estudos realizados com linhagens de *Salmonella typhimurium* (MARQUES et al., 2003).

Em estudos farmacológicos realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB), revelaram que esta lignana, não apresentou efeito tóxico agudo em camundongos quando administrada por via intraperitoneal em dose de até 1g/kg (PACHÚ et al., 1993). Adicionalmente foi demonstrado uma toxicidade baixa da iangambina para macrófagos murinos e células embrionárias de Ouriço do Mar (MONTE NETO et al., 2008), o que é bastante interessante tendo em vista as atividades farmacológicas supracitadas.

Trabalhos recentes realizados *in vitro* por Monte Neto e colaboradores (2007) com parasitas das espécies de *Leishmania chagasi* e *L. amazonensis* mostraram que a iangambina apresenta uma significativa atividade antipromastigota gerando valores de IC₅₀ 49 µg/mL e 64,9 µg/mL, respectivamente. Entretanto o tratamento via intralesional e intraperitoneal de camundongos experimentalmente infectados na pata com *Leishmania amazonensis*, não surtiu nenhum efeito no tamanho da lesão (MONTE NETO, 2007).

Considerando a atividade antileishmania da iangambina *in vitro*, aliada a baixa toxicidade para células de mamíferos, é oportuno ampliar os estudos sobre a potencialidade desta lignana na terapêutica das leishmanioses, estudando outras vias de tratamento.

1.2.2. Propriedades biológicas de complexos de quitosana

Quitina, o qual é o mais abundante biopolímero na natureza após a celulose, é um polissacarídeo mundialmente distribuído na natureza como o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos como também de células de algumas bactérias e fungos. A quitosana é um polímero particular desacetilado da glicosamina obtida após desacetilação alcalina da quitina (SENEL & MCCLURE, 2004).

O termo quitosana é utilizado para descrever uma série de polímeros de quitosana com diferentes pesos moleculares (50kDa – 2000kDa), viscosidade (1% de quitosana e 1% de ácido acético) e grau de desacetilação (40%-98%) (ILLUM, 1998). Quitosana é insolúvel em pH alcalino e neutro, mas forma sais

solúveis em água com ácidos inorgânicos e orgânicos incluindo ácidos glutamato, hidrocloreídrico, láctico e acético. Após dissolução, os grupos aminos do polímero são protonados e o resultado é um polissacarídeo solúvel e positivamente carregado (ILLUM, 1998; SENEL & MCCLURE, 2004). Sais de quitosana são solúveis em água, sendo a solubilidade dependente do grau de desacetilação e do pH (ILLUM, 1998).

Quitosana apresenta uma variedade de propriedades biológicas e físico-químicas, dessa forma esta vem sendo utilizada para numerosas aplicações em vários campos tais como tratamento de água, agricultura, industrial e têxtil, cosméticos, suplementação nutricional, e processamento de alimentos (SENEL & MCCLURE, 2004). Além disso, apresenta baixa toxicidade e alergenicidade, sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade tornam essa substância atrativa para diversas aplicações como no campo de biomateriais farmacêuticos e medicinais (ILLUM, 1998).

Na área farmacêutica tem sido estudada como matriz polimérica, especialmente na forma de microesferas, para liberação controlada de fármacos. O sucesso das microesferas de quitosana como carreadoras deve-se a vários fatores, tais como: capacidade de dissolver fármacos pouco solúveis, incrementando sua disponibilidade; permanência no sangue por longo tempo, promovendo, deste modo, acumulação gradual na região requerida e tamanho que permite seu acúmulo em região pouco vascularizada. Além de ser facilmente produzida em grandes quantidades (STULZER, 2008).

A variedade de grupos os quais podem ser atacados por quitosana é ilimitada, e sítios do grupo podem ser escolhidos para funcionalidade específica, alterar propriedades biológicas ou modificar propriedades físicas. Uma variedade de colóides baseados em quitosana de liberação sistêmica tem sido descrita na literatura para liberação de drogas polares, peptídeos, proteínas, vacinas e DNA (SENEL & MCCLURE, 2004).

Os ésteres de quitosana, tais como o succinato de quitosana e o ftalato de quitosana foram usados com sucesso como matrizes para a liberação oral do diclofenaco de sódio em local específico. Por conversão do grupo amino do polímero na forma de succinato, o perfil da solubilidade da quitosana muda significativamente (AIEDEH & TAHA, 1999).

Em estudos realizados por Bae e colaboradores (2008) com complexos heparina/quitosana-g-Poly (Etileno glicol) verificou-se a facilidade de liberação intracelular de heparina, desencadeando a ativação de caspases, e conseqüentemente promovendo a morte de células cancerígenas por apoptose, aumentando assim a morte dessas células.

Além disso, a quitosana apresenta algumas atividades biológicas, entre elas está sendo usada para acelerar o processo de cicatrização de feridas em humanos (KOJIMA et al., 1998); simula a migração de células polimorfonucleares assim como células mononucleares e acelera a re-epitealização e a regeneração normal (USAMII et al., 1994). Também é documentado que a quitosana aumenta a coagulação sanguínea e a agregação plaquetária, aumenta os níveis de crescimento derivado de plaquetas – AB e do fator de crescimento transformador – $\beta 1$ em plaquetas, em modelo utilizando sangue de cão (OKAMOTO et al., 2003). É relatado que em queimaduras feitas no dorso de ratos o grupo tratado com a quitosana mostrou um grau de queimadura menos severo do que o grupo controle, prevenindo o aprondamento na extensão da queimadura na fase inicial (YAN JIN et al., 2007). Apresenta também atividade antioxidante em estudos realizados com vários pesos moleculares da quitosana utilizando como modelo peixe salmão (KYUNG & THOMAS, 2007).

Trabalhos demonstraram que quitosana insolúvel em água como também a forma solúvel e de alto peso molecular aumenta a produção de óxido nítrico *in vitro* em macrófagos RAW 264.7. A forma insolúvel estimula a produção de NO de forma direta, enquanto a forma solúvel estimula a produção em sinergismo com IFN- γ , tendo uma marcada indução cooperativa na síntese de NO de uma maneira dose-dependente. E esse resultado da quitosana solúvel foi devido à indução da secreção de TNF- α pela via de transdução de sinal de ativação do fator nuclear – κB (JEONG et al., 2000). Resultados semelhantes foram encontrados por Seo e colaboradores (2000) para a quitosana solúvel quando combinada ao IFN- γ em experimentos utilizaram macrófagos peritoneais e células tumorais de animais Balb/c. Lee e colaboradores (2002) observaram também que a quitosana aumenta a expressão de IL-2 e IFN- γ em células do baço de porcos.

Estudos realizados por Pujals e colaboradores (2008) utilizando microsferas de antimoniato de meglumina (MGA) produzidas pela técnica spray drying tendo como um dos componentes a quitosana, foram avaliadas *in vitro* sobre a espécie do parasita *Leishmania infantum* como também a toxicidade em macrófagos murinos. O MGA demonstrou um valor de IC_{50} considerado baixo quando comparado ao mesmo valor do IC_{50} da solução de glucantime, para formas promastigotas e amastigotas em estudo, como também uma menor citotoxicidade.

Assim, as nanopartículas feitas de quitosana foram exploradas sucessivamente para a administração de drogas lipofílicas (MAESTRELLI et al., 2006). Porém, quitosana é normalmente insolúvel em água e em soluções acima de pH 6 e requer ácido para serem protonadas. Dessa forma, várias modificações químicas têm sido introduzidas para aumentar a solubilidade da quitosana. Glicol de quitosana (GCS, Figura 10) é um conjugado derivado de quitosana com cadeias de etileno glicol, solúveis em água no pH ácido/neutro enquanto as cadeia de glicol pendentes no polímero aumenta ambos a solubilidade em água da quitosana nativa e providencia estabilidade estérica. Baseado nos resultados mencionados acima, o desenvolvimento e caracterização de um novo sistema de nanotransporte consistindo de GCS pretendendo a liberação transmucosa de drogas lipofílicas pode ser visto como de grande interesse (TRAPANI et al., 2009).

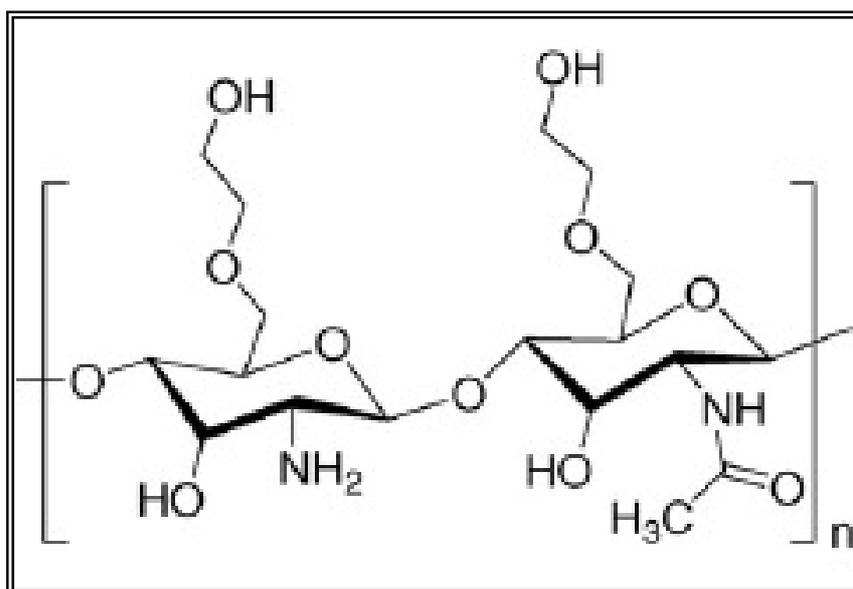


Figura 9. Estrutura química do glicol de quitosana

Tendo em vista as evidências imunoestimuladoras dos complexos de quitosana, é oportuno investigar a potencialidade deste carboidrato na terapêutica das leishmanioses. Adicionalmente, considerando a atividade antileishmania da iangambina já documentada, associada às potencialidades terapêuticas dos complexos de quitosana, é oportuno avaliar a possibilidade de estes complexos otimizarem a ação desta lignana contra parasitas do gênero *Leishmania*.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Avaliar a potencialidade da lignana iangambina, de complexos de quitosana e da iangambina associada à quitosana na terapêutica das leishmanioses em modelos experimentais.

2.2 – Objetivos Específicos

2.2.1 Analisar a atividade antipromastigota da iangambina, quitosana e da iangambina associada à quitosana;

2.2.2 Avaliar o potencial citotóxico da iangambina frente a macrófagos e células renais de mamíferos;

2.2.3 Avaliar o potencial citotóxico da quitosana frente a macrófagos;

2.2.4 Analisar a capacidade da iangambina e da quitosana modular a infecção de macrófagos murinos com *Leishmania chagasi*;

2.2.5 Avaliar, *in vivo*, a atividade antileishmania da iangambina, quitosana e da iangambina associada à quitosana em camundongos suíços/LTF infectados experimentalmente com *Leishmania amazonensis*;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Parasitas e sua manutenção *in vitro* e *in vivo*

Foram utilizadas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/IFLA/BR/67/PH8) cedida pela Profa. Dra. Maria Norma Melo (Universidade Federal de Minas Gerais) e *Leishmania chagasi* (MCAN/BR/99/JP15) isolada de um cão infectado cedido pelo Centro de Controle de Zoonoses do município de João Pessoa – Paraíba. Os parasitas foram cultivados em meio de cultura bifásico: ágar-sangue, “Novy-Macneal-Nicolle” (NNN) associado ao meio líquido Schneider suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF), estreptomicina (100 µg/ml) e penicilina (100 U/ml) (Schneider completo), incubados a 26°C ± 1°C e repicados semanalmente. Quando necessário, formas promastigotas foram criopreservados em nitrogênio líquido no próprio meio acrescido de glicerol na proporção de 10%. A cepa de *Leishmania amazonensis* foi mantida “*in vivo*” em camundongos Suíços/LTF inoculados na pata posterior esquerda com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento (OLIVEIRA et al., 1999).

3.2 – Isolamento da iangambina a partir das folhas de *Ocotea duckei* Vattimo

A planta *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) foi coletada em março de 2002 no município de Santa Rita, Paraíba, Brasil. A identificação botânica foi realizada pela professora Dra. Maria de Fátima Agra do setor de botânica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba. Uma exsicata do material botânico encontra-se depositada no Herbário Professor Lauro Pires Xavier do Departamento de Sistemática e Ecologia/CCEN/UFPB sob registro JPB 4309.

A iangambina foi isolada e identificada pelo grupo de pesquisa do professor Dr. José Maria Barbosa Filho do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB).

Resumidamente as folhas da *Ocotea duckei* foram secas em estufa a 45⁰C, pulverizadas e submetidas à extração com etanol a 95%. Após concentrada a solução etanólica a 55⁰C sob pressão reduzida em rotavapor, o resíduo foi tratado sob agitação mecânica com uma solução de ácido acético a 10% e filtrado sobre celite. O filtrado foi extraído em ampola de separação com clorofórmio. A fase clorofórmica foi evaporada e o resíduo ressolubilizado em metanol e deixado no freezer por 24 horas. Após esse período, obteve-se um precipitado, que após recristalização em metanol foi filtrado e identificado como langambina (Figura 10) (PACHÚ, 1994; SANTOS, 1994).

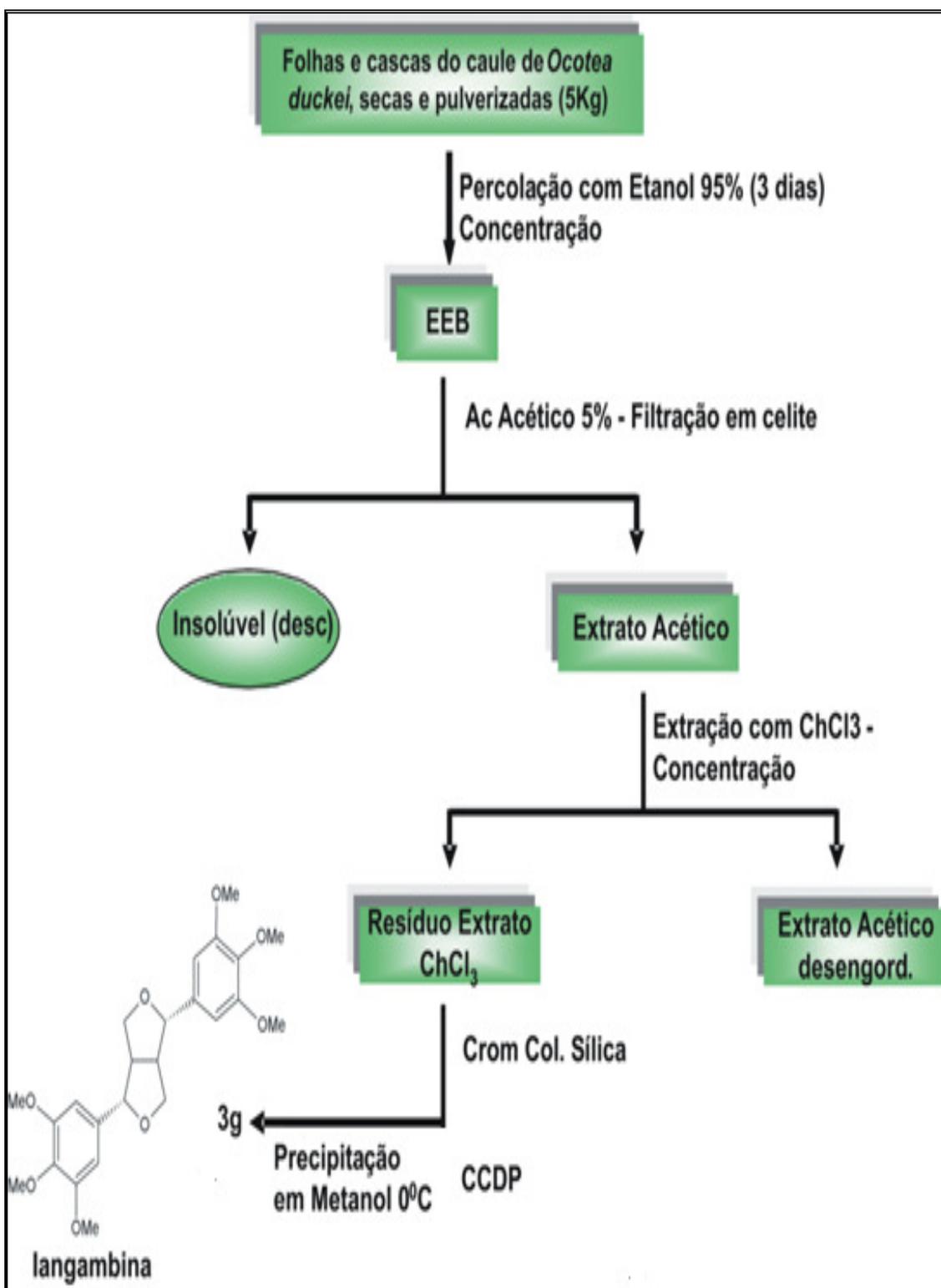


Figura 10. Isolamento da langambina das folhas de *Ocotea duckei* vattino

3.3- Complexo de Quitosana

A quitosana em estudo foi cedida pela profa. Dra. Rosa Valéria da Silva Amorim da Universidade Federal de Pernambuco. Foi elaborada pela Wako Pure Chemical, Japan, apresentando as seguintes características: Glycol Chitosana (G-Ch), $(C_8H_{15}NO_3=205,22)_n \approx 400\mu p$, LOTE N° 5KQ9771, peso molecular 85kD e grau de deacetilação de 85% aproximadamente.

3.4. Avaliação calorimétrica exploratória diferencial (DSC) da associação iangambina e complexos de quitosana

Para avaliar a possibilidade de interação entre a iangambina e o complexo de quitosana em estudo, foi realizado um estudo pelo método calorimétrico exploratório diferencial (DSC). Este estudo foi realizado no Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACON) do departamento de química da Universidade Federal da Paraíba. A análise dos resultados foi realizada com a colaboração do Prof. Dr. Fabio Santos de Souza. As curvas DSC foram obtidas utilizando um equipamento TA MDSC2920. Em células de platina foram pesadas cerca de 4,3 mg da iangambina, quitosana e complexo iangambina-quitosana. As análises foram realizadas em atmosfera de nitrogênio (fluxo de 50mL min^{-1}) e aquecidas na razão de aquecimento $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até a temperatura de $600\text{ }^\circ\text{C}$.

A calibração do DSC foi realizada via ponto de fusão com padrão Índio ($156,6^\circ\text{C} \pm 0,3$) e Zinco ($419,6^\circ\text{C} \pm 0,3$). A entalpia de fusão foi calibrada na temperatura de transição de fase do Índio ($28,59 \pm 0,3\text{J/g}$). Os dados foram analisados através do software V2.6A, da TA.

3.5- Preparo das soluções iangambina e quitosana para os ensaios biológicos

Foi pesado 20mg da iangambina e diluída em 1mL de dimetilsulfóxido [DMSO $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ – Vetec, Brasil] sob agitação em Vortex (Daigger Vortex

Genie 2, A. Daigger & Co., Inc, USA), padronizando assim, uma solução estoque da substância numa concentração final de 20mg/mL. Esta solução foi diluída em tampão fosfato salina (PBS – NaCl 145mM, Na₂HPO₄ 9mM NaH₂PO₄ 1mM, pH 7,4) ou no próprio meio de cultura (Schneider, no caso de *Leishmania* e RPMI 1640 para macrófagos) de acordo com as concentrações utilizadas em cada um dos experimentos, caracterizando a solução de trabalho.

A concentração final de DMSO em cultura não ultrapassou 1,0% para os ensaios com as promastigotas de *Leishmania* e 0,5% para os ensaios com macrófagos murinos. A toxicidade do DMSO já foi avaliada nas condições experimentais às quais estes ensaios foram desenvolvidos, e estas concentrações não apresentam toxicidade para os modelos celulares que foram avaliados.

A quitosana foi diluída em água destilada.

Para os experimentos *in vivo* a iangambina e a quitosana foram diluídas em água destilada.

3.6. Glucantime® (antimoniato de meglumina)

O antimoniato de meglumina (Glucantime®, Aventis Pharma, Brasil) foi utilizado como droga de referência na comparação com os dados obtidos para a iangambina e quitosana *in vitro* e *in vivo*. O Glucantime® foi gentilmente cedido pelo Hospital Universitário Lauro Wanderley. O Glucantime® (300mg/mL solução fornecida pelo fabricante) foi diluído em água destilada ou em meio de cultura (Schneider ou RPMI 1640) para a realização dos ensaios.

3.7- Análise da atividade antileishmania sobre formas promastigotas de *Leishmania*

Para a avaliação da atividade antileishmania sobre as formas promastigotas, os parasitos foram repicados para tubos contendo meio NNN/SCHNEIDER com inoculo inicial de 1×10^6 promastigotas/mL. Foi analisado o crescimento dos parasitas na presença de diferentes concentrações da iangambina e da quitosana isoladamente, assim como na

presença da iangambina associada à quitosana e ausência dos compostos (controle). Paralelamente foi avaliado o crescimento dos parasitas na presença do Glucantime, como droga de referência. As promastigotas foram incubadas a 26°C, e com 72 horas de cultivo, foram retiradas alíquotas das suspensões, diluídas em solução isotônica (formaldeído, cloreto de sódio, ácido cítrico e água) e quantificadas em câmara de Neubauer (Figura 11). A quantificação foi feita por contagem direta do número de células por campo em microscópio óptico com aumento de 40x. A média da contagem foi utilizada para calcular o número de parasitas contidos em 1,0 mL de cultura. O cálculo foi feito utilizando a fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de parasitas} = \text{média dos 4 quadrantes} \times \text{o inverso da diluição da amostra} \times 10^4.$$

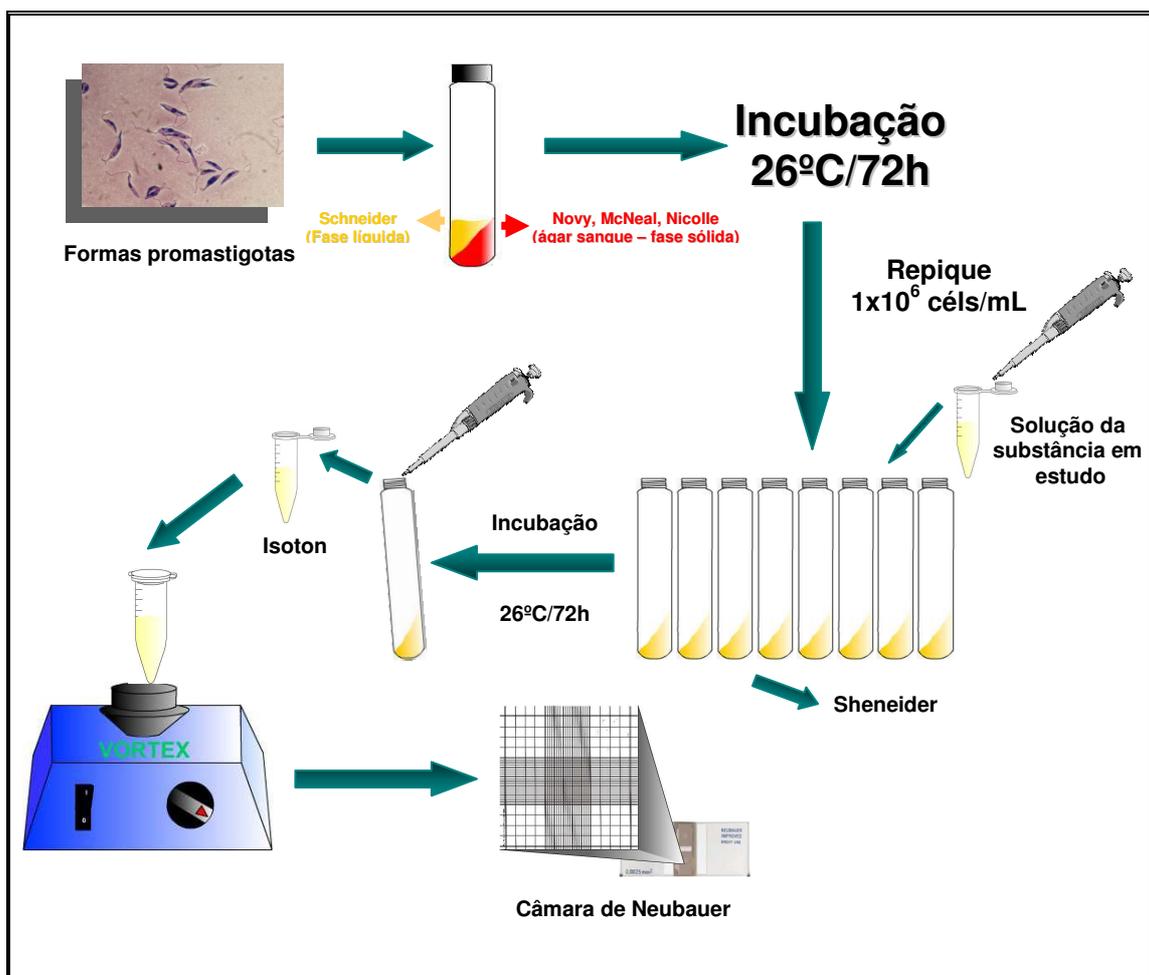


Figura 11: Ensaio para atividade citotóxica sobre formas promastigotas de *Leishmania*

3.8- Avaliação da toxicidade sobre células de mamíferos

Para a coleta dos macrófagos foram utilizados camundongos suíços fêmeas Swiss com 8 a 10 semanas de idade provenientes do biotério Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da UFPB. Os animais foram inoculados com 1mL de tioglicolato na cavidade peritoneal e após 5 dias foi promovida a retirada dos macrófagos peritoneais injetando 10 mL da solução PBS suplementada com 3% de SBF na cavidade e coletando em seguida. As células foram sedimentadas por centrifugação, ressuspendidas em 1mL de meio RPMI completo [RPMI 1640, 10% SBF, estreptomicina (100 μ g/ml) e penicilina (100 U/ml)] e as células viáveis, quantificadas em câmara de Neubauer na presença de azul de trypan a 0,4% (Figura 12).

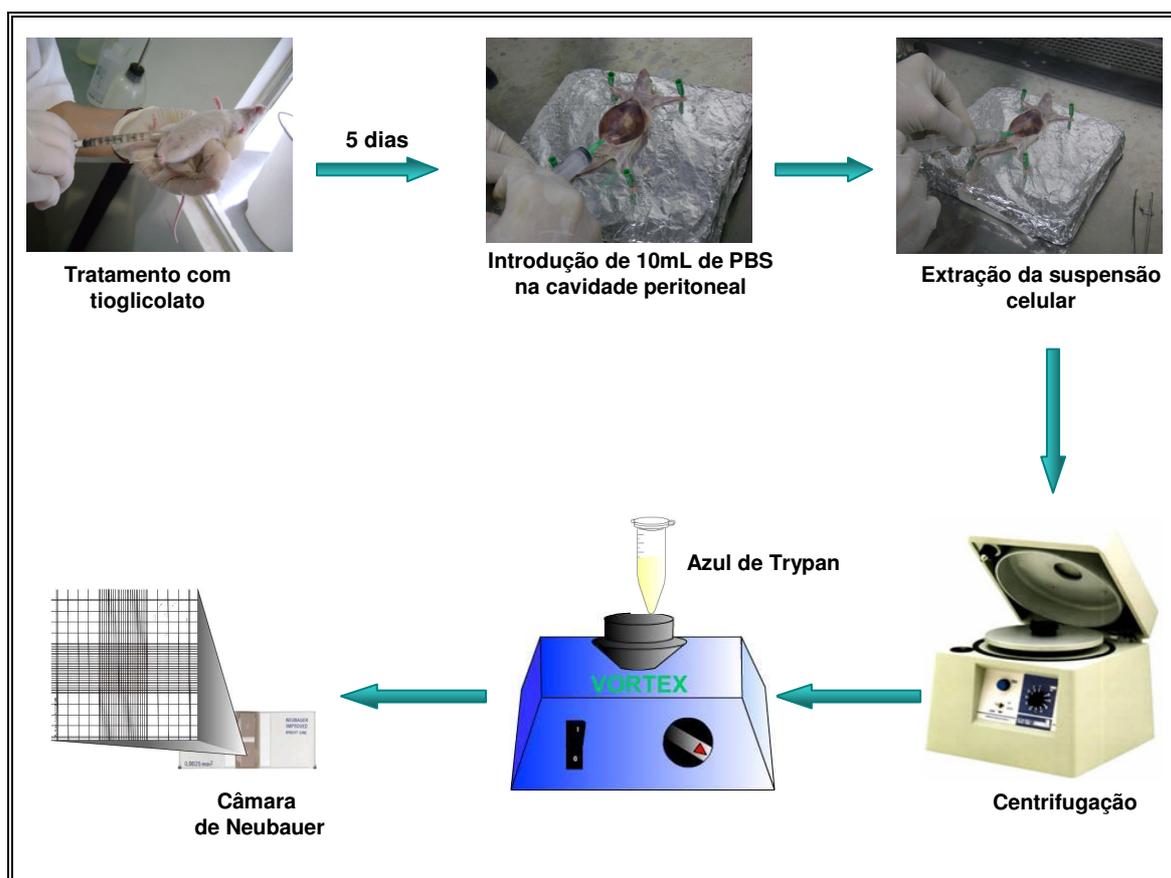


Figura 12. Procedimento para coleta de macrófagos peritoneais de camundongos Suíços

3.8.1. Avaliação da toxicidade sobre macrófagos murinos

3.8.1.1. Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

Os macrófagos isolados (4×10^5 cél/100 μ l) foram tratados em placas de microcultura de 96 poços em meio RPMI completo, com diferentes concentrações da iangambina, quitosana e da iangambina associada à quitosana. Paralelamente os macrófagos foram também tratados com diferentes concentrações de Glucantime, assim como na ausência desses compostos. As placas foram incubadas por 24h e, nos ensaios com a quitosana, as células foram também analisadas após 48h de incubação, em atmosfera enriquecida com 5% CO₂ e a 37°C. Após a incubação foi realizado o ensaio com 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico (MTT) (Figura 13). Foi adicionado 10 μ L do MTT as placas e incubadas por 4 horas à 37°C em estufa com 5% de CO₂, em seguida foi adicionado 50 μ L de SDS (10%) em HCL 0,01N para solubilizar os cristais de formazan. As placas foram incubadas por 17h e em seguida realizada a leitura em espectrofotômetro (570nm). Os ensaios foram realizados em triplicata (MOSMANN,1983).

Este método baseia-se na atividade metabólica de células viáveis, o ensaio colorimétrico do MTT tem sido amplamente empregado na avaliação da proliferação e toxicidade celular. Essa técnica baseia-se na redução do sal de tetrazólio por enzimas mitocondriais em células viáveis intactas. Uma vez reduzido a cristais de formazan o MTT torna-se insolúvel e com coloração púrpura no meio de cultura, sendo possível sua mensuração por meio de espectrofotometria.

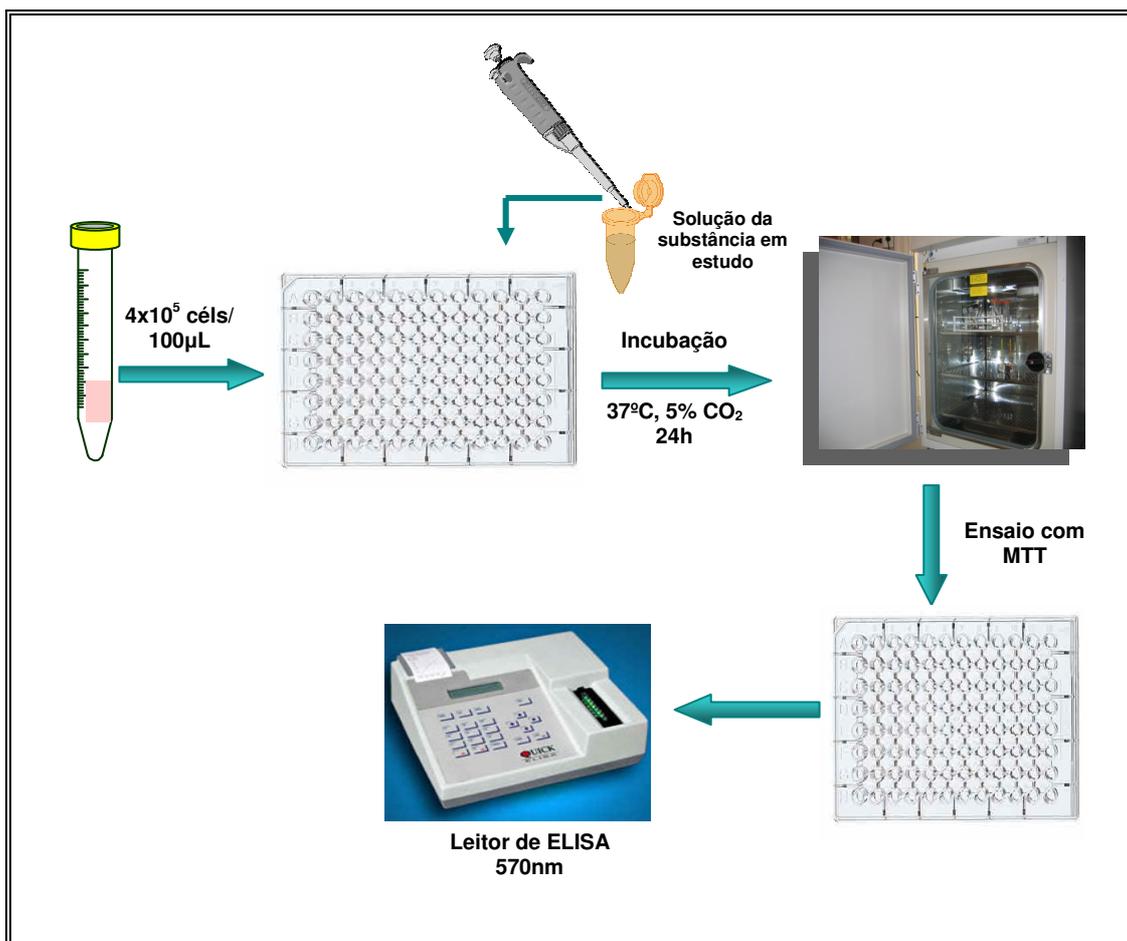


Figura 13. Ensaio de toxicidade com MTT sobre macrófagos murinos

3.8.1.2. Ensaio com o corante vital Azul de Trypan

Para análise da citotoxicidade dos compostos avaliados sobre macrófagos murinos pelo método de exclusão com azul de trypan, as células foram ajustadas para 1×10^6 células/mL com RPMI completo. Em seguida, foram distribuídos 1 mL dessa suspensão em tubos de polipropileno, seguida pela adição dos compostos a serem testados em diferentes concentrações, exceto nos controles. As células foram então incubadas em estufa de 5% de CO_2 a 37°C , e após 24 horas, quantificadas em câmara de Neubauer na presença do corante Azul de Tripan a $0,4\%$. Os índices de CC_{50} (concentração que mata 50% das células) foram gerados pelo programa SPSS VERSÃO 8.0 para Windows.

3.8.2- Avaliação da citotoxicidade sobre células renais de cães

Os estudos de citotoxicidade em células epiteliais de rim canino (MDCK) foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins no laboratório de Cultura de Células do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará. As alíquotas das células MDCK para estoque foram mantidas em meio MEM acrescido de SBF a 50% e DMSO a 10%, congeladas primeiramente à -80°C e transferidas para nitrogênio líquido, onde foram mantidas (FRESHNEY, 2000).

As células MDCK foram cultivadas em garrafas de plástico ou placas de microcultura, em meio MEM (Meio essencial mínimo), suplementado com 10% v/v de Soro Bovino Fetal (SBF), penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (MARTINS et al. 2005; CHAIM, 2005). As células foram incubadas a 37°C , em atmosfera com 95% de umidade e 5% de CO_2 a 37°C . Antes de cada experimento as células foram armazenadas em meio sem SBF por 24h para a obtenção de células na fase G_0 do ciclo celular. Para cada experimento foi removido o meio da cultura e as células foram incubadas com tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) a 37°C por aproximadamente 10min. A tripsina foi inativada adicionando o mesmo volume de meio com SBF. A suspensão celular foi então centrifugada a 200g por 10min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio de cultura. As células foram então quantificadas em câmara de Neubauer e subcultivadas em placas de 96 poços em uma densidade de 1×10^5 cél/100 μL e tratadas com diferentes concentrações da iangambina permitindo o crescimento confluyente por 24h. As placas foram avaliadas qualitativamente com 24hs de cultivo, usando microscópio invertido.

A citotoxicidade dos compostos em teste sobre as células MDCK foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT, como já foi discutido anteriormente, e pelo teste de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH).

Para a realização do ensaio com a enzima LDH, foi adicionado 1 mL da enzima a 20 μL do sobrenadante coletado das placas e, foram realizadas leituras das absorbâncias em 1 e 2 minutos. O decréscimo da absorbância é proporcional a atividade da enzima. Os testes foram realizados utilizando o reagente analítico Labtest LDH Liquiform e foram seguidas as instruções do fabricante. A LDH é uma enzima responsável pela redução do piruvato a

lactato na presença do NADH. Uma vez que esta enzima é de origem citoplasmática, a sua presença no meio extracelular pode indicar alteração na integridade da membrana plasmática.

3.9. Infecção de macrófagos com promastigotas de *Leishmania chagasi* e tratados com os compostos em teste

Em placas de cultivo de 24 poços foram colocadas lamínulas estéreis e em seguida, adicionado 1mL da suspensão de macrófagos peritoneais, coletados conforme descrito no item 3.8., na concentração de 1×10^6 cels/mL em meio RPMI completo. As placas foram incubadas por 2 horas em estufa de CO₂ a 37°C, as promastigotas de *Leishmania chagasi* foram adicionadas na proporção de 10 promastigotas/1 macrófago e incubadas por mais 3 horas na estufa de CO₂. Novamente as placas foram retiradas da estufa e cada poço lavado 3 vezes com 1mL de solução PBS com 3% de SBF aquecido a 37°C. Após a lavagem, foram adicionados novamente 1mL de meio RPMI completo e diferentes concentrações da iangambina e da quitosana isoladamente. Em seguida as culturas foram incubadas por 24h, 48h e 72 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Os sobrenadantes foram coletados para dosagem de TNF- α e de óxido nítrico (OLIVEIRA et al., 2005). As lamínulas foram retiradas, coradas e analisadas sob microscopia óptica para quantificação do número de macrófagos parasitados e o número de amastigotas por macrófago na presença e ausência das drogas em estudo (Figura 14).

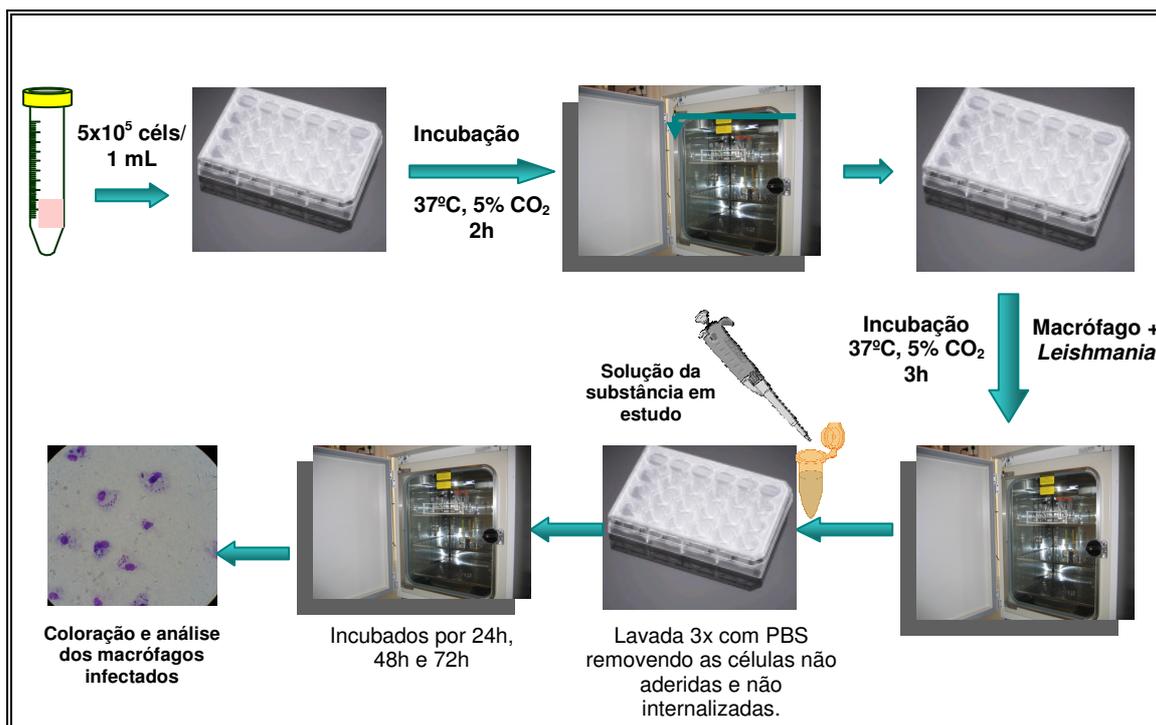


Figura 14. Infecção de macrófagos murinos com *L. chagasi*

3.10- Dosagem de óxido nítrico

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados com *Leishmania chagasi*, na presença da iangambina e da quitosana isoladamente, foram analisados quanto à produção de nitrito pela reação de Griess, como uma medida da produção de óxido nítrico (GREEN et al., 1982). Para medir a produção de nitrito, alíquotas de $100\mu\text{L}$ das amostras a serem dosadas foram incubadas com $100\mu\text{L}$ dos reagentes ($50\mu\text{L}$ da solução de sulfanilamida 1% e $50\mu\text{L}$ de solução de N-naphthylethylenediamine dihydrochloride 0,1% em 2,5% de H_3PO_4) à temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura foi realizada em leitor de ELISA com absorvância de 570 nm.

3.11- Dosagem de TNF- α

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados com *Leishmania*, na presença da iangambina e da quitosana isoladamente, foram analisados quanto a produção de mTNF- α pelo método ELISA com o kit

produzido por PETROTECH INC. (New Jersey, USA). A metodologia empregada foi desenvolvida de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 100µL das amostras a serem dosadas foram incubadas com 100µL de anticorpos de detecção numa concentração de 0,25µg/mL à temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida essas amostras foram lavadas 4x e após foi adicionado 100µL do conjugado Avidin-HRP por 30 minutos. Novamente as amostras foram lavadas 4x e foi adicionado 100µL da solução substrato a cada poço e incubadas em temperatura ambiente para desenvolver a coloração. A leitura foi realizada em um leitor de placas ELISA a 405 nm.

3.12- Avaliação da atividade antileishmania *in vivo* em camundongos suíços infectados com *Leishmania amazonensis*

Para os estudos *in vivo* foram utilizados camundongos suíços. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFPB. Camundongos, fêmeas, de 8 a 10 semanas, foram infectados com 1×10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento (cinco dias de cultivo) pela via subcutânea, na pata posterior esquerda. O desenvolvimento das lesões foi monitorado semanalmente, por meio de medidas da espessura da pata infectada e não infectada com o auxílio de um paquímetro (Figura 15). A diferença entre as medidas representaram o tamanho da lesão. Os aspectos analisados foram, portanto, tamanho e características do desenvolvimento da lesão, presença de metástase, carga parasitária e peso do animal.

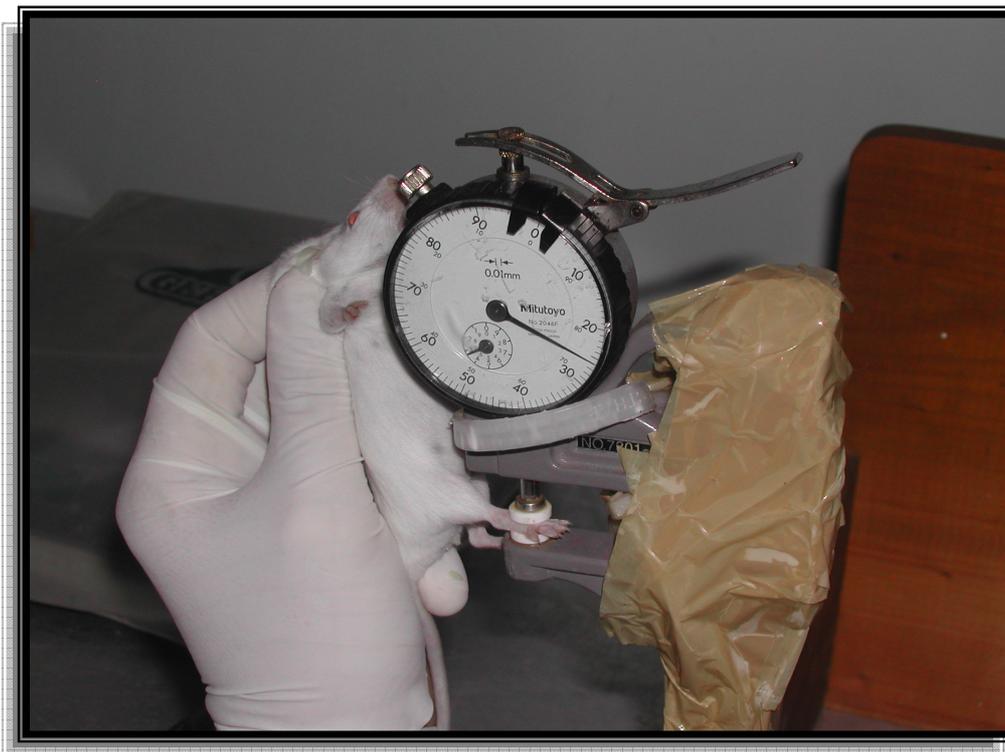


Figura 15. Semanalmente as patas foram medidas e determinado o tamanho da lesão (diferença entre a espessura da pata infectada e da não infectada)

3.12.1. Tratamento dos animais

Inicialmente foi realizado um pré-tratamento durante uma semana, via gavagem, com a iangambina associada os complexos de quitosana, assim como a iangambina e a quitosana isoladamente, três vezes na semana antes da infecção com *Leishmania amazonensis*. Os animais foram divididos em 5 grupos (n=8), e as substâncias testadas foram administradas por via oral (Figura 16), três vezes por semana, durante oito semanas.; um grupo foi tratado com doses de iangambina a 25mg/kg; um grupo foi tratado apenas com quitosana a 50mg/kg; um grupo foi tratado com a iangambina (25mg/kg) associada à quitosana (50mg/kg) e um grupo tratado com a droga de referência, Glucantime, com doses de 8mg/kg, via intraperitoneal. O grupo controle recebeu apenas o veículo água destilada

Adicionalmente foi realizado também um tratamento com a quitosana utilizando uma dose de 200mg/kg. Neste ensaio, os animais foram divididos

em 3 grupos (n=8), e as doses testadas da quitosana foi administradas por via oral, diariamente, durante dez semanas. O grupo controle recebeu apenas o veículo água destilada; um grupo foi tratado com dose de 50mg/kg da quitosana e um outro foi tratado com uma dose de 200mg/kg.

Paralelamente, o peso dos animais foi monitorado a cada semana, assim como realizado um estudo clínico geral dos camundongos.



Figura 16. Tratamento dos animais por via oral

3.12.2. Quantificação da carga parasitária

Ao término do tratamento, os animais foram eutanasiados e a parasitemia da pata e linfonodo poplíteo foi avaliada por meio do método de diluições sucessivas (OLIVEIRA et al., 2005). Fragmentos das lesões da pata foram retirados e pesados, e os linfonodos poplíteos foram removidos assepticamente. Estes foram homogeneizados isoladamente em 2mL em meio líquido Schneider completo. Em seguida a suspensão celular foi transferida

para placas de 96 poços e realizadas diluições sucessivas em meio Schneider. Cada amostra foi feita em triplicata. As leituras das culturas foram feitas após 10 dias de incubação em estufa a 26°C sob microscopia óptica para determinar qual a maior diluição em que ainda é observada a presença de promastigotas no meio.

3.13- Análise estatística

As medidas obtidas em cada experimento foram comparadas pelo teste T de “Student” utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 4.03. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados para a análise. Para calcular a IC₅₀ e a CC₅₀ foi utilizado o modelo probit de análise de regressão utilizando o programa SPSS 8.0 Windows.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da interação entre a iangambina e complexos de quitosana

A figura 17 e tabela 1 mostram os dados térmicos obtidos das amostras da iangambina, quitosana e da iangambina associada à quitosana pela análise calorimétrica exploratória diferencial (DSC). A razão de aquecimento de 10°C/min definiu o comportamento térmico do iangambina. A curva calorimétrica da iangambina mostrou dois processos, sendo o primeiro em 105 °C com calor de reação 93,1 j/g correspondendo a um processo endotérmico característico de fusão e o segundo pico também endotérmico em correspondendo na faixa de 240 a 360 °C e calor de reação de 236,8 j/g correspondendo a decomposição. A quitosana apresentou um perfil calorimétrico com ausência do processo de fusão característico de um polímero derivado de um carboidrato, sendo observado um processo de decomposição exotérmico na faixa de 226 a 430 °C com calor de reação de 209,8 j/g. O complexo de inclusão iangambina-quitosana apresentou um discreto processo de fusão a 103 °C com calor de reação de 4,77 j/g e dois processo de decomposição com característica exotérmica, sendo o primeiro em 253 °C e o segundo em 322 °C com calores de reação 29,0 j/g e 48,3 j/g, respectivamente. Os resultados calorimétricos mostram que a complexação iangambina-quitosana levou à interação específica das duas moléculas e tal fato somente pode ocorrer através da cooperação de diversas interações fracas simultâneas. O explica o fenômeno do complexo de interação molecular, uma vez que cada interação corresponde a um conjunto de forças distintas. Portanto a análise térmica sugere uma interação entre a lignana iangambina e o complexo de quitosana em estudo.

| Amostra | Razão (°C/min) | Onset (°C) | Pico (°C) | ΔH (J/g) |
|------------------------------|----------------|------------|-----------|------------------|
| Glycol-chitosan | 10 | 226 – 430 | 262 | 209,8 |
| Iangambina | 10 | 240 – 360 | 360 | 236,8 |
| Glycol-chitosan + Iangambina | 10 | 230 - 400 | 253 | 29,0 |
| | | | 322 | 48,3 |

Tabela 1. Resultados de DSC para a decomposição térmica das amostras de Iangambina, quitosana e Iangambina associada à quitosana em atmosfera de nitrogênio

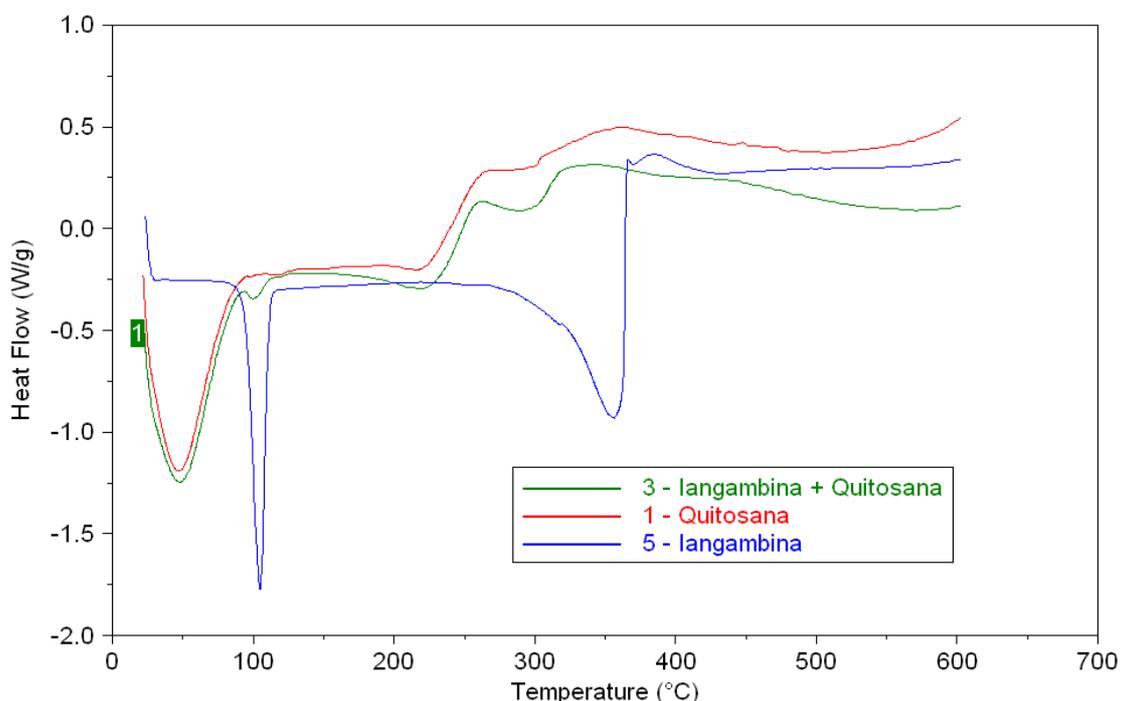


Figura 17. Curvas de DSC das amostras de Iangambina, quitosana e Iangambina associada à quitosana sob fluxo de nitrogênio de $50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Massa das amostras de aproximadamente 4,3mg, razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, suporte de amostra de platina.

4.2. Atividade antileishmania sobre as formas promastigotas dos parasitos

4.2.1. Efeito da lignana Iangambina sobre o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*

Os resultados da atividade antileishmania da lignana Iangambina para a espécie de *L. amazonensis* estão expressos na figura 18. A partir da

concentração de 50µg/mL já houve inibição no crescimento dessa espécie. Para espécie de *L. chagasi* (Figura 19) a partir da concentração de 25µg/mL já se observa uma atividade antipromastigota. A concentração da iangambina que inibe 50% do crescimento (IC₅₀) dos parasitas foi de 67,66 µg/mL e 22,53µg/mL para *L. amazonensis* e *L. chagasi*, respectivamente. O efeito tóxico desta lignana foi significativamente maior do que o observado pelo Glucantime, a droga de referência, uma vez que na concentração de até 8mg/mL não apresentou uma inibição significativa no crescimento dos parasitas. Esses dados corroboram com os resultados encontrados por Monte Neto e colaboradores (2007) os quais mostraram uma significativa atividade antileishmania da lignana sobre as formas promastigotas dos parasitas.

Estudos sobre a atividade antipromastigota de outras lignanas frente a algumas espécies de *Leishmania* já foram documentados. Silva Filho e colaboradores (2008) estudando lignanas isoladas de *Nectandra megapotamica* (Lauraceae), observaram que as lignanas machilina-G e veraguensina mostraram alta atividade antileishmania contra a espécie de *Leishmania donovani*. No estudo realizado por Moideen e colaboradores (1997) apud Rocha e colaboradores (2005) com a lignana anofina foi observado uma atividade antileishmania frente a espécie de *L. major*. Outra lignana denominada (+)-nyasol inibiu significativamente o crescimento de promastigotas de *Leishmania major*, apresentando um IC₅₀ de 12 µM (OKETCH-RABAH et al., 1997). Portanto os resultados obtidos no presente trabalho reforçam a potencialidade desta classe de composto químico.

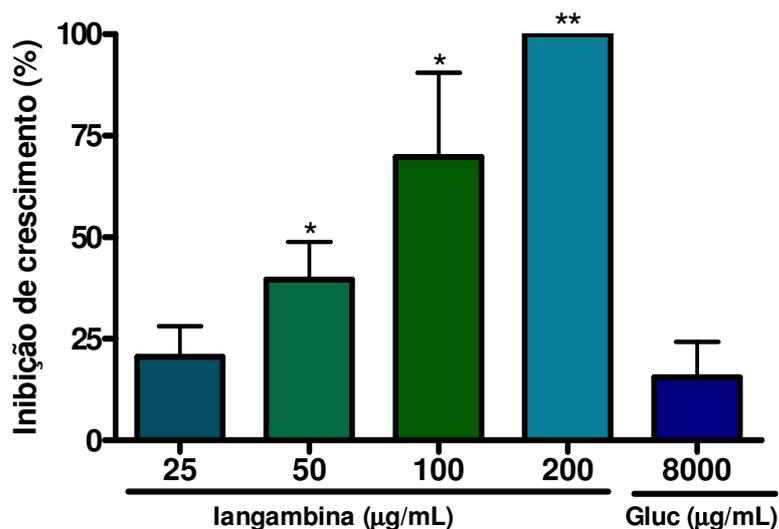


Figura 18 – Inibição de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença de diferentes concentrações da iangambina obtida da *Ocotea duckei*. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider a 25°C por 72 horas. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. (* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ no teste “t-Student”)

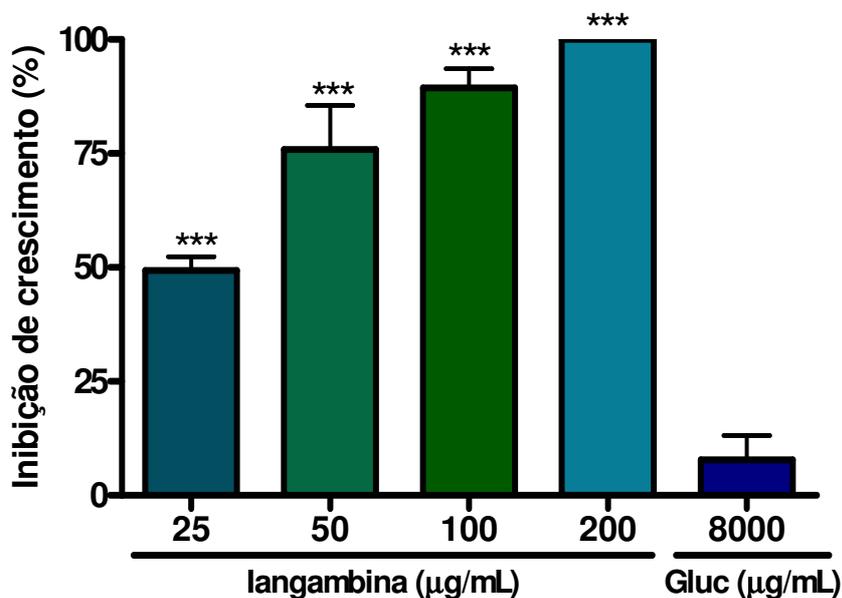


Figura 19 – Inibição de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* na presença de diferentes concentrações da iangambina obtida da *Ocotea duckei*. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider a 26°C por 72 horas. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. (* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ no teste “t-Student”)

4.2.2. Efeito da quitosana sobre o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*

Na figura 20 encontram-se os resultados da atividade antipromastigota da quitosana sobre a espécie de *L. amazonensis*, a qual não apresentou atividade sobre esta espécie de parasita. Para a espécie de *L. chagasi* (Figura 21) foi obtido um resultado antipromastigota a partir da concentração de 50 μ g/mL, gerando um IC50 de 88,7 μ g/mL. Resultados semelhantes foram encontrados por Pujals e colaboradores (2008) quando estudando a atividade antipromastigota de um complexo de quitosana sobre *L. infantum*, encontrando um IC50 de 112,64 μ g/mL.

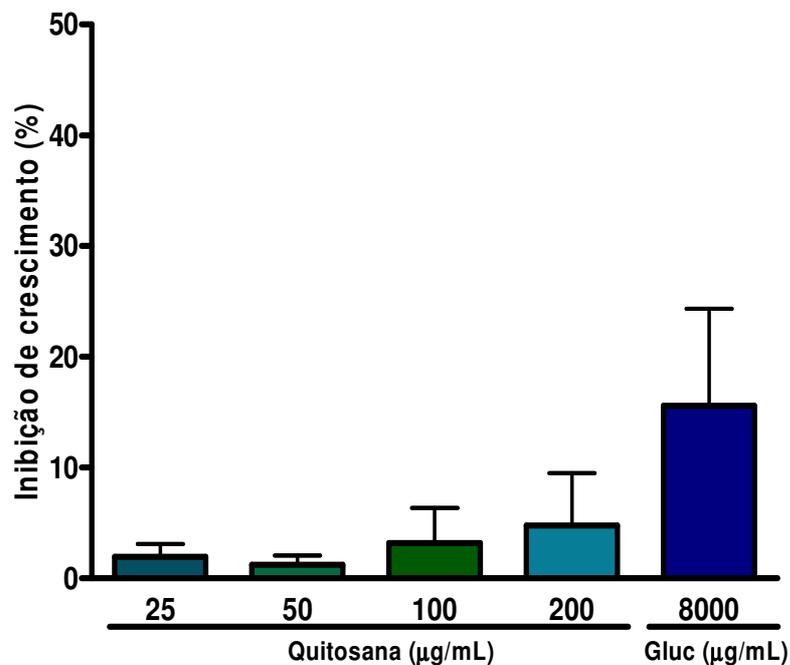


Figura 20 – Inibição de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, na presença de diferentes concentrações da quitosana. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider a 26°C por 72 horas. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata.

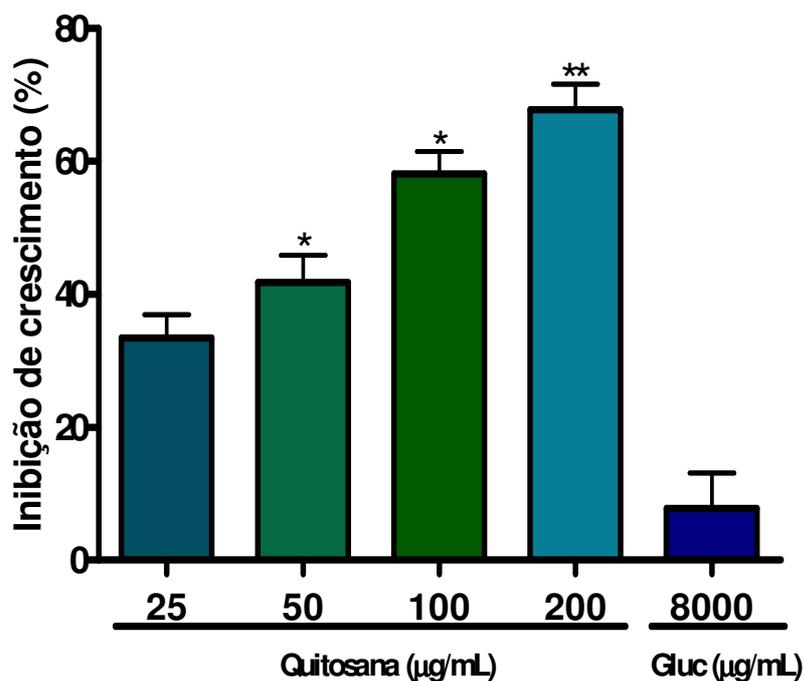


Figura 21 – Inibição de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania chagasi*, na presença de diferentes concentrações da quitosana. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider a 26°C por 72 horas. O inoculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. (* $P < 0.05$ e ** $p < 0.001$ no teste “t-Student”)

4.2.3. Efeito da iangambina associada à quitosana sobre o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*

Considerando a análise térmica pelo DSC que sugere uma interação entre a iangambina e a quitosana, foi avaliado se a quitosana poderá alterar a atividade antipromastigota desta lignana. Para esta análise foi preparada uma mistura da iangambina com uma solução da quitosana, através de associação em suspensão. As concentrações utilizadas foram os IC_{50} da iangambina de 67,66 µg/mL e 22,53µg/mL encontradas para *L. amazonensis* e *L. chagasi*, respectivamente, e 2x esses valores do complexo de quitosana. Os resultados para a espécie de *L. amazonensis* (Figura 22) mostraram que a quitosana não interfere com a atividade antipromastigota da iangambina. Para espécie de *L. chagasi* (Figura 23) também não houve interferência da quitosana sobre a atividade antileishmania dessa lignana.

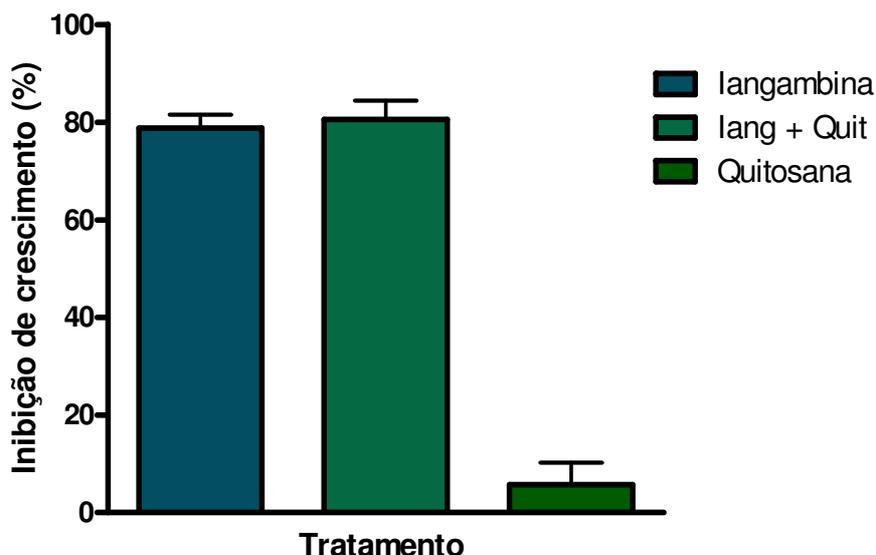


Figura 22 – Inibição de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença de iangambina associada à quitosana. A concentração utilizada foi o IC_{50} da iangambina de $67,66 \mu\text{g/mL}$ encontrada para *L. amazonensis* e $2x$ esse valor para o complexo de quitosana. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider a 26°C por 72 horas. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. Teste “t-Student”.

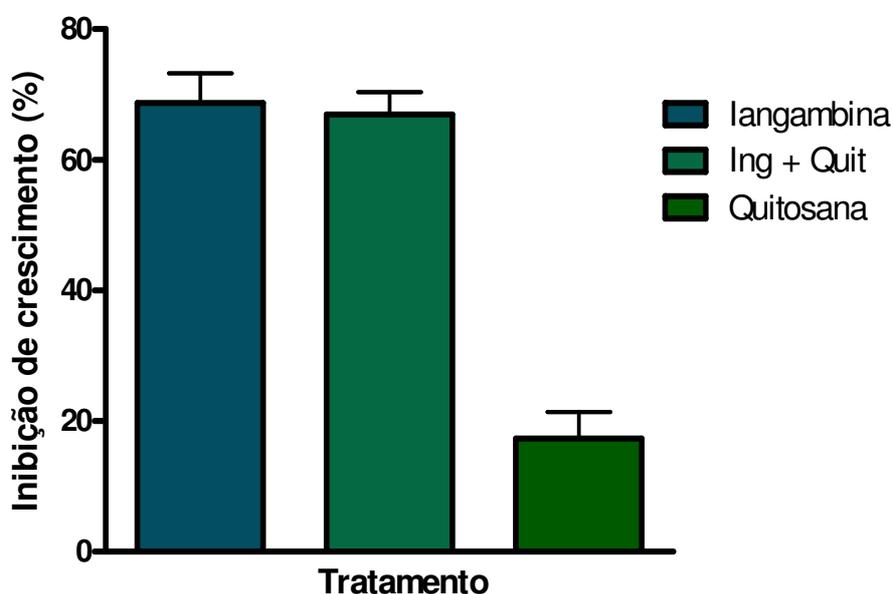


Figura 23 – Inibição de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* na presença de iangambina associada à quitosana. A concentração utilizada foi o IC_{50} da iangambina de $22,53 \mu\text{g/mL}$ encontrada para *L. chagasi* e $2x$ esse valor para o complexo de quitosana. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider a 26°C por 72 horas. O inóculo inicial foi de 1×10^6 promastigotas/mL. O gráfico representa a média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. Teste “t-Student”.

É importante considerar que complexos de quitosana podem interagir com outros compostos interferindo na atividade destes últimos. Em estudos realizados por Bae e colaboradores (2008) com complexos de micela heparina/quitosana-g-Poly (Etileno glicol) em células melanoma B16F10 de camundongos foi verificado que os complexos de micela exibiram uma alta atividade citotóxica contra as células cancerígenas quando comparado com heparina e quitosana-g-PEG sozinhas nas mesmas concentrações. A facilidade de liberação intracelular de heparina associada a quitosana desencadeou a ativação de caspases, e conseqüentemente promoveu a morte de células cancerígenas por apoptose, aumentando assim a morte dessas células.

Contudo, pelos resultados vistos nas figuras 22 e 23, foi observado que o complexo de quitosana não interferiu na atividade antileishmania da iangambina sobre as formas promastigotas de *Leishmania*.

4.3- Avaliação da citotoxicidade da iangambina sobre células de mamíferos

Para analisar a citotoxicidade da iangambina sobre células de mamíferos, foram utilizadas duas culturas de células, macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos suíços e células epiteliais de rim canino (MDCK).

4.3.1- Avaliação da citotoxicidade da iangambina sobre macrófagos murinos

Na figura 24 estão os resultados obtidos da citotoxicidade da iangambina sobre macrófagos murinos analisada pelo método de exclusão utilizando o azul de trypan após 24h de exposição. Não foi observada uma citotoxicidade significativa nas concentrações avaliadas. Na figura 25 estão os valores encontrados para viabilidade celular dos macrófagos expostos à iangambina e avaliados pelo método do MTT. Nestes estudos, também não foi encontrado citotoxicidade significativa em relação ao controle.

Portanto a iangambina mostrou não interferir com a viabilidade dos macrófagos murinos em ambos os testes, tanto no ensaio de análise da integridade da membrana citoplasmática avaliada pelo corante azul de trypan

(Figura 24), como pela análise da capacidade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial reduzir o MTT para cristais de formazan (Figura 25).

Estes estudos corroboram os realizados por Monte Neto e colaboradores (2008) que relataram uma baixa citotoxicidade desta lignana sobre macrófagos murinos coletados da cavidade peritoneal de camundongos suíços. Neste mesmo trabalho foi avaliado também a citotoxicidade da iangambina sobre células embrionárias de Ouriço do Mar, e os autores demonstraram também uma baixa citotoxicidade sobre estas células.

Ensaio de mutagenicidade mostraram que a iangambina não apresenta potencial mutagênico (MARQUES et al., 2003).

Esta baixa citotoxicidade *in vitro* está também correlacionada com uma baixa toxicidade *in vivo*. Em estudos farmacológicos realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB), revelaram que esta lignana, apresenta uma baixa toxicidade aguda em camundongos quando administrada por via intraperitoneal em dose de até 1g/kg por 48h (PACHÚ et al., 1993).

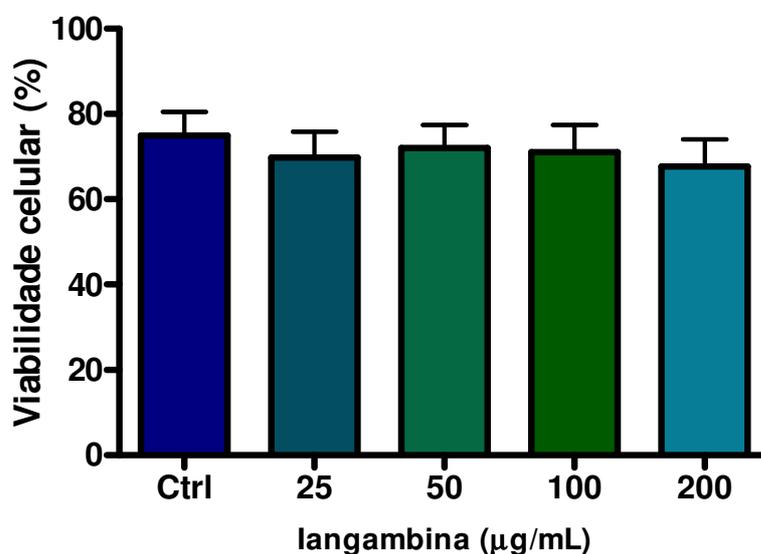


Figura 24 – Efeito da iangambina na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos suíços avaliados com o corante azul de trypan. Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI na presença da lignana por 24h em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata (N=4).

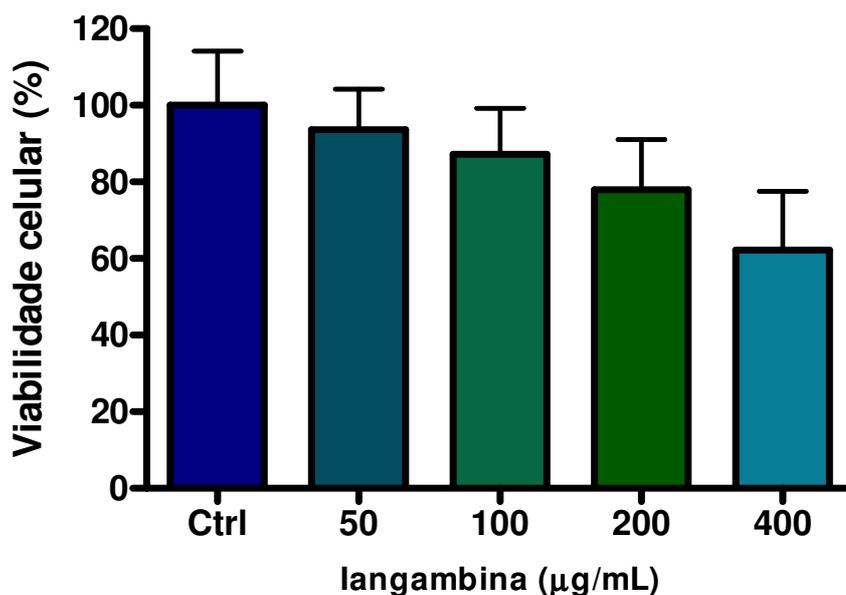


Figura 25 – Efeito da iangambina na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos suíços avaliados pelo ensaio por MTT. Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI na presença da lignana por 24h em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata (n=4).

4.3.2- Avaliação da citotoxicidade da iangambina sobre células renais de cães

Nas figuras 26 e 27 estão expressos os valores encontrados de citotoxicidade da iangambina sobre as células MDCK avaliada pelos métodos de MTT e atividade da lactato desidrogenase (LDH), respectivamente.

A iangambina não apresentou citotoxicidade para as células MDCK em ambos os métodos utilizados, tanto pela análise da habilidade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial reduzir o MTT para cristais de formazan (Figura 26), como pela análise da integridade da membrana citoplasmática avaliada pela liberação da enzima LDH (Figura 27). Esta enzima é responsável pela redução do piruvato a lactato na presença do NADH. Uma vez que esta enzima é de origem citoplasmática, a sua presença no meio extracelular indica alteração na integridade da membrana plasmática.

Estudo com células renais é um bom parâmetro de citotoxicidade celular, uma vez que um dos problemas relacionados ao uso das drogas de referência são seus efeitos colaterais incluindo a nefrotoxicidade.

Portanto, pode-se observar que a iangambina é significativamente tóxica para as formas promastigotas dos parasitas, sem demonstrar citotoxicidade significativa para as células de mamíferos.

Outras potencialidades farmacológicas da iangambina já foram relatadas, dentre elas: atividade anti-PAF (Fator de Agregação Plaquetária) em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (Faria Neto et al., 1995a e 1995b), propriedade antialérgica (SERRA et al., 1997); possível atividade analgésica (ALMEIDA et al., 1995); aumento do tempo de sono induzido por pentobarbital e pode atuar como um depressor do sistema nervoso central, anticonvulsivante e sedativo-hipnótico (PACHÚ, 1993 e SOUSA et al., 2005); efeito farmacológico contra colapso cardiovascular e mortalidade devido ao choque por endotoxinas (ARAÚJO et al., 2001); apresenta atividade antitumoral em células coloretais induzindo apoptose (HAUSSOT et al., 2003).

Assim pelos resultados já encontrados nesse trabalho e por outros já relatados acima sobre toxicidade tanto *in vitro* como *in vivo* da iangambina aliada às propriedades farmacológicas desta lignana, pode-se concluir de que esta molécula é promissora para o desenvolvimento de um novo fármaco.

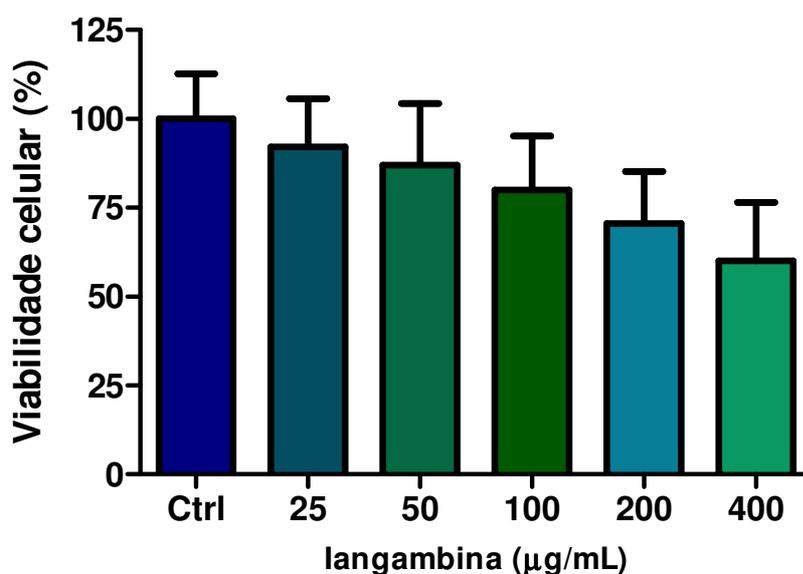


Figura 26 – Efeito da iangambina em células tubulares renais (MDCK) em ensaio com MTT. As células MDCK foram mantidas em meio RPMI na presença da lignana por 24h em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

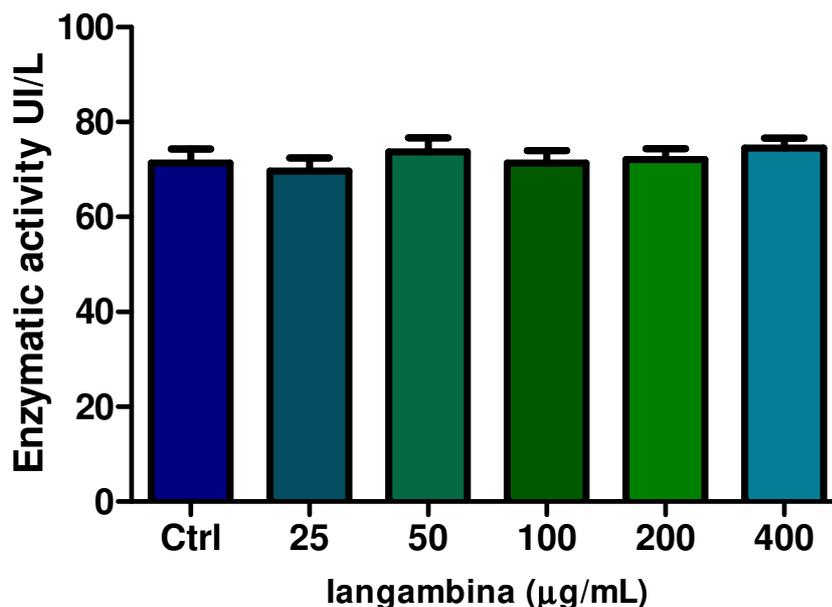


Figura 27 – Efeito da langambina em células tubulares renais (MDCK) em ensaio com LDH (enzima lactato desidrogenase). As células MDCK foram mantidas em meio RPMI na presença da lignana por 24h em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata (n=4)

4.4- Avaliação da toxicidade da quitosana sobre macrófagos murinos

Os resultados encontrados para citotoxicidade da quitosana estão expressos nas figuras 28 e 29, após 24h de exposição sobre células de macrófagos murinos utilizando os métodos de exclusão pelo azul de trypan e MTT, respectivamente. Nas concentrações testadas foi visto que esse carboidrato não interfere com a viabilidade das células em estudo após 24h de incubação. Na figura 30 está o resultado sobre a citotoxicidade celular após 48h de exposição a qual foi analisada pelo método de exclusão com azul de trypan. Depois deste período de exposição, foi observado que a partir da concentração de 200 µg/mL houve uma citotoxicidade significativa em relação ao controle. Na figura 31 a análise pelo método do MTT, após 48h de interação entre a quitosana e os macrófagos, demonstram que em todas as concentrações avaliadas houve uma citotoxicidade significativa em relação ao controle, gerando um CC₅₀ de 360,8 µg/mL.

Em estudo anteriores realizados por Pujals e colaboradores (2008) com um complexo de quitosana foi demonstrado uma baixa citotoxicidade em

macrófagos murinos quando avaliada no tempo de 48h pelo método de exclusão com azul de trypan.

Hwang e colaboradores (2000) trabalhando com macrófagos da linhagem RAW 264.7 verificou que uma quitosana não alterou o crescimento dessas células quando estas foram expostas por 48h com esse carboidrato utilizando o método do MTT.

Kean & Thanou, (2009) verificaram que quando a quitosana apresenta um alto grau de deacetilação (DD) a toxicidade é relacionado ao peso molecular e a concentração, um baixo DD a toxicidade é menos pronunciada e menos relacionada ao peso molecular.

Diante dos diferentes resultados encontrados sobre a viabilidade celular já relatado acima e como existem vários tipos de complexos de quitosana com pesos moleculares e DD diferentes, pode ser deduzido que a citotoxicidade depende do grau de deacetilação (DD) e do peso molecular

Como também é oportuno lembrar que esses resultados diferentes encontrados com quitosana sobre a viabilidade celular pode ser devido também a diferentes tipos celulares e diferentes métodos de preparo.

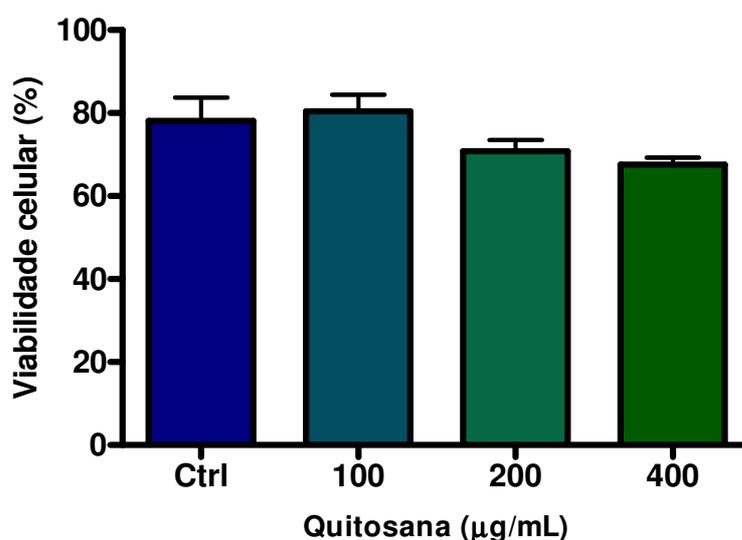


Figura 28 – Efeito da quitosana na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos suíços avaliada após 24h de exposição, pelo corante azul de trypan. Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI na presença do carboidrato por 24h em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata (n=2). Teste “t –Student”.

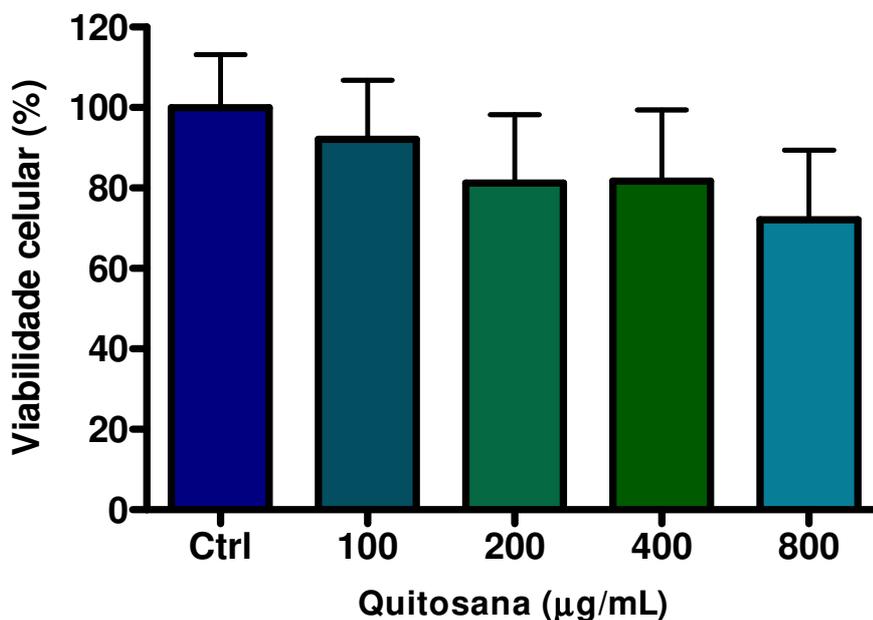


Figura 29 – Efeito da quitosana na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos suíços avaliada após 24h de exposição, pelo ensaio do MTT. Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI na presença do carboidrato por 24h em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata (n=2).

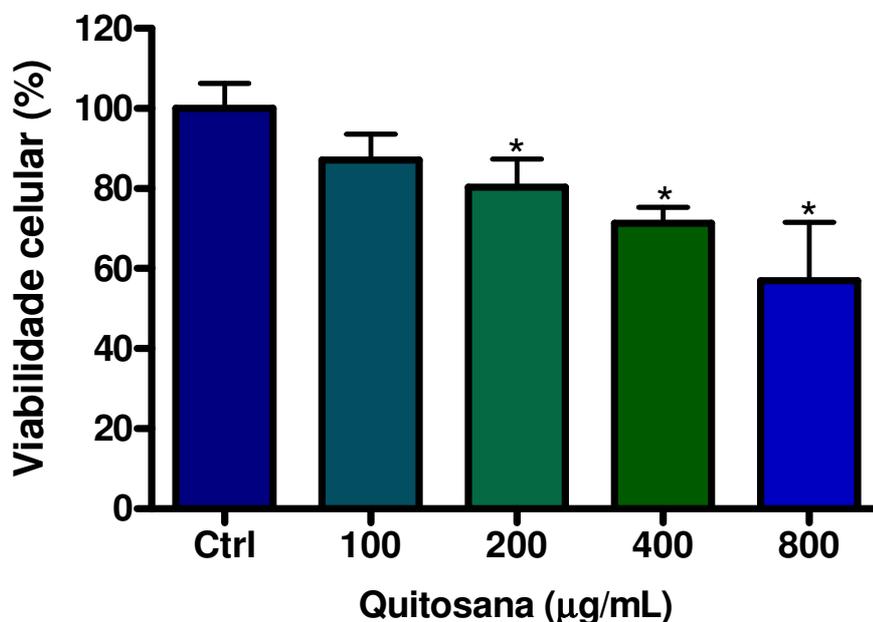


Figura 30 – Efeito da quitosana na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos suíços avaliada após 48h de exposição, pelo ensaio de exclusão do corante azul de trypan. Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI na presença do carboidrato por 48h em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata (n=2). (*P < 0.05 no teste “t –Student”).

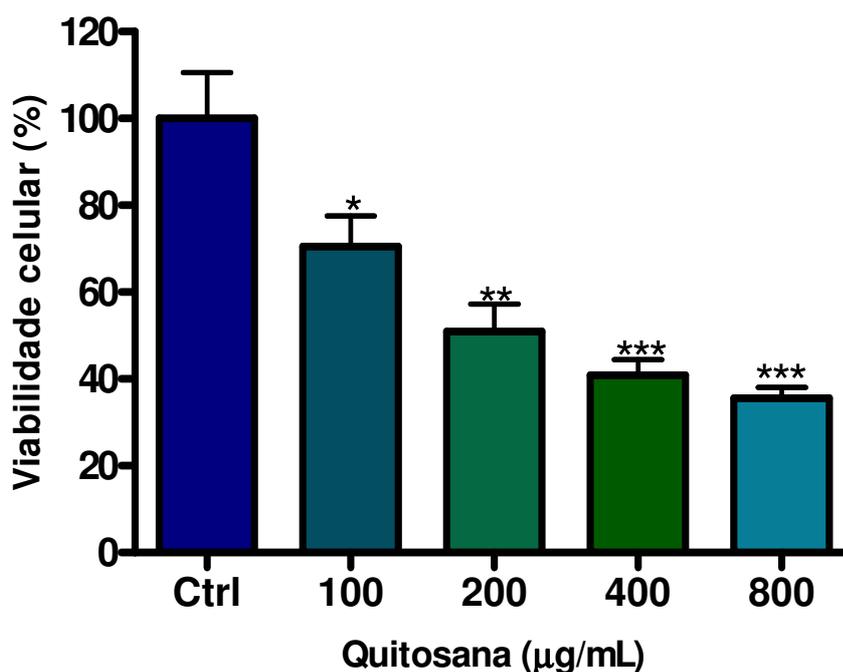


Figura 31 – Efeito da quitosana na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos suíços avaliada após 48h de exposição, pelo ensaio do MTT. Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI na presença do carboidrato por 48h em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata (n=2). (*P < 0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 no teste “t –Student”).

4.5- Avaliação da citotoxicidade do Glucantime sobre macrófagos murinos

A citotoxicidade da droga de referência, Glucantime, sobre macrófagos murinos, avaliada pelo ensaio de exclusão do azul de trypan, está documentada na figura 32.

Foi verificado que o Glucantime a partir da concentração de 2,5mg/mL já demonstra uma citotoxicidade significativa sobre macrófagos. Entretanto na concentração de até 8mg/mL, não houve inibição significativa no crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* como visto nas figuras 18 e 19, respectivamente. Portanto o Glucantime demonstra ser mais tóxico para os macrófagos murinos do que para os parasitas em estudo.

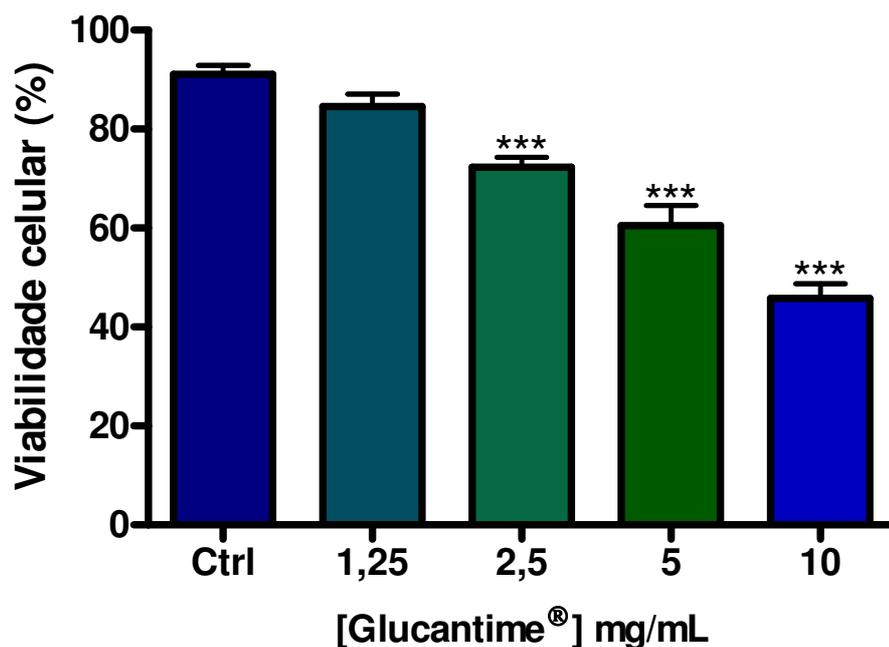


Figura 32 – Efeito do Glucantime na viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos suíços avaliado após 24h de exposição pelo corante azul de trypan. Os macrófagos foram mantidos em meio RPMI na presença da droga de referência por 24h em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata (n=4). (***)p<0.001 no teste “t-Student”.

4.6. Modulação da infecção de macrófagos murinos com promastigotas de *Leishmania chagasi*

4.6.1. Efeito da lignana iangambina sobre a infecção de macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania chagasi*

Os resultados obtidos no modelo de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos suíços infectados com *L. chagasi* e tratados com a iangambina por 24h estão expressos nas figuras 33 e 34. Na figura 33 é relatado que, após 24h de exposição, os níveis de infecção dos macrófagos tratados foram semelhantes aos não tratados. Na figura 34 está expresso o número de amastigotas por macrófago infectado mostrando uma equivalência no número de amastigotas por macrófago infectado nas células tratadas e não tratadas com a iangambina. Após 48h de exposição à iangambina, houve uma redução na percentagem de macrófagos infectados em relação ao controle na

concentração de 200µg/mL (Figura 35). No entanto não houve redução significativa no número de amastigotas por macrófago infectado em relação ao controle (Figura 36). Após 72h de exposição à lignana foi observado que houve uma redução na percentagem de macrófagos infectados nas três concentrações testadas quando comparado ao controle (Figura 37), no entanto não houve uma redução expressiva no número de amastigotas por macrófago infectado (Figura 38). Na figura 39 é documentada uma amostragem do resultado da infecção dos macrófagos após 72h de exposição à iangambina, observado sob microscopia óptica. O efeito anti-amastigota desta lignana foi semelhante ao apresentado pelo Glucantime, droga de referência, após 48h e 72h de exposição.

Sauvain e colaboradores (1996) apud Chan-Bacab & Pena-Rodriguez (2001) estudando as lignanas medioresinol e liriioresinol B demonstraram que estas foram ativas contra formas amastigotas de *L. amazonensis*. Portanto os resultados obtidos com a iangambina reforçam a potencialidade na terapêutica nas leishmanioses desta classe de lignóides.

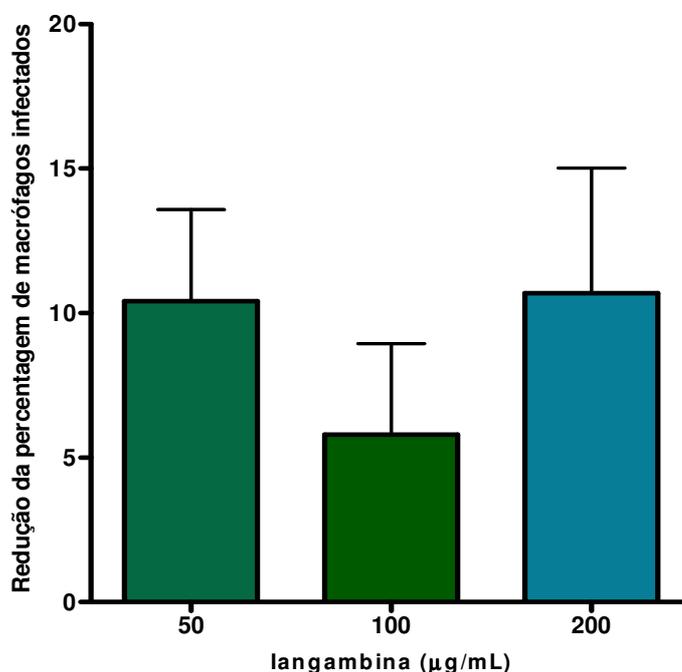


Figura 33 – Redução da percentagem de macrófagos infectados na presença de iangambina em relação ao controle após 24h de incubação. Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. chagasi* na proporção 10 promastigotas por macrófago, e mantidos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). Teste “t-Student”.

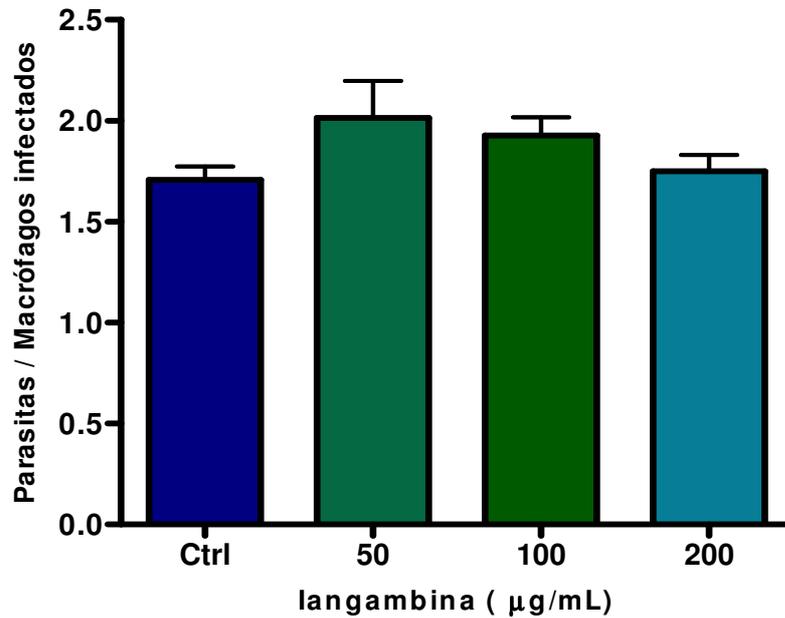


Figura 34 – Número de amastigotas por macrófagos infectados em cultura de macrófagos infectados com *L. chagasi* e incubados na presença de diferentes concentrações de Iangambina por 24h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6).

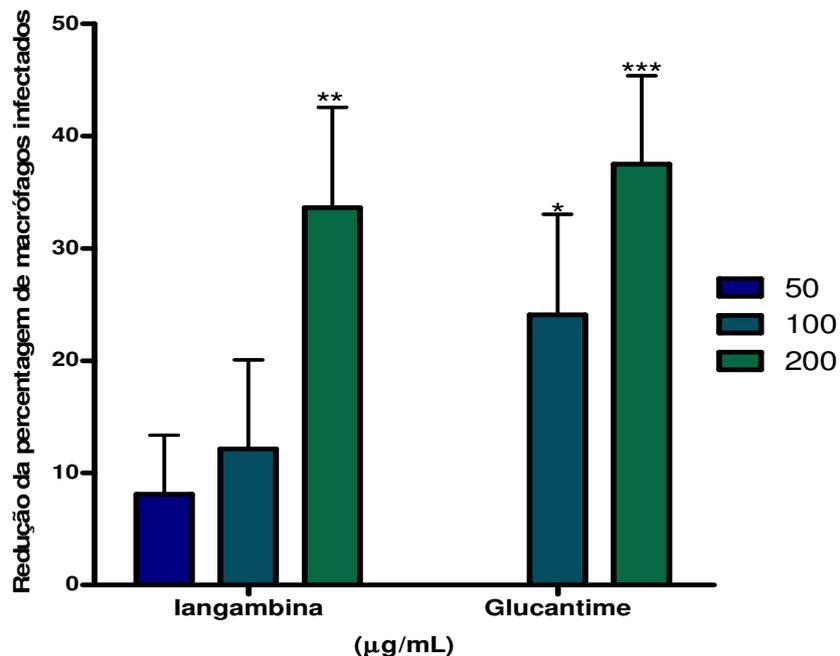


Figura 35 – Redução da percentagem de macrófagos infectados na presença de Iangambina em relação ao controle após 48h de incubação. Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. chagasi* na proporção 10 promastigotas por macrófago, e mantidos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). (*P < 0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 no teste “t –Student”).

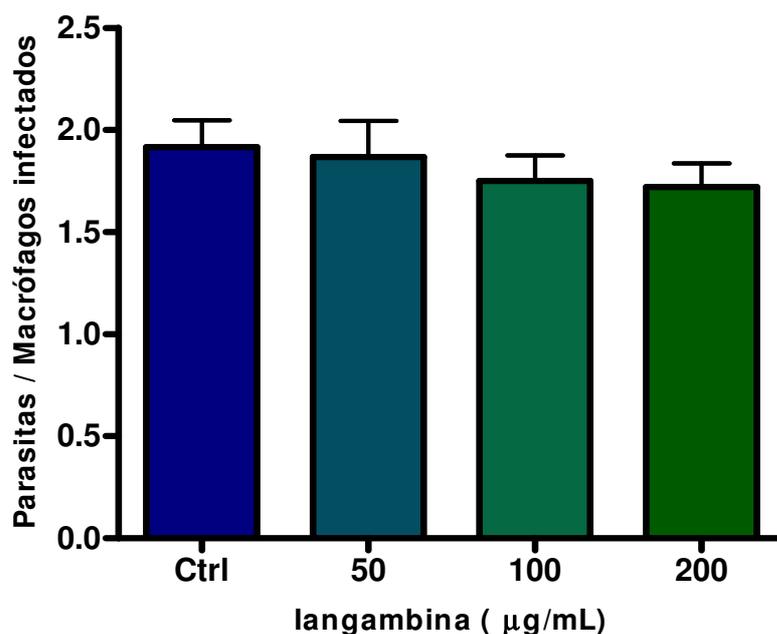


Figura 36 – Número de amastigotas por macrófagos infectados em cultura de macrófagos infectados com *L. chagasi* e incubados na presença de diferentes concentrações de iangambina por 48h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6).

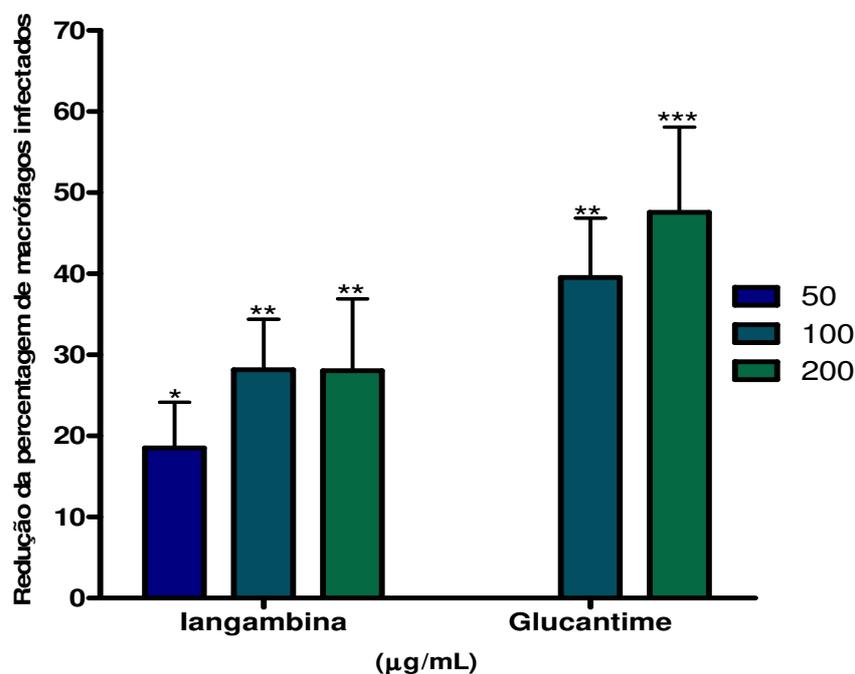


Figura 37 – Redução da percentagem de macrófagos infectados na presença de iangambina em relação ao controle após 72h de incubação. Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. chagasi* na proporção 10 promastigotas por macrófago, e mantidos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). (*P < 0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 no teste "t –Student").

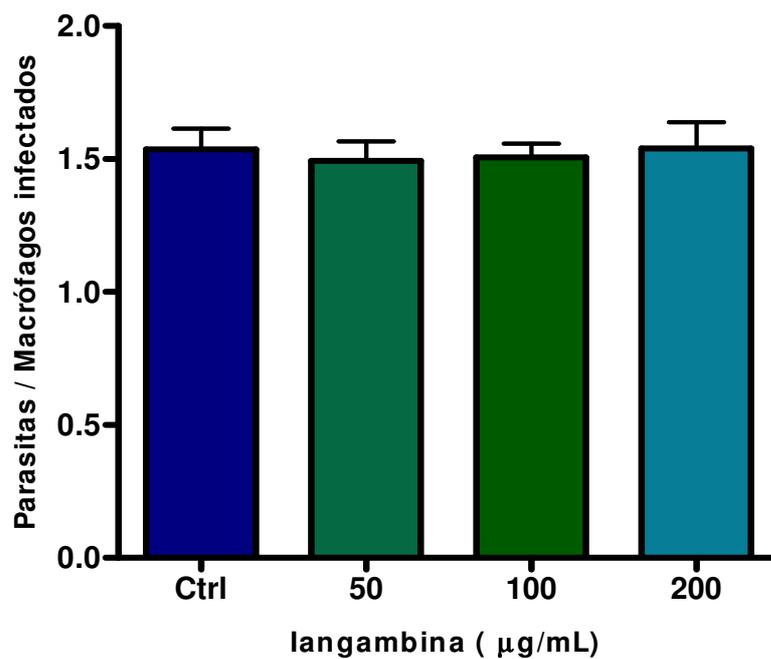


Figura 38. Número de amastigotas por macrófagos infectados em cultura de macrófagos infectados com *L. chagasi* e incubados na presença de diferentes concentrações de iangambina por 72h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6).

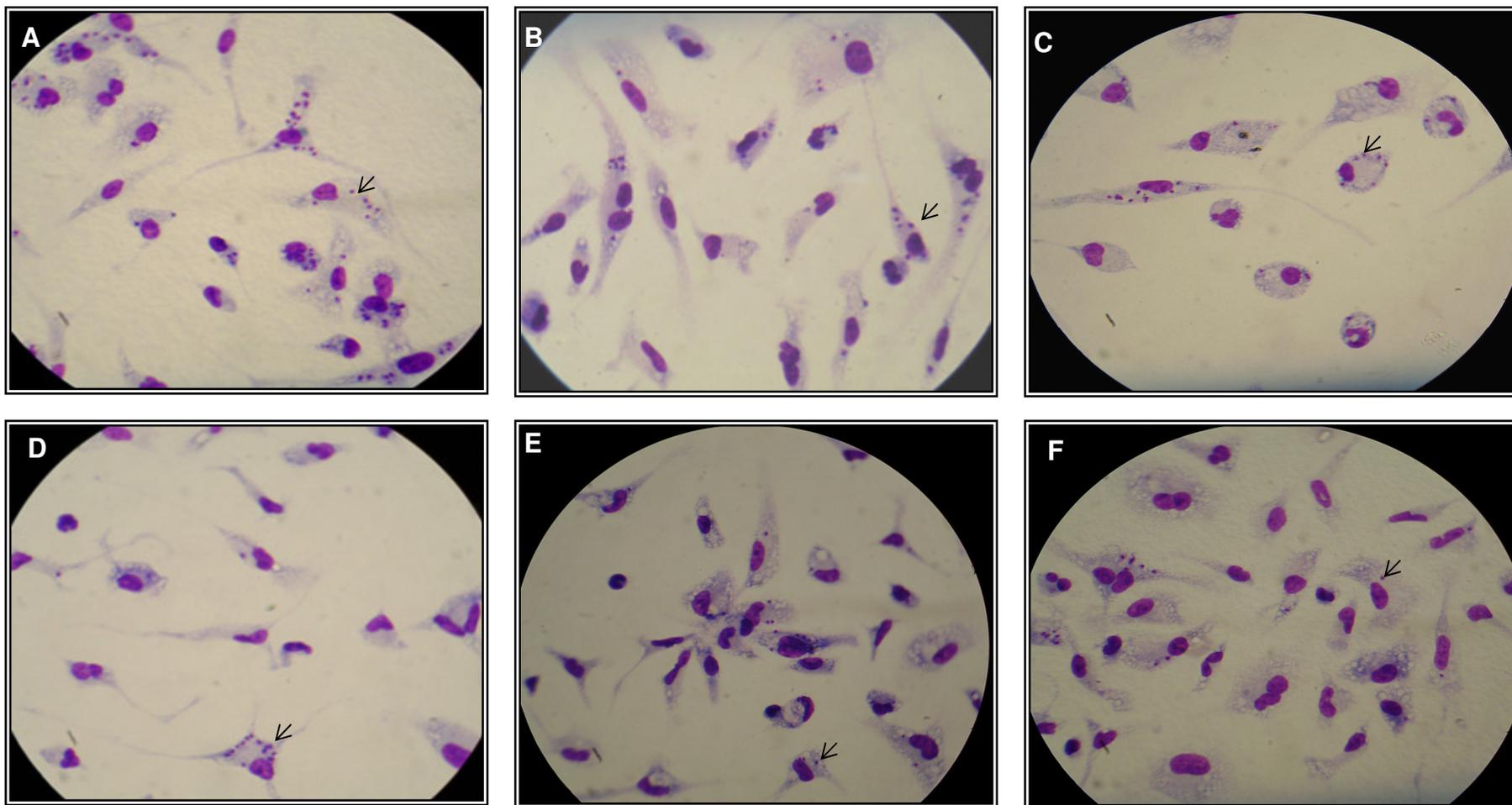


Figura 39 – Macrófagos infectados experimentalmente com formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (10:1) e incubados durante 72 horas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. (A) Controle. (B) Presença da iangambina na concentração de 50µg/mL. (C) Presença da iangambina na concentração de 100µg/mL. (D) Presença da iangambina na concentração de 200µg/mL. (E) Presença do Glucantime na concentração de 100µg/mL. (F) Presença do Glucantime na concentração de 200µg/mL. As setas indicam as formas amastigotas internalizadas. AF = 1000x.

A capacidade da iangambina reduzir a infecção de macrófagos murinos infectados com *L. chagasi*, pode ser explicada por um efeito direto desta lignana sobre o parasita no interior dos macrófagos. Considerando que a iangambina é significativamente mais tóxica para as formas promastigotas de *L. chagasi* do que para os macrófagos murinos, pode-se levantar a hipótese desta lignana, no interior dos macrófagos, estar exercendo o seu efeito antileishmania diretamente sobre o parasita.

Outra hipótese para explicar a capacidade da iangambina reduzir a infecção de macrófagos é um possível efeito indireto desta lignana, devido à sua atividade anti-PAF. A iangambina tem apresentando atividade anti-PAF em modelos experimentais *in vitro* (FARIA NETO et al., 1995a) e *in vivo* (Faria Neto et al. 1995b). Rosa e colaboradores (2001) mostraram que promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com PAF, antes da infecção, resulta em um aumento na infecção de macrófagos murinos. De forma semelhante, Dutra e colaboradores (2009) observaram que na infecção de macrófagos com *L. tropica*, as promastigotas tratadas com PAF aumentam a infecção de macrófagos. Portanto, pode-se considerar a hipótese desta lignana estar inibindo a infecção de macrófagos através de mecanismos que envolvam o antagonismo do PAF em nível de parasita

No entanto, alguns trabalhos vêm relatando a importância do PAF em conter a infecção de macrófagos murinos quando infectados por *Leishmania* sp. [LONARDONI et al., (1994); LONARDONI et al., (2000); ROSA et al., (2001)]. Lonardoni e colaboradores (2000) mostraram que o PAF tem atividade antileishmania em macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* inibindo o crescimento do parasita e induzindo a produção de NO. Rosa e colaboradores (2001) também mostraram a importância do PAF em inibir a infecção quando macrófagos ou ambos, parasitas e macrófagos, foram tratados com este lipídio.

Dada a importância do PAF em modular a infecção de macrófagos com *Leishmania* já relatada acima, e já ter sido documentado um efeito anti-PAF da iangambina, a hipótese mais provável para explicar a redução da infecção dos macrófagos observada no presente trabalho, é que a iangambina pode estar exercendo o seu efeito antileishmania atuando diretamente sobre o parasita no interior do macrófago.

4.6.1.1. Avaliação da produção de óxido nítrico na presença da iangambina

A produção de óxido nítrico (NO) em sobrenadante de culturas de macrófagos infectados com *L. chagasi* e tratados com diferentes concentrações da iangambina está expresso nas figuras 40, 41 e 42, para os tempos de exposição de 24h, 48h e 72h, respectivamente. Após 24h de incubação (Figura 40), a produção de NO foi igual ao controle. Aos 48h de exposição à iangambina (Figura 41), na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ houve uma produção de NO menor que o controle, e nas concentrações maiores a produção foi igual. No período de 72h (Figura 42) a produção foi menor que o controle nas três concentrações avaliadas.

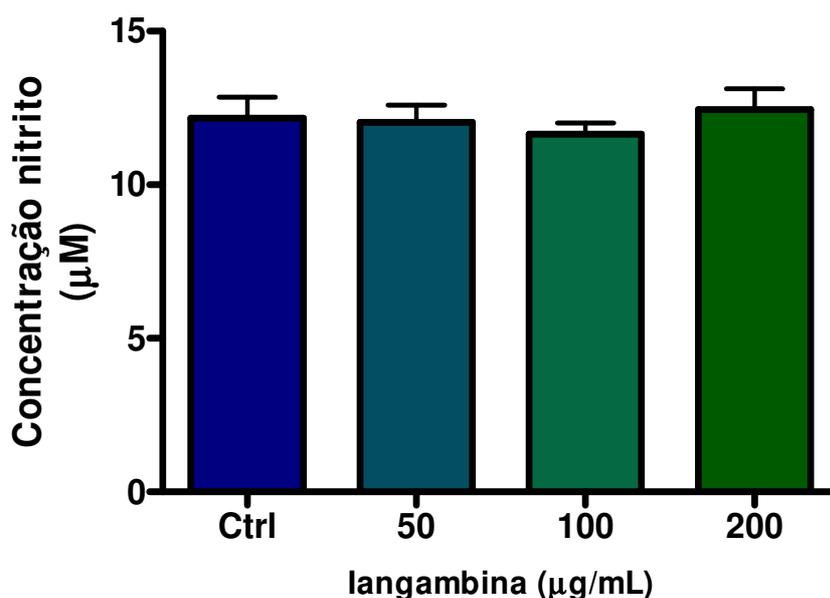


Figura 40 – Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* na presença de diferentes concentrações da iangambina após 24h de incubação. As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de três experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). A produção de NO foi mensurada utilizando reagente de Griess. (Teste “t –Student”).

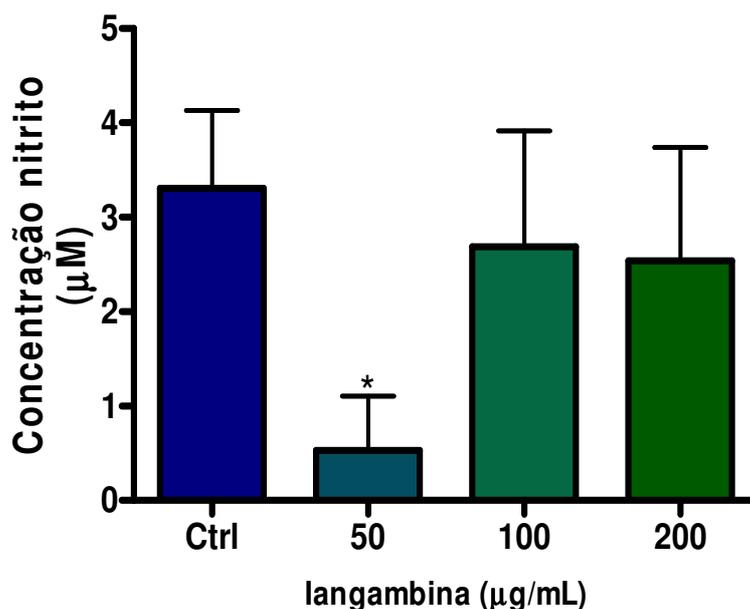


Figura 41 – Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* na presença de diferentes concentrações da iangambina após 48h de incubação. As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de três experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). A produção de NO foi mensurada utilizando reagente de Griess. (*P < 0.05 no teste “t –Student”).

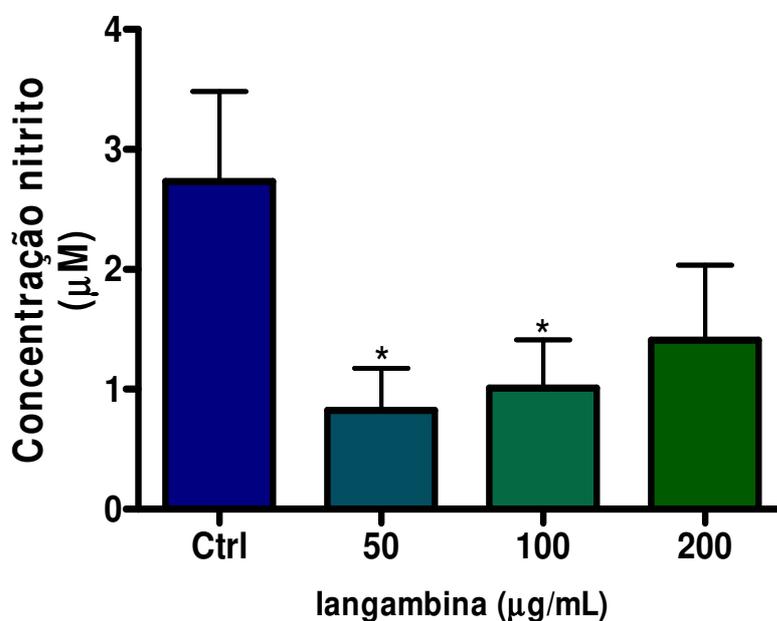


Figura 42 – Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* na presença de diferentes concentrações da iangambina após 72h de incubação. As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de três experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). A produção de NO foi mensurada utilizando reagente de Griess. (*P < 0.05 no teste “t –Student”).

Tem sido demonstrado em modelos murinos que a morte intracelular de amastigotas é correlacionada com a síntese de nitrito, um produto estável da degradação do óxido nítrico (NO), que é considerada como a principal molécula responsável pela eliminação do parasita (GREEN et al., 1990). A produção de NO por macrófagos é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que utiliza L-arginina como substrato. A capacidade de macrófagos matarem amastigotas de *Leishmania* tem sido correlacionada com a capacidade de produção de NO por estes. Contudo, além da produção de NO, outro mecanismo associado à atividade antileishmania de macrófagos ativados é a produção de moléculas reativas de oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HUGHES, 1988; MURRAY & NATHAN, 1999).

Esses resultados mostram que o efeito antileishmania encontrado com a iangambina sobre macrófagos infectados com *L. chagasi* provavelmente não é pela indução da produção de NO pelos macrófagos, já que não houve aumento na produção de NO como visto acima.

4.6.1.2. Avaliação da produção do fator de necrose tumoral α na presença da iangambina

Na figura 43 estão expressos os valores encontrados para o fator de necrose tumoral α (TNF- α) dosados nos sobrenadantes de culturas de macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* e tratados com a iangambina durante 72h. Foi observado que os níveis de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de macrófagos na presença da iangambina foram equivalentes aos níveis observados na ausência desta lignana. Portanto, a atividade antiamastigota apresentada pela iangambina não é dependente da produção de TNF- α .

Liew e colaboradores (1990) mostraram que o TNF- α induz atividade leishmanicida de macrófagos contra *L. major* através da produção de NO pela via da L-arginina. Os resultados encontrados para o NO (Figuras 40, 41 e 42) e TNF- α (Figura 43), mostram que a atividade antiamastigota da iangambina não é pela via de indução da produção de NO pelos macrófagos.

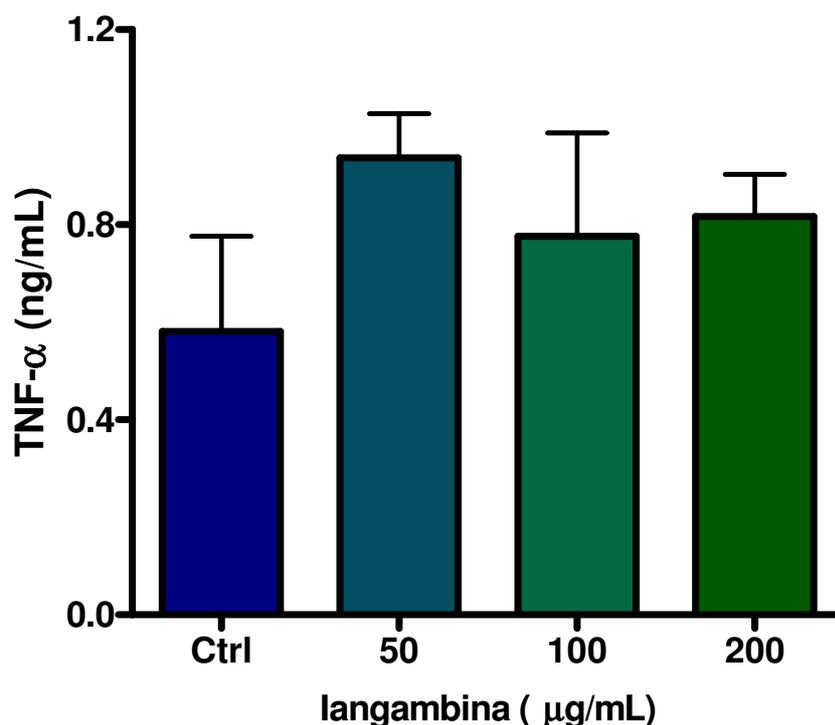


Figura 43 – Produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α) por macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* na presença de diferentes concentrações da iangambina. As células foram cultivadas por 72h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de três experimentos independentes realizados em duplicata (n=6).

4.6.2. Efeito de complexos de quitosana sobre a infecção de macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania chagasi*

Na figura 44 estão os valores encontrados para infecção de macrófagos com promastigotas de *L. chagasi* e tratados com complexos de quitosana durante 48h. Na concentração de 50 µg/mL foi observada uma redução significativa na percentagem de macrófagos infectados em relação ao controle. Em relação ao número de amastigotas por macrófago infectado (Figura 45) não houve uma redução significativa neste aspecto. No tempo de 72h de tratamento (Figura 46) as duas concentrações estudadas, 25 µg/mL e 50 µg/mL, resultaram em uma redução significativa na percentagem das células infectadas. Adicionalmente, foi observada uma redução significativa no número de amastigotas por macrófago infectado na concentração de 50µg/mL em relação ao controle (Figura 47). Na figura 48 pode-se observar uma amostragem do resultado da infecção dos

macrófagos após 72h de exposição à quitosana, observado sob microscopia óptica.

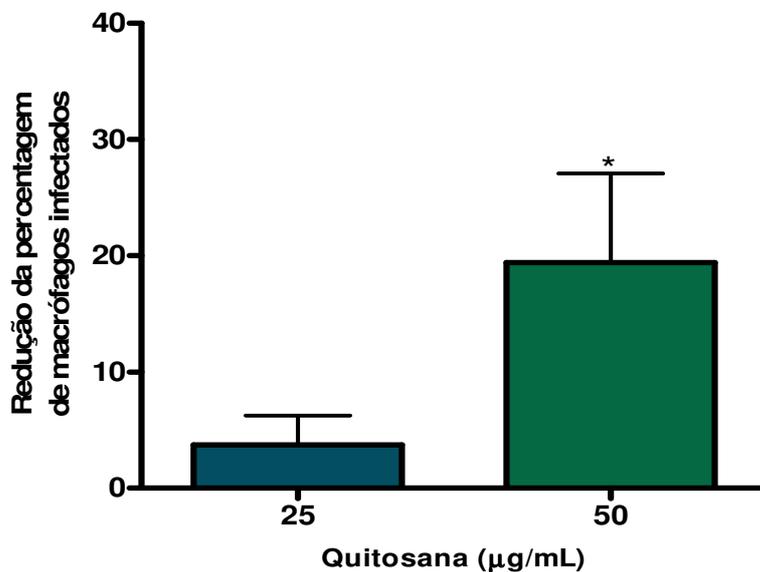


Figura 44 – Redução da percentagem de macrófagos infectados e incubados na presença de quitosana em relação ao controle após 48h de exposição. Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. chagasi* na proporção 10 promastigotas por macrófago, e mantidos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). (*P < 0.05 no teste “t –Student”).

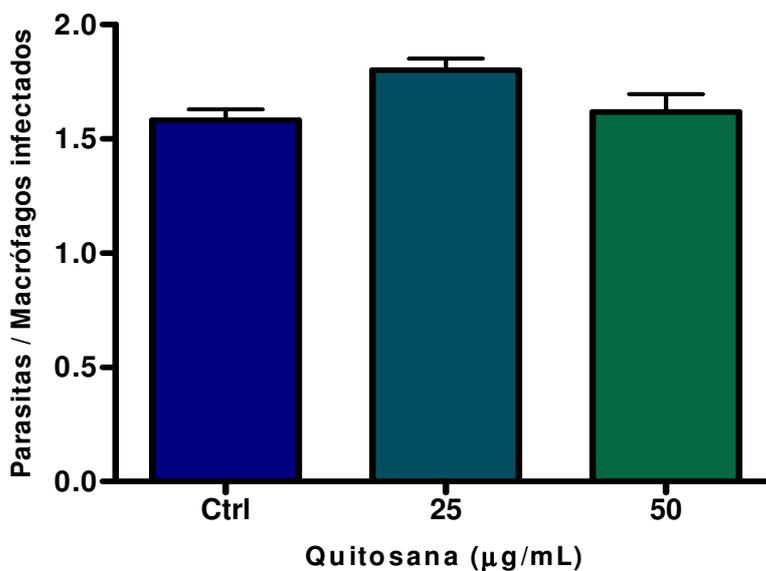


Figura 45 – Número de amastigotas por macrófagos infectados em cultura de macrófagos infectados com *L. chagasi* e incubados na presença de diferentes concentrações de quitosana por 48h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6).

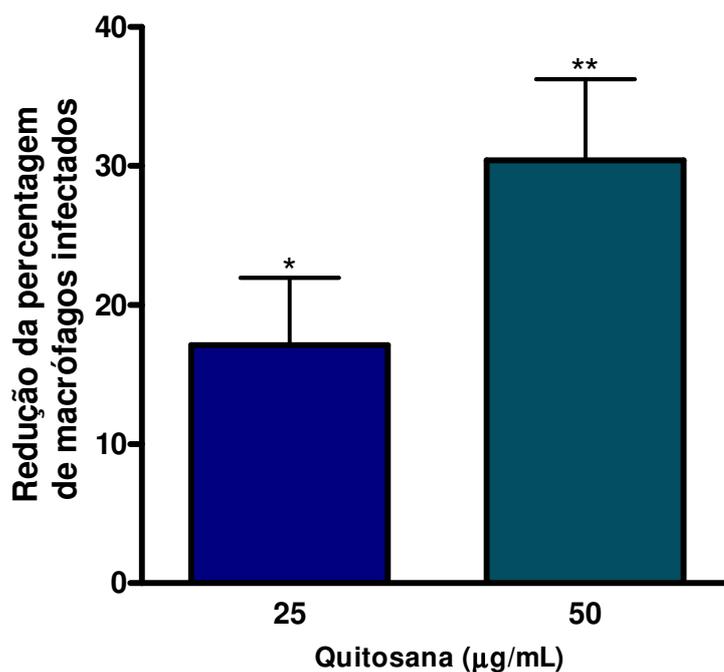


Figura 46 – Redução da percentagem de macrófagos infectados e incubados na presença de quitosana em relação ao controle após 72h de exposição. Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. chagasi* na proporção 10 promastigotas por macrófago, e mantidos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). (*P < 0.05 e **P < 0.01 no teste “t-Student”).

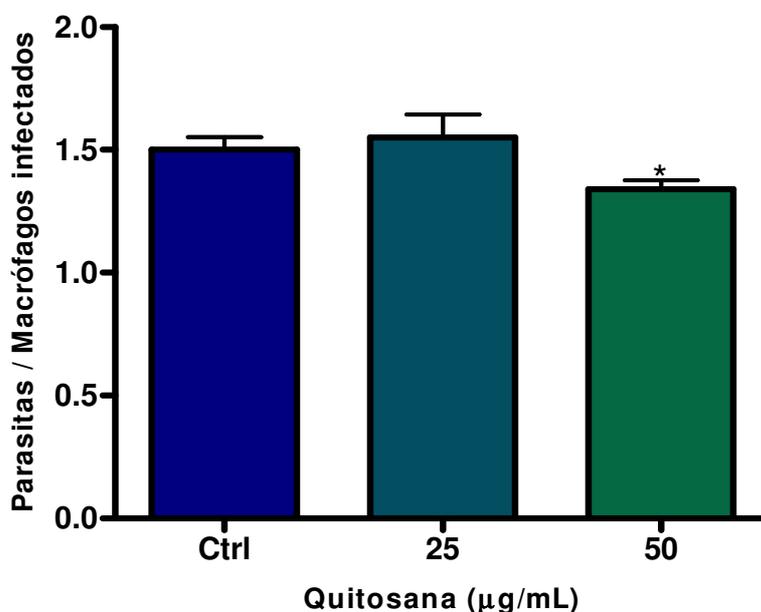


Figura 47 – Número de amastigotas por macrófagos infectados em cultura de macrófagos infectados com *L. chagasi* e incubados na presença de diferentes concentrações de quitosana por 72h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de seis experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). (*P < 0.05 no teste “t-Student”).

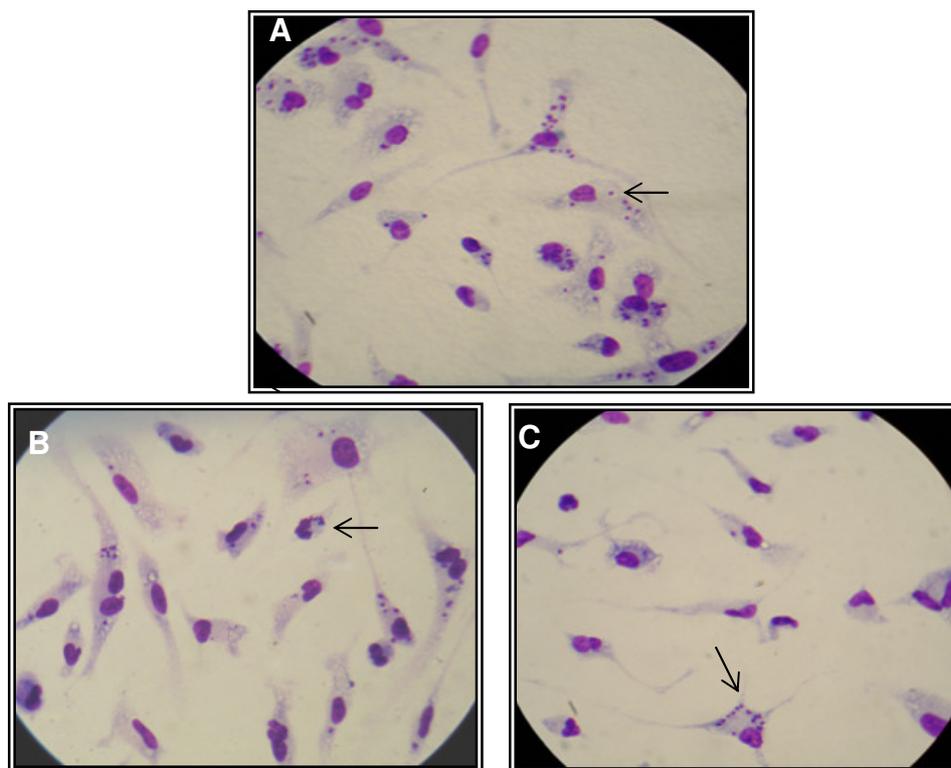


Figura 48 – Macrófagos infectados experimentalmente com formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (10:1) e incubados durante 72 horas a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂. (A) Controle. (B) Presença da quitosana na concentração de 25µg/mL. (C) Presença da quitosana na concentração de 50µg/mL. As setas indicam as formas amastigotas internalizadas. AF = 1000x.

Pujals e colaboradores (2008) verificaram que complexos de quitosana apresentaram atividade anti-amastigota sobre a espécie de *L. infantum* em macrófagos peritoneais de murinos infectados, gerando um IC₅₀ de 100,81 µg/mL.

Han e colaboradores (2004) verificaram que um tipo de quitosana, oligoquitosana, estimulou a função de macrófagos RAW264.7 por receptores de manose (MR). Foi observado que este receptor foi o responsável maior pela captação dessa quitosana. MR também induziu o aumento da produção de TNF- α . Zhijun e colaboradores (2003) demonstraram também que oligoquitosanas podem aumentar significativamente a atividade da óxido nítrico induzível sintase (iNOS) e induzir a produção de NO e TNF- α em macrófagos através de caminho que envolve o fator nuclear-kB (NF-kB).

Trabalho realizado por Lee e colaboradores (2002) mostraram que um complexo de quitosana aumentou a expressão de mRNA para as citocinas IL-2,

IFN- γ e subunidade IL-12 p40 em células de baço de porco. O IFN- γ ativa macrófagos e estimula as células a secretar citocinas, tais como IL-12, essa citocina é a primeira a ativar células T a produzirem IL-2 e IFN- γ .

Para verificar se os resultados encontrados na infecção de macrófagos com *L. chagasi* e tratados com quitosana se devem a um aumento na expressão dessas citocinas, foram mensurados dos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados a produção de NO e TNF- α .

4.6.2.1. Avaliação da produção de NO na presença de quitosana

Para avaliar uma possível atividade imunomoduladora dessa quitosana sobre macrófagos infectados experimentalmente com *L. chagasi*, foram mensurados os níveis de óxido nítrico presente nos sobrenadantes das culturas destes macrófagos infectados.

Nas figuras 49 e 50 estão demonstrados os resultados para a produção de NO em sobrenadantes de macrófagos infectados com *L. chagasi* e tratados com diferentes concentrações de quitosana por 48h e 72h, respectivamente. Não foi observada uma indução na produção de NO nas culturas de macrófagos tratados com quitosana, apesar dos resultados significativos encontrados em relação à redução percentual de macrófagos infectados (Figuras 44 e 46).

Foi demonstrado por Seang e colaboradores (2000) que a quitosana insolúvel como também a forma solúvel e de alto peso molecular aumenta a produção de óxido nítrico *in vitro* em macrófagos RAW 264.7. A forma insolúvel estimula a produção de NO de forma direta, enquanto a forma solúvel estimula a produção em sinergismo com IFN- γ . Foi observado também que esse resultado da quitosana solúvel é devido à indução da secreção de TNF- α pela via de transdução de sinal de ativação do fator nuclear – Kb. Resultados semelhantes foram encontrados para a quitosana solúvel em associação com IFN- γ por Seo e colaboradores (2000) quando em experimentos utilizaram macrófagos peritoniais e células tumorais de animais Balb/c.

No entanto, no presente trabalho, o efeito antileishmania da quitosana no modelo de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos suíços com *L. chagasi*, não está correlacionado com a produção de NO.

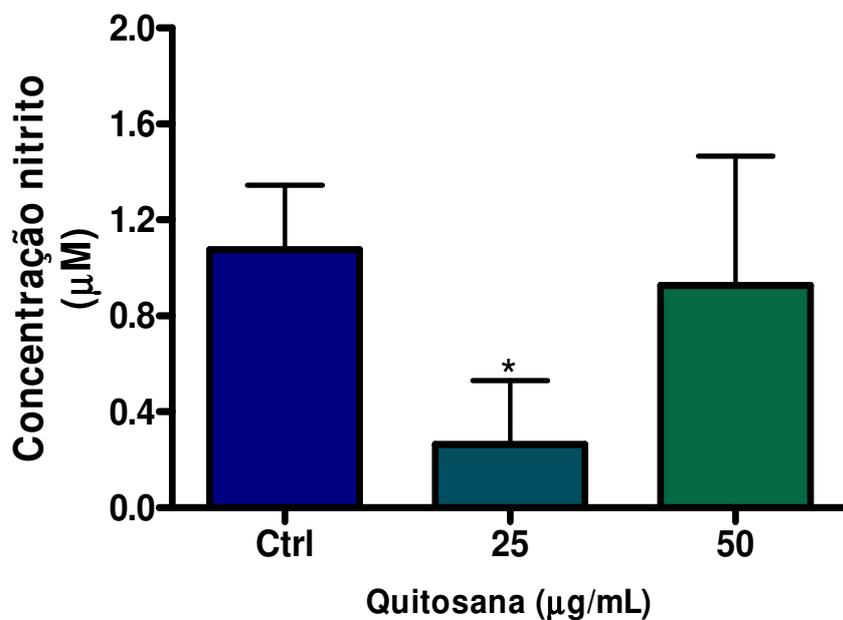


Figura 49 - Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* na presença de diferentes concentrações de quitosana. As células foram cultivadas por 48h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de três experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). (*P < 0.05 no teste "t -Student").

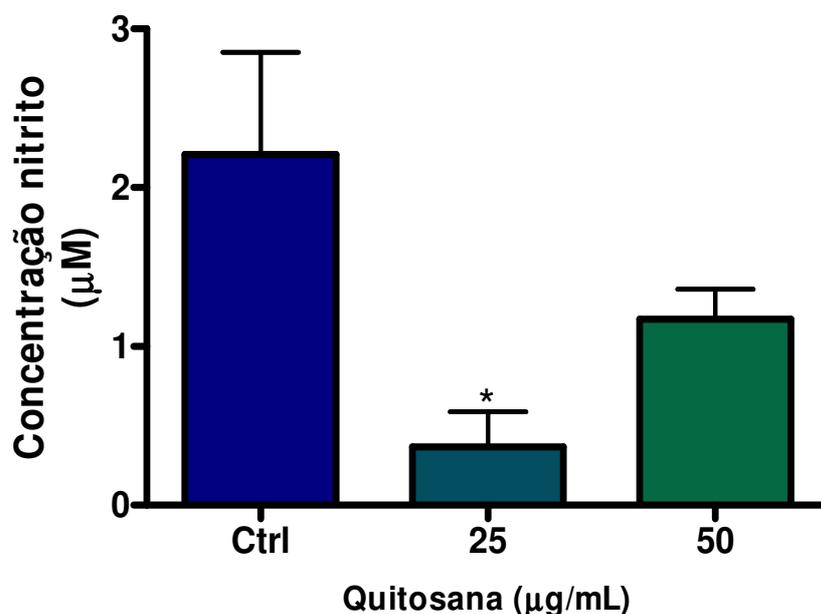


Figura 50 - Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* na presença de diferentes concentrações de quitosana. As células foram cultivadas por 72h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de três experimentos independentes realizados em duplicata (n=6). (*P < 0.05 no teste “t –Student”).

4.6.2.2. Avaliação da produção de TNF- α na presença de complexos de quitosana

Na figura 51 estão expressos os valores encontrados de TNF- α dosados nos sobrenadantes de culturas de macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* e tratados com a quitosana durante 72h. Foi observado que os níveis de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de macrófagos na presença da quitosana foram equivalentes aos níveis observados na ausência deste carboidrato. Portanto, a atividade anti-amastigota apresentada pela quitosana não é dependente da produção de TNF- α .

Como já citado anteriormente LIEW e colaboradores (1990) o TNF- α induz atividade leishmanicida de macrófagos contra *L. major* através da produção de NO pela via da L-arginina. Contudo, os resultados encontrados no presente trabalho para o NO (Figuras 49 e 50) e TNF- α (Figura 51), mostram que a atividade anti-amastigota da quitosana não é pela via de indução da produção de NO pelos macrófagos.

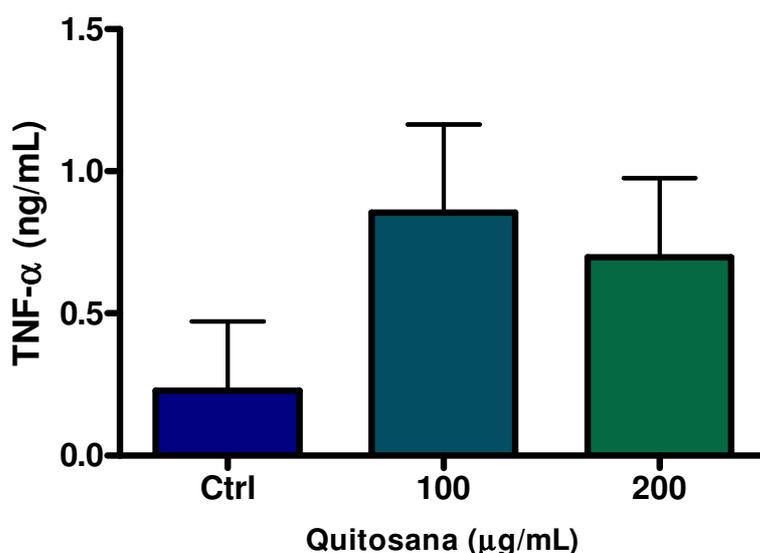


Figura 51 – Produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α) por macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* na presença de diferentes concentrações da quitosana. As células foram cultivadas por 72h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Dados representativos da média de três experimentos independentes realizados em duplicata (n=5).

4.7. Avaliação da atividade antileishmania em camundongos suíços infectados com *Leishmania amazonensis*

4.7.1. Atividade da iangambina e complexos de quitosana no tratamento dos animais

Experimentos *in vivo* foram feitos utilizando camundongos suíços infectados com *L. amazonensis* e tratados por via oral, para verificar se a iangambina, complexos de quitosana e iangambina associada à quitosana poderiam produzir uma resposta no tratamento da leishmaniose cutânea destes animais. Os camundongos foram tratados por oito semanas, e semanalmente as patas eram medidas e os animais pesados. Na figura 52 estão os valores encontrados para o tamanho de lesão. O grupo de animais tratados com a iangambina (25mg/kg) mais quitosana (50mg/kg), e os animais tratados somente com a quitosana (50mg/kg) tiveram o tamanho da lesão reduzido significativamente na oitava semana de tratamento em relação ao controle, com uma diminuição de 18,7% e 24,3%, respectivamente. Com a droga de referência, o Glucantime, verificou-se uma redução no tamanho da lesão a partir da sétima

semana, se mantendo até a oitava, com uma redução na lesão da pata de 21,7% e 31,3%, respectivamente. O tratamento apenas com a iangambina não resultou em alterações no tamanho da lesão dos animais.

Em todos os grupos tratados não foram observadas alterações no peso dos animais durante o período de tratamento (Figura 53), o que significa que as drogas não produzem efeitos colaterais, no que se refere ao ganho ou perda de peso.

Os resultados encontrados demonstram que a associação entre a iangambina e a quitosana não interfere com a atividade desta lignana no desenvolvimento da lesão dos animais infectados. Resultados significativos encontrados dessa associação na oitava semana de tratamento, provavelmente, foi devido à quitosana, já que os animais tratados apenas com esse carboidrato tiveram uma redução expressiva no tamanho da pata infectada, enquanto que o grupo tratado só com a iangambina se comportou como o grupo controle.

Este efeito protetor da quitosana pode ser atribuído a uma capacidade deste carboidrato modular a resposta imunológica dos animais. Foi observado por Lee e colaboradores (2002) que complexos de quitosana aumentam a expressão de mRNA para as citocinas IL-2, IFN- γ e subunidade IL-12 p40 em células de baço de porco. Em modelo murino de infecção com *Leishmania major*, estas citocinas são produzidas por linfócitos do tipo Th1 e estão relacionadas com o controle da infecção. É possível que o tratamento com a quitosana possa estar induzindo a expressão destas citocinas no modelo de infecção em estudo.

Existem relatos demonstrando que complexos de quitosana podem otimizar o efeito de alguns medicamentos. Foi observado por Pujals e colaboradores (2008), estudando um complexo de quitosana associado ao Glucantime, que houve um aumento significativo da atividade anti-amastigota deste medicamento após a associação com o carboidrato. Contudo, embora os ensaios de DSC sugerem uma associação entre a iangambina e a quitosana, esta associação não interferiu na atividade antileishmania da iangambina, nem do complexo de quitosana.

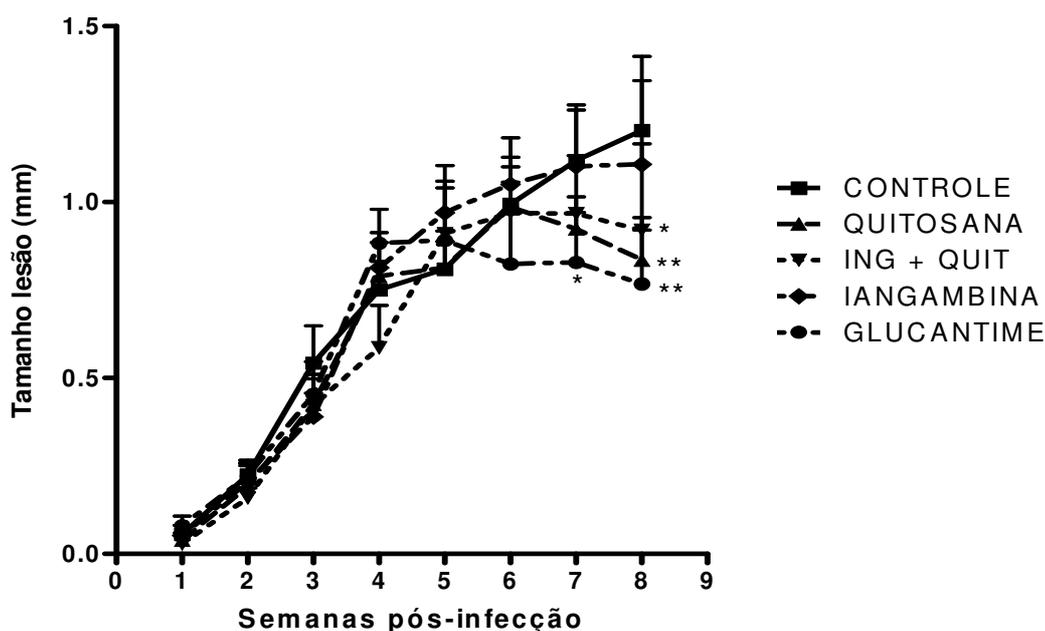


Figura 52 – Efeito da iangambina, iangambina associada à quitosana e quitosana na espessura da pata de camundongos infectados com 1×10^6 promastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados via oral. A espessura da pata foi medida semanalmente. Dados representativos da média de oito animais por grupo. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com água destilada. (* $P < 0.05$ e ** $p < 0.01$ no teste “t –Student”).

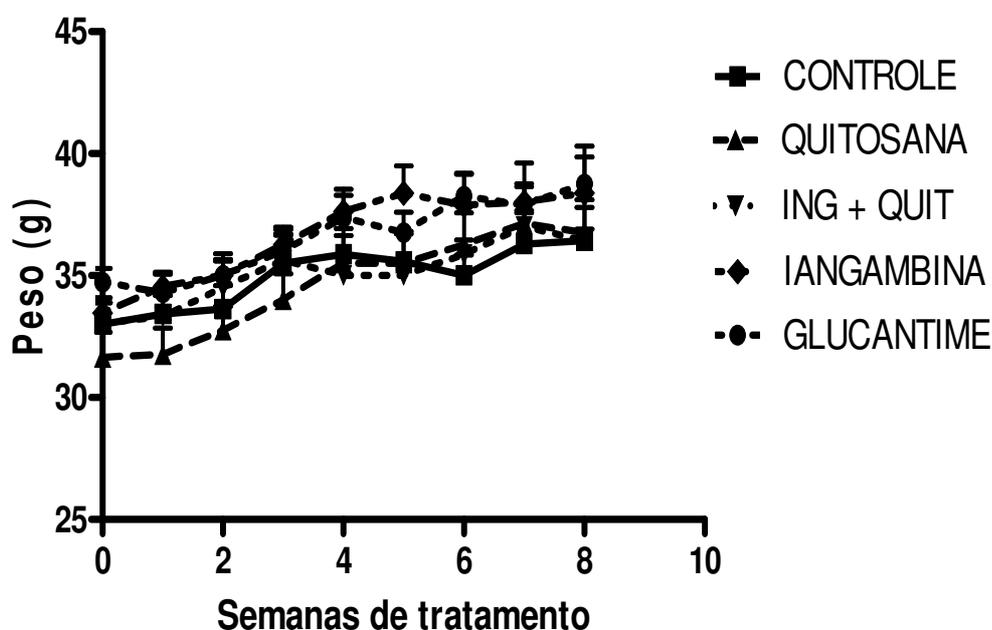


Figura 53 – Efeito da iangambina, iangambina associada à quitosana e quitosana sobre o peso dos camundongos infectados com 1×10^6 promastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados via oral. O peso dos animais foi medido semanalmente. Dados representativos da média de oito animais por grupo. (Teste “t –Student”).

Outro aspecto avaliado no tratamento dos animais foi à carga parasitária da pata e linfonodo poplíteo que drena a região da lesão. Após a oitava semana de tratamento esses animais foram sacrificados e a carga parasitária da pata e linfonodo poplíteo foram determinadas através de diluições sucessivas. Na figura 54 estão os valores encontrados da carga parasitária da pata dos animais que receberam tratamento, sendo observado que, em todos os grupos os animais tiveram uma redução significativa em relação ao controle. Os resultados encontrados para a carga parasitária do linfonodo poplíteo estão expressos na figura 55. Houve uma redução significativa na carga parasitária dos animais tratados com a iangambina, quitosana e Glucantime. Foi verificado que apenas os animais que receberam o tratamento da iangambina associada à quitosana não tiveram redução significativa na carga parasitária em relação ao controle.

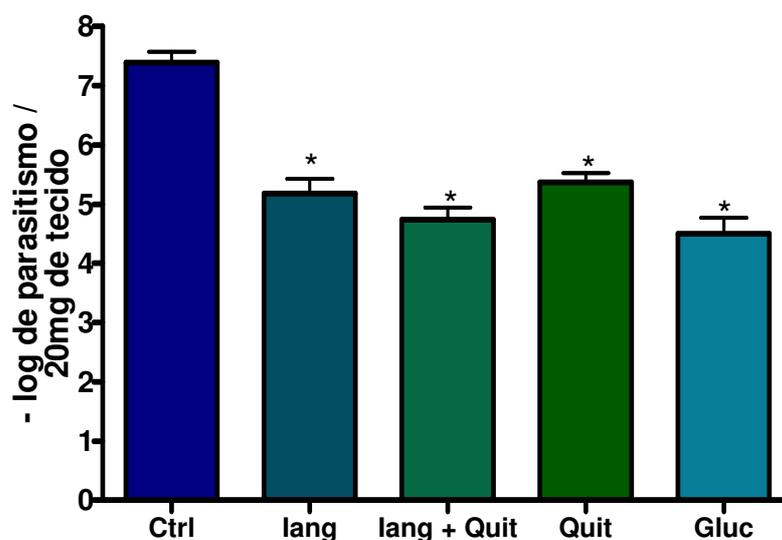


Figura 54 – Efeito da iangambina, iangambina associada à quitosana e quitosana na carga parasitária da pata dos animais infectados com 1×10^6 promastigotas de *L. amazonensis* e tratados via oral. Dados representativos da média de 5 animais por grupo. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com água destilada. (* $P < 0.05$ no teste “t –Student”).

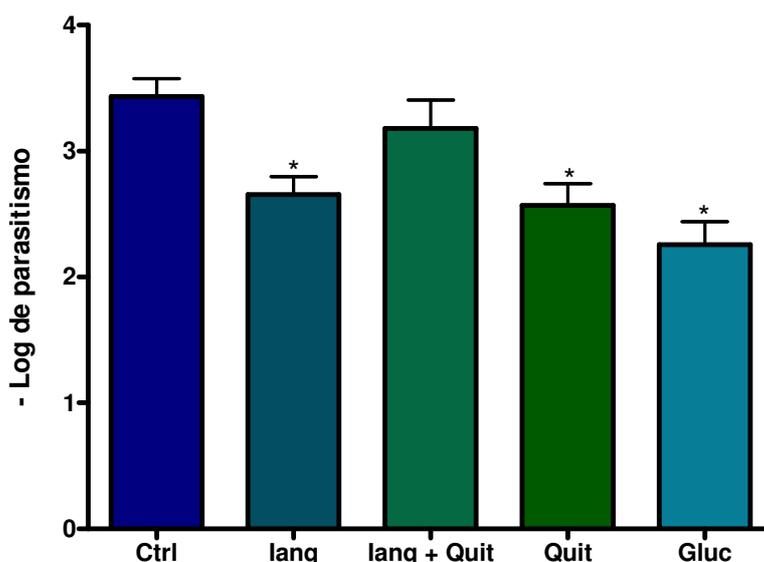


Figura 55 – Efeito da iangambina, iangambina associada à quitosana e quitosana na carga parasitária do linfonodo poplíteo dos animais infectados com 1×10^6 promastigotas *L. amazonensis* e tratados via oral. Dados representativos da média de 5 animais por grupo. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com água destilada. (* $P < 0.05$ no teste “t – Student”).

Portanto, embora o tratamento com a iangambina via oral não tenha resultado em uma diminuição do tamanho da lesão houve uma redução significativa na carga parasitária, tanto da lesão, como do linfonodo poplíteo. Estes resultados registram um efeito eficaz no tratamento da leishmaniose cutânea em camundongos suíços via oral com a iangambina.

Monte Neto (2007), trabalhando com o mesmo modelo de infecção *in vivo* utilizado no presente trabalho, e tratando os animais via intralesional e intraperitoneal, também não observou nenhum efeito da iangambina no tamanho das lesões dos animais. Contudo, não foi avaliado por este autor, um possível efeito destes tratamentos na carga parasitária dos animais.

A atividade da iangambina na redução da carga parasitaria da pata e linfonodo estão plotados nas figuras 56 e 57, respectivamente. Estes resultados mostram que a iangambina, além de um efeito *in vitro* sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, apresentou também um efeito *in vivo* sobre este parasita no modelo de infecção em camundongos suíços.

Uma hipótese para esta atividade antileishmania *in vivo*, é um possível efeito indireto desta lignana devido à sua atividade anti-PAF. É documentado que

esse lipídeo inibe a produção de citocinas pro - inflamatórias em macrófagos quando estes fagocitam neutrófilos apoptóticos (Fadok et. al, 1998). Zandberge e colaboradores (2004) demonstraram que parasitas de *L. major* são fagocitados primeiro por neutrófilos apoptóticos e estes ingeridos posteriormente por macrófagos. Nesse caso, pode-se levantar a hipótese de que a iangambina está antagonizando os receptores de PAF presentes nos macrófagos, promovendo a síntese de citocinas pro-inflamatórias que podem estar ativando mecanismos de contenção do parasita e conseqüente diminuição da carga parasitária na pata e linfonodo dos animais tratados com esta lignana.

Contudo, a importância de PAF *in vivo* na contenção da leishmaniose tegumentar em modelo murino foi documentada por Santiago e colaboradores (2006). Estes autores investigaram a função do receptor desse lipídio no resultado da infecção de camundongos isogênicos com *Leishmania amazonensis*. Animais deficientes para o receptor de PAF foram infectados e o curso da infecção foi monitorado. Os animais tiveram um aumento no tamanho da lesão, na carga parasitária da pata e linfonodo maior que os animais tipo controle, com retardo na produção de IFN- γ . Considerando a atividade anti-PAF da iangambina já documentada (FARIA NETO et al. 1995b); para explicar a atividade antileishmania *in vivo* desta lignana no presente trabalho, é mais provável que a iangambina esteja exercendo um efeito citotóxico direto sobre o parasita no interior dos macrófagos pelos resultados encontrados *in vitro* para promastigotas e amastigotas para espécie de *L. amazonensis*.

Estudos mais aprofundados sobre o mecanismo de ação desta lignana devem ser feitos para averiguar como este produto natural está agindo devido aos resultados antileishmania encontrados tanto *in vitro* como *in vivo*.

4.7. 2. Avaliação de complexos de quitosana no tratamento dos animais

Devido aos resultados antileishmania significativos encontrados com a quitosana tanto *in vitro* como *in vivo*, um novo tratamento utilizando camundongos infectados com *L. amazonensis* foi feito, usando doses maiores deste carboidrato, também por via oral, durante 10 semanas. Na figura 56 estão plotados os valores referentes ao desenvolvimento do tamanho da lesão nos diferentes grupos

experimentais. Na dose de 50mg/kg, a partir da oitava semana de tratamento, foi observado uma diminuição significativa na espessura da pata em relação ao controle. Resultado semelhante foi encontrado no ensaio anterior, confirmando o efeito da quitosana na redução do tamanho da lesão com esta dose de tratamento via oral.

No entanto, na dose de 200mg/mL não houve diminuição no tamanho da pata, e sim um aumento significativos nas 7 e 8 semanas em relação ao controle. Embora existam relatos de que complexos de quitosana podem induzir a produção de citocinas do tipo Th1, associadas à resistência a infecção experimental com *Leishmania* (LEE et al, 2000). Existe também a possibilidade de complexos de quitosana inibirem a produção de NO. Trabalho realizado por Porporatto e colaboradores (2003) demonstrou que quitosana aumenta fortemente a atividade da arginase com diminuição da produção de NO em macrófagos inflamatórios. A arginase quebra arginine em L-ornitina, providenciando um substrato para ornitina descarboxilase, uma enzima chave para biossíntese de poliaminas, as quais contribuem para replicação de *Leishmania* (INIESTA et al., 2002). Assim alta expressão de arginase e baixa expressão de NO, desvia o metabolismo da arginine para produção de L-ornitina, as quais podem levar para a produção de fatores de crescimento para *L. amazonensis*. O que provavelmente pode ter acontecido quando esses animais foram tratados na maior dose em nível de tamanho de pata, pois nem sempre um resultado é dose-dependente, e muitas vezes a maior dose pode acarretar um efeito contrário.

No que se refere à perda ou ganho de peso dos animais não houve alterações significativas (Figura 57), indicando que a quitosana não apresentou toxicidade para esse parâmetro analisado.

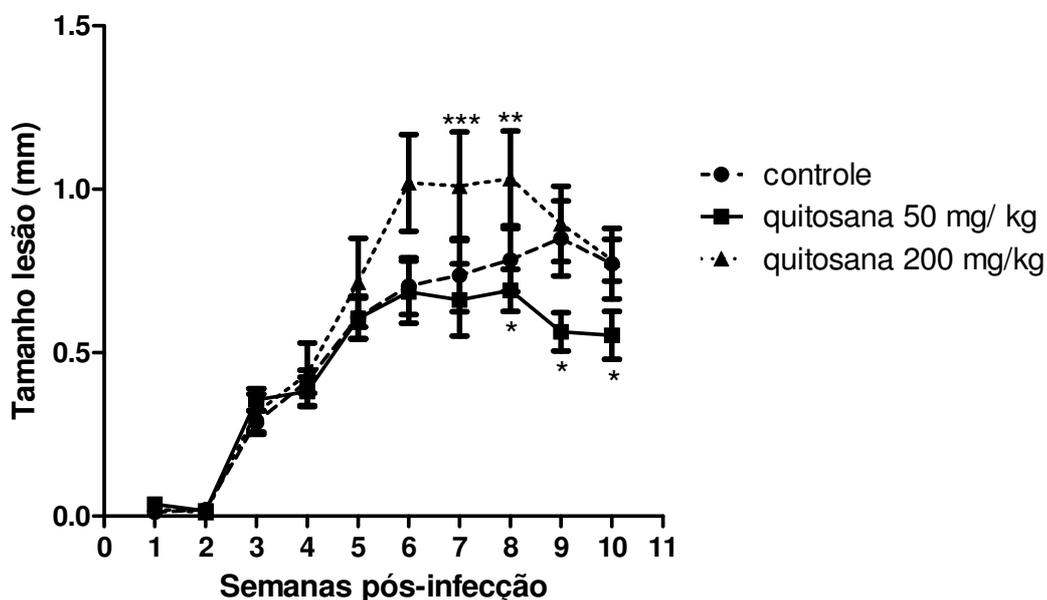


Figura 56 – Efeito de diferentes doses da quitosana na espessura da pata de camundongos infectados com 1×10^6 promastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados durante dez semanas. Espessura da pata foi medida semanalmente. Dados representativos da média de oito animais por grupo. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com água destilada. (* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ no teste “t – Student”).

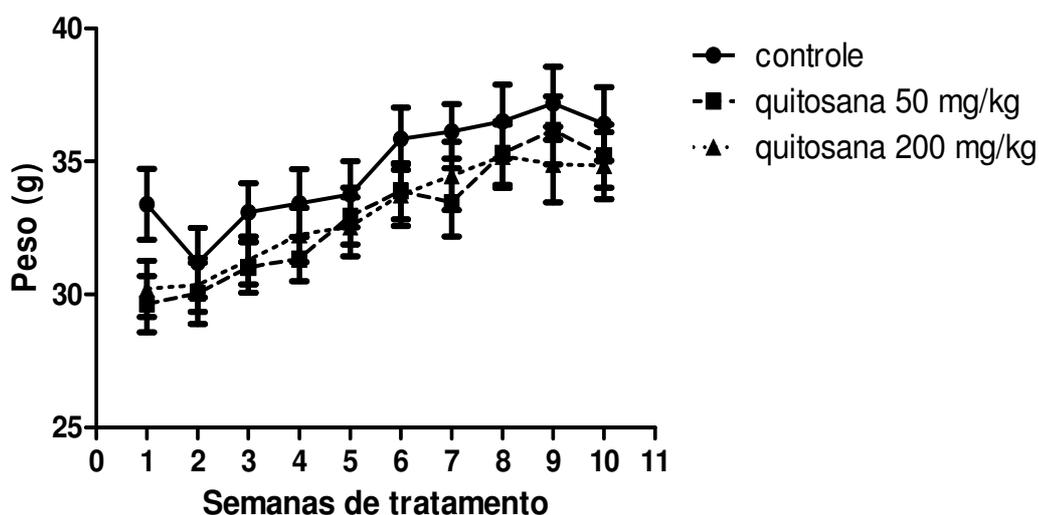


Figura 57 – Efeito de diferentes doses da quitosana sobre o peso dos animais infectados com 1×10^6 promastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados durante dez semanas. O peso foi medido semanalmente. Dados representativos da média de oito animais por grupo. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com água destilada. (Teste “t – Student”).

Os animais foram sacrificados na décima semana de infecção, e a carga parasitária da pata e linfonodo poplíteo analisada por diluição sucessiva. Nas figuras 58 e 59 estão os valores da carga parasitária da pata e linfonodo poplíteo, respectivamente. Foi observada uma diminuição significativa da carga parasitária na pata e linfonodo nos grupos tratados com as duas doses de quitosana.

Portanto, o tratamento via oral com a quitosana na dose de 50mg/kg tanto diminuiu o tamanho da lesão, como reduziu a carga parasitária da pata e linfonodo dos animais infectados.

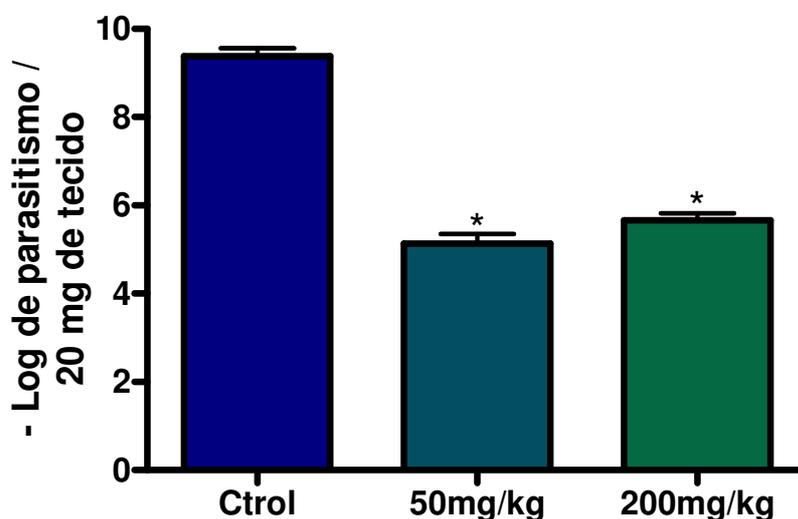


Figura 58 – Efeito de diferentes doses da quitosana na carga parasitária da pata de camundongos infectados com 1×10^6 promastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados via oral. Dados representativos da média de cinco animais por grupo. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com água destilada. (* $P < 0.05$ no teste “t-Student”).

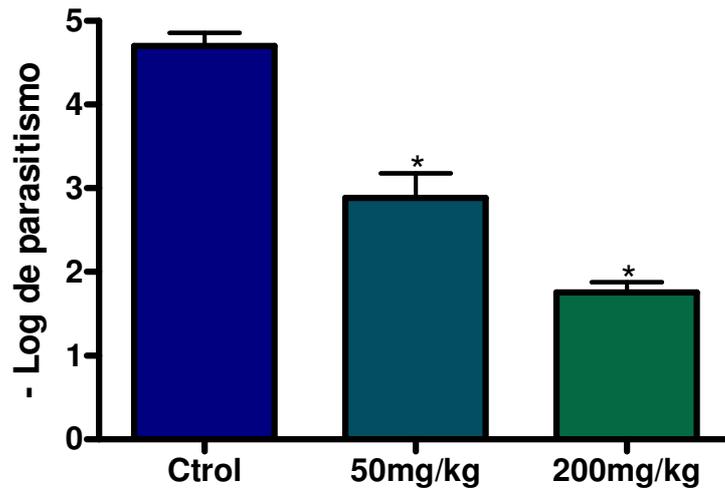


Figura 59 – Efeito de diferentes doses da quitosana na carga parasitária do linfonodo de camundongos infectados com 1×10^6 promastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados via oral. Dados representativos da média de cinco animais por grupo. *indica diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com água destilada. (*P < 0.05 no teste “t –Student”).

5. CONCLUSÕES

A iangambina apresentou atividade antileishmania sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*. A quitosana apresentou atividade antipromastigota para a espécie de *L. chagasi*. A associação da iangambina com a quitosana, não interferiu com a atividade antileishmania da iangambina.

A iangambina não apresentou atividade citotóxica para macrófagos murinos e células MDCK. A quitosana não apresentou citotoxicidade para macrófagos no tempo de exposição de 24h, no entanto para o tempo de exposição de 48h houve uma citotoxicidade significativa.

A iangambina e a quitosana apresentaram atividade antiamastigota em macrófagos murinos infectados com *L. chagasi* nos tempos de 48h e 72h. Esta redução não foi dependente da produção de NO como também da produção de TNF- α .

A iangambina apresentou um efeito antileishmania *in vivo*, em camundongos suíços infectados com *L. amazonensis*, traduzido pela diminuição da carga parasitária nos animais tratados via oral com esta lignana.

A quitosana, na dose de 50mg/kg administrada via oral, tem efeito antileishmania, observado pela diminuição do tamanho da lesão, assim como da carga parasitária nos animais.

A associação da iangambina com a quitosana não interferiu no efeito biológico destes compostos tanto *in vitro*, como *in vivo*, nos modelos experimentais estudados.

6. REFERÊNCIAS

AIEDEH, K.; TAHA, M.O. Synthesis of chitosan succinate and chitosan phthalate and their evaluation as suggested matrices in orally administered, colon-specific drug delivery systems. **Arch Pharm** (Weinheim). v.332(3),103-107, 1999.

ALMEIDA, R. N.; PACHÚ, C. O. E BARBOSA FILHO, J. M. Avaliação da possível atividade analgésica da iangambina obtida da *Ocotea duckei* Vattimo. **Rev. CCS**. V.14p. 7 – 10, 1995.

ARAÚJO C. V., BARBOSA-FILHO J. M., CORDEIRO R. S., AND TIBIRIÇÁ E. Protective effects of yangambin on cardiovascular hyporeactivity to catecholamines in rats with endotoxin-induced shock. Naunyn-Schmiedeberg's **Arch. Pharmacol.** 363, 267-275, 2001.

BAE, K. H.; MOON, C. W.; LEE, Y. and PARK, T. G. Intracellular delivery of heparin complexed with chitosan-g-Poly(ethyleneglycol) for Inducing apoptosis. **Pharmaceutical Research**. 2008. DOI: 10.1007/s11095-008-9713-1

BARATA, L.E; SANTOS, L. S; FERRI, P.H; PHILLIPSON, J.D; PAINE, A.; CROFT, S.L. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**. v.55, n.6 p. 589 – 595, 2000.

BARBOSA FILHO, J. M.; VARGAS, M. R. W.; SILVA, I. G.; FRANÇA, I. S. MORAIS, L. C. S. L.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; SOUZA, M. F. V.; CHAVES, M. C. O.; ALMEIDA, R. N. and AGRA, M. F. *Ocotea duckei*: exceptional source of yangambin and other furofuran lignans. **An Acad. Bras. Ci.**, v.71, n.2, p.231-238, 1999.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMAPAI, D.; GRIMALDI Jr., G.; MOMEN, H.; McMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A; ALMEIDA R.; BADARÓ R.; BARRAL-NETO, M.; CARVALHO, E. M.; JOHNSON, Jr W.D. Leishmaniasis in Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg.**, 44: 536-546. 1991.

BATES, P.A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. **Exp. Parasitol.**, v.79, p.215-218, 1994

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 120 p, 2006.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de vigilância em saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 180 p., 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 7. ed. Brasília, DF, 2008

CALLA-MAGARINOS, J., GIMÉNEZ, A., TROYE-BLOMBERG, M. & FERNÁNDEZ C. An Alkaloid Extract of *Evanta*, Traditionally Used as Anti-leishmania Agent in Bolivia, Inhibits Cellular Proliferation and Interferon- γ Production in Polyclonally Activated Cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, 69, 251–258, 2009

CARRIÓ, J.; COLMENARES, M.; RIERA, C.; GÁLLEGO, M.; ARBOIX, M.; PORTÚS, M. *Leishmania infantum*: Stage-Specific activity of pentostan antimony related with the assay conditions. **Exp. Parasitol.**, v.95, p.209-214, 2000.

CHAIM, O.M. **Estudo da atividade citotóxica da proteína dermonecrótica do veneno de aranha marrom (*Ixosceles intermedia*) com ênfase no efeito nefrotóxico**. 2005. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba.

CHAN-BACAB, M. J. AND PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Nat. Prod. Rep.**, 18, 674–688, 2001.

CHEN, M., CHRISTENSEN, S. B., THEANDER, T. G., AND KHARAZMII ,A. Antileishmanial Activity of Licochalcone A in Mice Infected with *Leishmania major* and in Hamsters Infected with *Leishmania donovani*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. 1339-1344 Vol. 38, No. 6, June, 1994

CONVIT, J.; PINARDI, M.E.; RONDON, A J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect in the host. **Trans R Soc Med Hyg.**, 66: 603-610, 1972.

COSTA, M. C. A. **Relações entre a estrutura química de neolignanas e a sua atividade antileishmaniose, envolvendo cálculos de solvatação.** 1998 183p. Tese de Doutorado (Doutorado em Físico-química) – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

DUTRA, P. M. L., VIEIRA, D. P., MEYER-FERNANDES, J. R., SILVA-NETO, M. A.C., LOPES, A. H. Stimulation of *Leishmania tropica* protein kinase CK2 activities by platelet-activating factor (PAF). **Acta Trop.** (2009). doi:10.1016/j.actatropica.2009.05.002

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. P, 91-103, 2001. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; AND PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento.** 3 ed. rev. Porto Alegre, Ed. UFRGS; Florianópolis, Ed UFSC.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives,** V.109, n. 1, p. 69-74, 2001.

FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; ANATOLE KONOWAL, P. W.; FREED, J. Y. WESTCOTT, AND PETER, M. H. Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving TGF β , PGE $_2$, and PAF. **J. Clin. Invest.** v. 101, n 4, February , 890–898, 1998

FARIA NETO, H. C.; BOZZA, P. T., CRUZ, H. N.; SILVA, C. L. M. et al. Yangambin: A new naturally-occurring platelet-activating factor receptor antagonist: binding and *in vitro* functional studies. **Planta Médica.**, v.61, p. 101 – 105, 1995 a

FARIA NETO, H. C.; ARAÚJO, C. V.; MOREIRA, S.; BOZZA, P. T.; THOMAS, G.; BARBOSA FILHO, J. M.; CORDEIRO, R. S. B. and TIBIRIÇA, E. V. Yangambin: Yangambin: a new naturally-occurring platelet-activating factor receptor antagonist: *in vivo* pharmacological studies. **Panta Med.** v.61, p.106-112, 1995b.

FRESHENEY, R. I. **Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques.** New York. 4 ed., 2000.

GAMBOA-LEÓN, M. R., ARANDA-GONZÁLEZ, I., MUT-MARTÍN, M., GARCÍA-MISS, M. R. & DUMONTEIL, E. In vivo and In vitro Control of Leishmania mexicana due to Garlic-induced NO Production. **Scandinavian Journal of Immunology**, 66, 508–514, 2007

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S. and TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**. V.126, p.131-138, 1982.

HAN, Y.; ZHAO, L.; YU, Z.; FENG, J.; YU, Q. Role of mannose receptor in oligochitosan-mediated stimulation of macrophage function. **International Immunopharmacology**, 1533–1542, 5 (2005)

HAUSOTT, H.B & MARIAN, B. G. Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells. **J Cancer Res Clin Oncol** 129: 569 – 576, 2003

HERBERT, JEAN-MARC, CASTRO-FARIA-NETO, H.; BARBOSA-FILHO, J. O.; CORDEIRO, M.; RENATO, S. B.; TIBIRIGA, E. Pharmacological evidence for the putative existence receptors on of two different subtypes of PAF platelets and leukocytes; studies with yangambin. **J. Lipid Mediators Cell Signalling**. 17, I 14, 1997.

HOCQUEMILLER, R.; CORTES, D.; ARANGO, G. J.; MYINT, S. H.; CAVE, A.; ANGELO, A.; MUNOZ, V. and FOURNET, A. A isolation an synthesis of espintanol, a new antiparasitic monoterpene. **J. Nat. Prod.**, v.54, n.2, p.445-452, 1991.

HUGHES, H. P. A. Oxidative killing of intracellular parasites mediates by macrophages. **Parasitol. Today**, 4: 340-347, 1988

HWANG, SHIAW-MIN, CHEN, CHIUNG-YUN, CHEN, SHAN-SHAN, AND CHEN, JIAN-CHYI. Chitinous Materials Inhibit Nitric Oxide Production by Activated RAW 264.7 Macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 271, 229–233, 2000.

IBD - BASES DE DADOS TROPICAIS. **Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas. Fitoterápicos.** Disponível em:<<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10/eloint.html>>. Acesso em: 31de janeiro 2009.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharmaceutical Research**, vol. 15, No. 9, 1998

INIESTA, V. L. GÓMEZ-NIETO, C.; MOLANO, I.; MOHEDANO, A.; CARCELÉN, J.; MIRÓN, C.; ALONSO, C. & CORRALIZA, I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. **Parasite Immunology**, 24, 113–118, 2002.

JARAMILLO, M.C., ARANGO, G.J., GONZÁLEZ, M.C., ROBLEDO, S.M., VELEZ, I.D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**, 71, 183-186, 2000

JEONG, H. J.; KOO, H. N.; OH, E. Y.; CHAE, H. J.; KIM, H. R.; SUH, S. B.; KIM, C. H.; CHO, K. H.; PARK, B. R.; PARK, S. T.; LEE, Y. M.; AND KIM, H. M. Nitric oxide production by high molecular weight water-soluble chitosan via nuclear factor- κ B activation. **International Journal of Immunopharmacology**, 22, 923-933, 2000

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, **Adv. Drug Deliv. Rev.** (2009).doi:10.1016/j.addr.2009.09.004

KEDZIERSKI L, CURTIS JM, KAMINSKA M, JODYNIS-LIEBERT J, MURIAS M. In vitro antileishmanial activity of resveratrol and its hydroxylated analogues against *Leishmania major* promastigotes and amastigotes. **Parasitol Res.** Dec;102(1):91-7, 2007

KIM, K. W. & THOMAS, R.L. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. **Food Chemistry** 101, 308–313, 2007

KOJIMA, K. OKAMOTO, Y.; MIYATAKE, K.; KITAMURA, Y.; MINAMI, S. Collagen typing of granulation tissue induced by chitin and chitosan, Carbohydr. **Polymers**, v. 37, p. 109, 1998.

LAINSON, R.; SHAW, J J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, v. 1, p. 1-120, 1987.

LEE, D. Y.; CHOI, I. S.; HAN, J. H.; AND YOO, H. S. Chitosan and D-glucosamine induce expression of Th1 cytokine genes in porcine spleen cells. **J. vet. Med. Sci.** 64, (7): 645-648, 2002

LEON, L.L.; MACHADO, G.M.C.; BARRAL, A; CARVALHO-PAES, L.E.; GRIMALDI, Jr. G. Antigenic differences among *Leishmania amazonensis* isolates and their relationship with distinct clinical forms of the disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, 87: 229-234. 1992.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; & MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. II. TNF- α Induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L – arginine. **Immunology.** 71. 556-559, 1990.

LONARDONI, M.V.; BARBIERI, L.C.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Modulation of *Leishmania (L.) amazonensis* growth in cultured mouse macrophages by prostaglandins and platelet-activating factors. **Mediators Inflamm.** v. 3, 137e141, 1994.

LONARDONI, MARIA VALDRINEZ CAMPANA, RUSSO, MOMTCHILLO, AND JANCAR, SONIA. Essential Role of Platelet-Activating Factor in Control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Infection. **Infection and Immunity.** Vol. 68, 6355–6361, No. 11, Nov, 2000.

MACHADO, G. M. C., LEON, L. L., DE CASTRO, S. L. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 102(1): 73-77, 2007

MAESTRELLI, F.; GARCIA-FUENTES, M.; MURA, P.; ALONSO, M.J. A new drug nanocarrier system consisting of chitosan and hydroxypropylcyclodextrin. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 63, 79–86, 2006.

MARQUES, R. C. P.; MEDEIROS, S. R. B.; DIAS, C. S.; BARBOSA FILHO, J. M. and AGNEZ LIMA, L. F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. **Mutation Research.**, v.536, p.117 – 120, 2003.

MARTINS, A. M. C.; SOUSA, F. C. M; BARBOSA, P. S. F et al. Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**, v46, p595-599, 2005.

MBONGO, N.; LOISEAU, P.M.; BILLION, M.A.; ROBERT-GERO, M. Mechanism of Amphotericin B Resistance in *Leishmania donovani* Promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, n.2, p.352-357, 1998.

MCPMAHON-PRAT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for new world cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunological reviews**, 201: 206-224. 2004

MONTE NETO, R. L. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade antileishmaniana de produtos obtidos da *Ocotea duckei* (LAURACEAE) sobre *Leishmania (L.) amazonensis* E *Leishmania (L.) chagasi*** . 2007 b, 166p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Produtos Naturais – Farmacologia e Química) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba.

MONTE NETO, R. L.; BARBOSA FILHO, J. M. ; SOUZA, L. M. A. E. ; ATHAYDE FILHO, P. F. ; DIAS, C. S. ; OLIVEIRA, M. R. . Crude ethanolic extract, lignoid fraction and yangambin from *Ocotea duckei* (Lauraceae) show antileishmanial activity. Zeitschrift für Naturforschung. C, **A Journal of Biosciences**, v. 62C, p. 348-352, 2007.

MONTE NETO, R. L.; SOUSA, L. M. A.; DIAS, C. S.; BARBOSA FILHO, J. M.; OLIVEIRA, M. R. Yangambin cytotoxicity: A pharmacologically active lignan obtained from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). Zeitschrift für Naturforschung. C, **A Journal of Biosciences**, v. 63, p. 681-686, 2008

MORAIS, L. C. S. L.; ALMEIDA, R. N.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BARBOSA FILHO, J. M. and GRAY, A. L. Further lignans from *Ocotea duckei* **Pharmaceutical Biology**. V.37, n.2, p.144 – 147, 1999.

MOREIRA, R. C.R., COSTA, G C., LOPES, T. C., BZERRA, J. L., GUERRA, R. N.M., REBÊLO, J. M. M., RIBEIRO, M. N. S., NASCIMENTO, F. R.F., COSTAS, J. M.L. Efeito leishmanicida *in vitro* de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17(1): 59-63, Jan./Mar. 2007

MOSMANN. T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods** 65, 55-63, 1983.

MURRAY, H. W., AND C. F. NATHAN. Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral. *Leishmania donovani*. **J. Exp. Med.** 189:741–746, 1999.

MURRAY, H. W.; JUNGBLUTH, A.; RITTER, E.; MONTELIBANO, C.; AND MARINO, M. W. Visceral leishmaniasis in mice devoid of tumor necrosis factor and response to treatment. **Infection and immunity**, Vol. 68, No. 11, p. 6289–6293, Nov. 2000

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, D. A.G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmaniana do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(1): 61-66, Jan./Mar. 2006

NETO, A.G.; DA SILVA FILHO, A.A.; COSTA, J.M.L.C.; VINHOLIS, A.H.C.; SOUZA, G.H.B.; CUNHA, W.R., SILVA, M.L.A.E., ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J.K. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal in vitro activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) roots. **Phytomedicine**, 11, 662–665, 2004

NISBET, L. J. & MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 8, n. 6., p. 708-712, 1997.

OKAMOTO, Y.; YANO, R.; MIYATAKE, K.; TOMOHIRO, I.; SHIGEMADA, Y.; MINAMI, S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. **Carbohydrate Polymers**, 53, 337-342, 2003

OKETCH-RABAH, H.A., LEMMICH, E., DOSSAJI, S.F., THEANDER, T.G., OLSEN, C.E., CORNETT, C., KHARAZMI, A., Christensen, S.B., Antiprotozoal compounds from *Asparagus africanus*. **J. Nat. Prod.** 60, 1017–1023, 1997.

OLIVEIRA, M. R.; TAFURI, L. C.; AFONSO, L. C. C.; OLIVEIRA, M. A. P.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, E. C.; SCOTT, P.; MELO, M. N.; and VIEIRA, L. Q. Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. **Parasitology**. V.131, p.477-488, 2005.

OLIVEIRA, M. R.; TAFURI, W. L.; NICOLI, J.; VIEIRA, E. C.; MELO, M. N. and VIEIRA, L. Q. Influence of microbiota in experimental cutaneous leishmaniasis in swiss mice. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. V.42, n.2, p.87-94, 1999.

OLIVIER, M; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical microbiology reviews**, Vol. 18, No. 2, p. 293–305, Apr. 2005

PACHÚ, C. O. **Novas lignanas furofurânicas isoladas da *Ocotea duckei* attimo e atividade psicodpressora da iangambina**, 1994. 137f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1994. PACHÚ, C. O.; ALMEIDA, R. N. e BARBOSA FILHO, J. M. Atividade depressora do sistema nervoso central da iangambina. **Rev. CCS.**, v.21 p. 14 – 16, 1993.

PADIGEL, U. M.; ALEXANDER, J. and FARRELL, J. P. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania Amazonensis*. **The Journal of Immunology**. 171: 3705–3710, 2003

PEARSON, R. D. and SOUZA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases.**, v.22, p.1 – 11, 1996.

POMPEU, M.L.; FREITAS, L.A; SANTOS, M.L.; BARRAL, A; BARRAL-NETO, M. *Leishmania amazonensis* infection: a comparison of in vivo leishmanicidal mechanisms between immunized and naive infected BALB/c mice. **Exp. Parasitol**. 74: 169-176, 1992.

PORPORATTO, C; BIANCO, I. D; RIERA, C. M. & CORREA, S. G. Chitosan induces different L. Arginine metabolic pathways in resting and inflammatory macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 304, 266-272, 2003.

PUJALS, G.; SUÑÉ-NEGRE, J. M.; PÉREZ, P.; GARCÍA, E.; PORTUS, M.; TICO, J. R.; MIÑARRO, M.; AND CARRIÓ, J. In vitro evaluation of the effectiveness and cytotoxicity of meglumine antimoniate microspheres produced by spray drying against *Leishmania infantum*. **Parasitol Res**. 102:1243–1247, 2008. DOI 10.1007/s00436-008-0901-z

ROCHA E SILVA, M. **Fundamentos da farmacologia e suas aplicações à terapêutica**. ed. rev. São Paulo: EDART, 1973.v.1

ROSA, M. S. S.; VIEIRA, R. B.; PEREIRA, A. F. P.; DUTRA, P. M. L.; LOPES, A. H. C.S. Platelet-Activating Factor (PAF) Modulates Peritoneal Mouse Macrophage Infection by *Leishmania amazonensis*. **Current Microbiology**, Vol. 43, pp. 33–37, 2001. DOI: 10.1007/s002840010256

RUSSELL, D. G. Mycobacterium and *Leishmania*: stowaways in the endosomal network. **Trends in Cell Biology**, v. 5, Issue 3, pages 125-128, March 1995.

SANTIAGO, H. C.; PIRES, M. F. B.; SOUZA, D. G.; ROFFÊ, E.; CÔRTEZ, D. F.; TAFURI, W. L.; TEIXEIRA, M. M.; VIEIRA, L. Q. Platelet activating factor receptor-deficient mice present delayed interferon-g upregulation and high susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. **Microbes and Infection**. v. 8, 2569 e 2577, 2006.

SANTOS, V. L. **Lignanas Furofurânicas Isoladas da *Ocotea duckei* Vattimo e Ações Espasmolíticas da langambina**. 1994, 116p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Produtos Naturais – Farmacologia e Química) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba.

SAUVAIN, M.; DEDET, J. P.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GAYRAL, P.; GANTIER, J. C.; KUNESCH, G. In vitro and in vivo leishmanicidal activities of natural and synthetic quinoids. **Phytother Res**, 167-171, 7, 1993.

SCHLEIN, Y. *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitol. Today**, v.9, n.7, p.255-258, 1993.

SENEL, S.; AND MCCLURE S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 56, 1467– 1480, 2004

SEO, W. G.; PAE, H. O.; KIM, N. Y.; OH, G. S.; PARK, I. S.; KIM, Y. H.; KIM, Y. M.; LEE, Y. H.; JUN, C. D.; CHUNG, H. T. Synergistic cooperation between water-soluble chitosan oligomers and interferon- γ for induction of nitric oxide synthesis and tumoricidal activity in murine peritoneal macrophages. **Cancer Letters**. 159, 189-195, 2000.

SERRA, M. F.; DIAZ, B. L.; BARRETO, E. O. et al. Anti-allergic properties of the natural PAF antagonist yangambin. **Planta Médica**., v.63, p.207 – 212, 1997.

SILVA FILHO, A. A., COSTA, E. S., CUNHA, W. R., SILVA, M. L. A., NANAYAKKARA, N. P. D. E BASTOS, J. K. *In vitro* Antileishmanial and Antimalarial Activities of Tetrahydrofuran Lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research**. Res. 22, 1307–1310 2008.

SOUZA, F. C. F.; PEREIRA, B. A.; LIMA, V. T. M.; LACERDA, C. D. G.; MELO, C. T. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; E VIANA, G. S. B. Central Nervous System Activity of Yangambin from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) in Mice. **Phytotherapy research Phytother. Res**. 19, 282–286 (2005)

STULZER, H. K.; LACERDA, L.; TAGLIARI, M. P.; SILVA, M. A. S.; FÁVERE, V. T.; LARANJEIRA, M. C. M. Synthesis and characterization of cross-linked malonylchitosan microspheres for controlled release of acyclovir. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 490-497, 2008.

SUNDAR, S.; AGRAWAL, G.; RAI, M.; MAKHARIA, M.K.; MURRAY, H.W. Treatment of Indian visceral leishmaniasis with single or daily infusions of low dose liposomal amphotericin B: randomized trial. **BMJ**, v.323, p.419-422, 2001.

THAKUR, C. P.; KUMAR, M.; e PANDEY, A. K. Comparison of regimes of treatment of antimony-resistant kala-azar patients: A randomized study. In: Reguera, R. M.; Cubri'a, J. C. and Ordo'n'ez*, D. **The Pharmacology of Leishmaniasis**. Gen. Pharmac. Vol. 30, No. 4, pp. 435–443, 1998

TRAPANI, A.; SITTERBERG, J.; BAKOWSKY, U.; KISSEL, T. The potential of glycol chitosan nanoparticles as carrier for low water soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. 375, 97–106, 2009.

TULP, M.; BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 10, p. 450-458, 2004.

USAMI, Y., OKAMOTO, Y., MINAMI, S., MATSUHASHI, A., KUMAZAWA, N. H., TANIOKA, S., SHIGEMASA, Y. Chitin and chitosan induce migration of bovine polymer–phonuclear cells. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 56, p. 761, 1994.

ZANDBERGEN, G. V.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W. and LASKAY, T. Neutrophil granulocyte serves as a vector for leishmania entry into macrophages. **The Journal of Immunology**. v.173, n.11, p. 6521-6525, 2004.

VAN, M. S.; VAN, D. S.; SCHMIDT, T.J; BRUN, R.; VLIETINCK, A.; LEMIERE, G.; PIETERS, L. Antileishmanial activity, cytotoxicity and QSAR analysis of synthetic dihydrobenzofuran lignans and related benzofurans. **Bioorg Med Chem**. V.13, n.3, p. 661 – 669, 2005.

WILSON, E.; JERÔNIMO, S.M.B.; PEARSON, R.D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**. v. 38: 147-160, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Lutte contre la leishmaniose**. Disponível em: <http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA60/A60_10-fr.pdf>, acesso em: 10 de fevereiro de 2009

YAN, J.; PEI-XUE, L.; YAN-LI, H.E.; TIAN-MIN, Z. Effects of chitosan and heparin on early extension of burns. **burns**, 33, 1027–1031, 2007

ZHIJUN, Y.; LUHANG, Z.; HAIPING, K. Potential role of nuclear factor-kappaB in the induction of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by oligochitosan in macrophages. **International Immunopharmacology**, 193–200, 4 (2004)

ANEXO



LABORATORIO DE TECNOLOGIA FARMACEUTICA

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
CERTIDÃO**

João Pessoa, 28 de agosto de 2009

CEPA N°. 0208/09

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadores: Profa.Dra. Márcia Rosa de Oliveira e Antônia Soares Penha (mestranda)

Departamento/Setor: LTF

Ref.: Projeto de Pesquisa: "Avaliação da atividade antileishmania da lignana langambina associada a complexos de Quitosana".

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,

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB

