



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS



PgPNSB

ROGERIO ALEXANDRE NUNES DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DA *Spiranthera odoratissima* ST. HIL
(RUTACEAE), *IN VITRO*, *IN VIVO* E *IN SILICO*



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS



PgPNSB

JOÃO PESSOA, PB

2012

ROGERIO ALEXANDRE NUNES DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DA *Spiranthera odoratissima* ST. HIL
(RUTACEAE), *IN VITRO*, *IN VIVO* E *IN SILICO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, desenvolvido no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam

JOÃO PESSOA, PB

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS



PgPNSB

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais para Catalogação na Publicação (CIP)

Bibliotecária Patrícia Jaeger / CRB1-1736

S237a Santos, Rogério Alexandre Nunes dos

Avaliação da Atividade Antileishmania da *Spiranthera odoratissima* ST. Hil (Rutaceae) in vitro, in vivo e in silico/

Rogério Alexandre Nunes dos Santos. - João Pessoa:

Universidade Federal da Paraíba, 2012.

124f.:il

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, desenvolvido no Centro da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof.^ª Dr.^ª Márcia Regina Piuvezam



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS



PgPNSB

**AValiação da atividade antileishmania da *Spiranthera odoratissima* ST. HIL
(RUTACEAE), *IN VITRO*, *IN VIVO* E *IN SILICO***

Tese apresentada em 02 de março de 2012 ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, desenvolvido no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam

Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba (UFPB) - Orientadora

Prof. Dr. Fabrício Rios Santos

Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT

Profa. Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

Departamento de Microbiologia Centro de Pesquisa Ageu Magalhães,

Prof. Dr. Luís Cezar Rodrigues

Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

Profa. Dra. Márcia Rosa de Oliveira

Departamento de Biologia Molecular – CCEN/UFPB

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

PgPNSB/CCS/UFPB - Suplente

*Dedico este trabalho a minha família:
Andreza, Leonardo, Neuza Nunes, Laudemiro
(In memoriam), Leonita Nunes, irmãos e sobrinhos,
além dos amigos que sempre estiveram comigo.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a. Dr.^a Márcia Regina Piuvezam, pela disposição e compreensão no decorrer deste trabalho.

À Prof.^a Ilza Martha de Souza, pelo apoio, e por ser uma das grandes responsáveis pelo meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À Prof.^a Dr.^a Carmen Lúcia Bassi, pela confiança, atenção, amizade, e profissionalismo.

Ao Prof. MSc. João Batista Jr, pela disponibilidade e atenção em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Rui Curi, pelo estágio e experiência adquirida no Laboratório de cultura de células da USP-São Paulo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Donadi pelo estágio no laboratório de imunologia molecular USP-Ribeirão Preto.

À Prof.^a. Dr.^a Nair Honda Kawashita, pelo carinho e atenção de sempre.

Ao Prof. Dr. Cor Jesus, pelo auxílio e apoio na realização do doutorado.

Ao Prof. Dr. Fabrício Santos Rios, pela amizade e profissionalismo.

À Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

À Universidade Federal de Mato Grosso e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

À minha família que sempre me ajudou e compreendeu, tolerando minhas ausências e incentivando meu crescimento, muito obrigado por tudo.

À Suellen Iara Guirra Rosa, pelas palavras de carinho, incentivo diário e apoio incondicional, meu eterno agradecimento;

Ao amigo Vanderval Silva de Oliveira, pelas conversas, fosforilações e apoio incondicional;

À Naiana Fernandes Leotti e Samantha Therezinha A. Pereira Leite, pela colaboração e troca de informações na bancada;

À amiga Neyres Zínia Taveira de Jesus, por caminhar comigo nesta jornada científica.

Aos alunos de iniciação científica, Heron Torquato Fernandes e Ruberlei Godinho, pelo auxílio imprescindível em todos os experimentos;

Aos colegas do Laboratório de Investigação médica, Daniele Ribatiski da Silva, Naiana Leotti, Samantha Leite pelo alegre convívio sempre agradável;

A todos os colegas do doutorado em Produtos Naturais, pelo companheirismo e respeito mútuo durante estes anos.

Ao Nilson, técnico do laboratório da UFMT, pelo convívio e atenção;

Aos colegas do Laboratório de Imunofarmacologia/UFPB, principalmente Renata Vasconcelos e Fagner Leite pela atenção, consideração e amizade a qualquer hora, a qualquer dia.

A todos da administração da Faculdade de Ciências Médicas da UFMT, Luciana Ivanete Kapelinski, Gracielly Alves Gama e Eva Elizabeth Pedroso da Silva Moraes, Eliana Maria da Silva, pela atenção e competência prestada;

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT), pelo financiamento do estudo.

"Aquele a quem a Natureza começa a desvendar seu segredo manifesto experimenta um anseio irresistível por sua intérprete mais digna: a Arte."

(Rudolf Steiner)

RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada cujo tratamento disponibilizado está associado a uma série de efeitos tóxicos, alto custo e diminuição da eficácia terapêutica devido ao aumento da resistência pelos parasitas. Assim, a pesquisa de novas drogas mais eficazes e seguras torna-se de grande importância. Compostos derivados de produtos naturais pode ser uma fonte mais eficaz e econômica para o tratamento desta parasitose. Este estudo avaliou a atividade leishmanicida da espécie *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) testando suas frações e isolados *in vitro*, *in vivo* e *in silico* utilizando formas *promastigota* e *amastigota* de diferentes espécies de *Leishmania* em macrófagos J774 A.1. Os ensaios *in vitro* avaliaram citotoxicidade, produção de óxido nítrico (NO), produção de citocinas interleucina 10, interleucina 12 e IFN- γ . A expressão da proteína quinase p38 ativada por mitógeno (p38 MAPK) e NF- κ B (p50 e p65) foi avaliada *in vitro* por western blotting. Os resultados observados *in vitro* da fração hexânica do fruto (Fhf) e seu alcaloide isolado esquimianina (Skm) demonstraram uma significativa ação leishmanicida ($P < 0.001$) contra *L. braziliensis*. Esta ação foi associada ao aumento da produção de óxido nítrico e diminuição de IL-10 em macrófagos assim como aumento da produção de citocinas Th1 como IL-12 e IFN γ para as concentrações estabelecidas entre 1.6 a 40 μ g/ml. Fhf e Skm demonstraram induzir a expressão de p38 e NF κ B, vias estas envolvidas na produção de citocinas Th1 e na indução de óxido nítrico. Os ensaios *in vivo* demonstraram reduzir lesão em camundongos *Swiss* infectados com *L. braziliensis*, assim como foi reduzido à carga parasitária em linfonodos e baço destes animais. O ensaio *in silico* demonstrou interação significativa entre Skm e resíduos de aminoácidos de NOS-II. Estes resultados em conjunto sugerem que o alcaloide esquimianina é um candidato promissor contra *L. braziliensis* devido sua potente atividade imunomoduladora.

Palavras chaves: *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae), efeito leishmanicida, esquimianina, Fhf, NOS-II, atividade imunomoduladora.

ABSTRACT

Leishmaniasis is one of the neglected diseases. High cost, systemic toxicity, and diminished efficacy due to development of resistance by the parasites has a negative impact on the current treatment options. Thus, the search for a new, effective and safer antileishmanial drug becomes of paramount importance. Compounds derived from natural products may be a better and cheaper source in this regard. This study evaluated the *in vitro*, *in vivo* and *in silico* antileishmanial activity of *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) fractions and isolated compounds, using promastigote and amastigote forms of different Leishmania species. J774 A.1 macrophage was used as the parasite host cell for the *in vitro* assays. Evaluations of cytotoxicity, nitric oxide (NO), interleukin-10, interleukin-12, IFN- γ were obtained *in vitro* and expression of p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK), NF- κ B (p50 and p65) was studied by western blotting. *in vivo* and *in silico* analysis were carried out. *In vitro* experiments showed that the fruit hexanic fraction (Fhf) and its alkaloid skimmianine (Skm) have a significant ($P < 0.001$) effect against *L. braziliensis*. This anti-*L. braziliensis* activity of Fhf and Skm was due to increased production of NO and attenuation of IL-10 production in the macrophages in contrast of IL-12 and IFN- γ levels increased at concentrations ranging from 1.6 to 40.0 μ g/ml. Fhf and Skm showed expression of p38 and NF- κ B, pathways involved in the production of Th1 cytokines and nitric oxide. *In vivo* testing showed reduction in lesion size in mice infected with *L. braziliensis*, as well as reduction in parasite burden in lymph node and spleen. The *in silico* assay demonstrated significant interaction between Skm and amino acid residues of NOS2. Skm is thus a promising drug candidate for *L. braziliensis* due to its potent immunomodulatory activity.

Keywords: *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae), leishmanicidal effect, skimmianine, Fhf, NOS-II, immunomodulatory activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Alamar blue
ANOVA	Análise de variância
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
ANFO B	Anfotericina B
ATCC	American type culture collection
°C	Graus centígrados
CR1	Receptor do complemento tipo 1
CR3	Receptor do complemento tipo 3
DC	Débito cardíaco
DCs	Células dendríticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzimaimunoensaio
ERK	Extracelular signal-regulated kinases
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
FCS	Soro bovino fetal
Fhf	Fração metanólica dos frutos
Gp63	Glicoproteína de superfície
IC	Índice de citotoxicidade
IFN-γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-13	Interleucina 13
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzida

IS	Índice de seletividade
JNK	Jun N-terminal Kinase
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LM	Leishmaniose mucosa
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LT	Leishmaniose tegumentar
MAPK	Mitogen – activated protein kinase
LT	Linfotoxina
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
mRNA	RNA mensageiro
NADPH	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzida
NFKB	Fator nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
NOSII	Óxido Nítrico Sintase
NM	Nanômetro
NKT	Células Natural Killer
O₂⁻	Superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate – buffered saline ou tampão fosfato salina
PS	Fosfatidilserina
PKC	Proteína quinase C
P38	Proteína 38
SBF	Soro bovino fetal
SbV	Antimonial pentavalente
Skm	Esquimianina
T CD4⁺	Linfócito T CD4 ⁺
T CD8⁺	Linfócito T CD8 ⁺
TGF-β	Fator beta de transformação do crescimento

Th0	Célula T auxiliar naïve
Th 1	Linfócito T helper 1
Th 2	Linfócito T helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso
μg	Micrograma
μL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida da <i>Leishmania sp.</i>	32
Figura 2 – <i>Spiranthera odoratissima</i> St. Hil (RUTACEAE) (Manacá)	48
Figura 3 – Estudo de docking molecular da Esquimianina e NOS-II	67

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Efeito da fração hexânica do fruto de *Spiranthera odoratissima* e seu alcaloide esquimianina sobre a produção de óxido nítrico (NO).....69
- Gráfico 2** - Efeito da fração do fruto hexânico de *Spiranthera odoratissima* e seu alcaloide esquimianina sobre a carga parasitária em macrófagos J774 A.1.....71
- Gráfico 3** - Efeito da fração hexânica do fruto de *Spiranthera odoratissima* e seu alcaloide esquimianina sobre a carga parasitária de macrófagos na presença de aminoguanidina.....73
- Gráfico 4** - Efeito da fração hexânica do fruto de *Spiranthera odoratissima* e seu alcaloide esquimianina na produção de IL-10.....75
- Gráfico 5** - Efeito da fração do fruto hexânico da *Spiranthera odoratissima* e do alcaloide esquimianina na produção de IL-12.....77
- Gráfico 6** - Efeito da fração do fruto hexânico da *Spiranthera odoratissima* e do alcaloide esquimianina na produção de IFN- γ78
- Gráfico 7** - Efeito da fração do fruto hexânico da *Spiranthera odoratissima* e do alcaloide esquimianina sobre a expressão de NF-kB (p50) em macrófagos infectados e não infectados com formas promastigota de *L. braziliensis*.....80
- Gráfico 8** - Efeito da fração do fruto hexânico da *Spiranthera odoratissima* e do alcaloide esquimianina sobre a expressão de NF-kB (p65) em macrófagos infectados e não infectados com formas promastigota de *L. braziliensis*.....81

- Gráfico 9** - Efeito da fração do fruto hexânico da *Spiranthera odoratissima* e do alcaloide esquimianina sobre a expressão de p38 em macrófagos infectados e não infectados com formas promastigota de *L. braziliensis*.....82
- Gráfico 10** - Efeito da fração do fruto hexânico da *Spiranthera odoratissima* e do alcaloide esquimianina sobre o desenvolvimento de lesão em Camundongos Swiss infectados com *L. braziliensis*.....84
- Gráfico 11** - Efeito da fração do fruto hexânico da *Spiranthera odoratissima* e do alcaloide esquimianina sobre a carga parasitária no linfonodo poplíteo de camundongos Swiss infectado com *Leishmania braziliensis*.....86
- Gráfico 12** - Efeito da fração do fruto hexânico da *Spiranthera odoratissima* e do alcaloide esquimianina sobre a carga parasitária do baço de camundongos Swiss infectado com *Leishmania braziliensis*.....87

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Estrutura química de antimoniais pentavalentes empregados na clínica médica.....23
- Tabela 2** - Estrutura química de antimoniais pentavalentes empregados na clínica médica.....42
- Tabela 3** - Outras drogas empregadas na terapia da leishmaniose, com os respectivos nomes químicos e comerciais.....43
- Tabela 4** - Efeito das frações e compostos da *Spiranthera odoratissima* ST. HIL sobre formas *promastigota* de diferentes espécies de *Leishmania* e macrófagos murinos da linhagem J774 A.1.....65

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	20
1.1 APRESENTAÇÃO ANTIGÊNICA E O DESENVOLVIMENTO DAS RESPOSTAS IMUNE CELULAR E HUMORAL.....	27
1.2 ÓXIDO NÍTRICO MOLÉCULA CHAVE NA RESPOSTA INTRACELULAR EFETIVA CONTRA <i>LEISHMANIA</i>	33
1.3 NF-KB E SUA PARTICIPAÇÃO NA PRODUÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO.....	35
1.4 A TERAPIA CLÁSSICA.....	37
1.5 ANTIMONIATO DE METILGLUCAMINA	38
1.6 OUTROS AGENTES QUIMIOTERÁPICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE	40
1.7 O USO DE PRODUTOS NATURAIS, SEUS CONSTITUINTES NA TERAPÊUTICA DAS LEISHMANIOSES E A BUSCA DE ALVOS TERAPÊUTICOS ESPECÍFICOS.....	44
1.8 <i>SPIRANTHERA ODORATISSIMA</i> ST. HIL (RUTACEAE)	46
2.0 OBJETIVOS.....	50
2.1 OBJETIVO GERAL	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1 MATERIAL.....	52
3.1.1 Reagentes e drogas.....	52
3.1.2 Células	52
3.1.3 Parasitos.....	53
3.2 MÉTODOS.....	53
3.2.1 Preparação das frações e compostos de <i>S. odoratissima</i>.....	53
3.2.2 Determinação da concentração que inibe 50% do crescimento do parasita (IC50).	54
3.2.3 Determinação da citotoxicidade (CC50) e índice de seletividade (IS) das frações e compostos isolados da <i>SPIRANTHERA ODORATISSIMA</i> St. Hill.	55
3.2.4 Análise in silico.....	56

3.2.5	<i>Determinação da produção de óxido nítrico em macrófagos.....</i>	56
3.2.6	<i>Infecção de macrófagos com <i>Leishmania braziliensis</i> e tratamento com os compostos em estudo.</i>	57
3.2.7	<i>Quantificação de citocinas: IFN- γ, IL-12 e IL-10.....</i>	58
3.2.8	<i>Determinação da expressão P38 E NF-κB (p50, p65) por Western blot</i>	59
3.2.9	<i>Tratamento com fração hexânica do fruto e esquimianina dos camundongos infectados com <i>Leishmania braziliensis</i>.....</i>	60
3.2.10	<i>Análise da carga parasitária</i>	61
3.2.11	<i>Análises estatísticas.....</i>	61
4.0	RESULTADOS.....	63
4.1	EFEITO DAS FRAÇÕES E COMPOSTOS DA <i>SPIRANTHERA ODORATÍSSIMA</i> ST. HIL SOBRE FORMAS PROMASTIGOSTAS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i> E MACRÓFAGOS MURINOS DA LINHAGEM J774 A.1.....	63
4.2	ESTUDO MOLECULAR DA ESQUIMIANINA (DOCKING).....	66
4.3	EFEITO DA FRAÇÃO HEXÂNICA DO FRUTO DE <i>SPIRANTHERA ODORATÍSSIMA</i> E SEU ALCALÓIDE ESQUIMIANINA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	68
4.5	EFEITO DA FRAÇÃO HEXANICA DO FRUTO DE <i>SPIRANTHERA ODORATÍSSIMA</i> E SEU ALCALÓIDE ESQUIMIANINA SOBRE A CARGA PARASITÁRIA DE MACRÓFAGOS NA PRESENÇA DE AMINOGUANIDINA.	72
4.6	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS DE PADRÃO TH1 E TH2 EM CULTURAS DE MACRÓFAGOS J774 A.1 TRATADOS COM FRAÇÃO HEXÂNICA DO FRUTO DE <i>SPIRANTHERA ODORATÍSSIMA</i> E SEU ALCALÓIDE ESQUIMIANINA.....	74
4.6.1	<i>Determinação dos níveis de IL-10 em culturas em culturas de macrófagos J774 A.1 tratados com fração hexânica do fruto de <i>Spiranthera odoratissima</i> e seu alcaloide esquimianina.</i>	74
4.6.2	<i>Determinação dos níveis de IL-12 e IFN-γ em culturas de macrófagos J774 A.1 tratados com fração hexânica do fruto de <i>Spiranthera odoratissima</i> e seu alcaloide esquimianina.</i>	76
4.7	EFEITO DA FRAÇÃO HEXÂNICA DO FRUTO DE <i>SPIRANTHERA ODORATÍSSIMA</i> E DA ESQUIMIANINA NA EXPRESSÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF-KB E DA VIA P38.....	79

4.8 EFEITO DA FRAÇÃO DO FRUTO HEXANICO E ESQUIMIANINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE LESÃO EM CAMUNDONGOS SWISS.....	83
4.9 EFEITO DA FRAÇÃO DO FRUTO HEXANICO E ESQUIMIANINA SOBRE A CARGA PARASITÁRIA DE LINFONODO E BAÇO DE CAMUNDONGOS SWISS.	85
5.0 DISCUSSÃO	89
6.0 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
APÊNDICE.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
APÊNDICE B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas por meio de vetores flebotomíneos infectados. Essas doenças possuem um espectro grande de manifestações clínicas, e essas diferenças estão relacionadas à espécie de *Leishmania* envolvida (WHO 2010). No Brasil, a média de casos de Leishmaniose Visceral (LV) no período de 2005 a 2009, foi de 3.679 casos/ano, com uma taxa de letalidade de 5,8% em 2009. Quanto a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), no período de 2000 a 2009, foi registrada uma média de 24.684 casos confirmados de LTA no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan). (WHO, 2010)

O crescimento significativo das leishmanioses na última década tem sido causado por diversos fatores, dentre estes, degradação ambiental, urbanização não planejada e como recidiva de infecção assintomática em pacientes acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida, contudo também nestes últimos anos foi observado um melhor entendimento da biologia da leishmania incluindo o sequenciamento do genoma de muitas espécies, a análise pós-genômica destes parasitas e sua relação com a resposta do hospedeiro (KAYE, P. M. e BLACKWELL, J. M., 2008), assim como foi observada também a recombinação sexual entre estes parasitas (AKOPYANTS, N. S. *et al.*, 2009), além de um melhor entendimento da intrincada vida deste parasita nos insetos vetores (DOBSON, D. E. *et al.*, 2010; SADLOVA, J. *et al.*, 2010)

Em ordem crescente de envolvimento sistêmico e de gravidade clínica, a leishmaniose humana pode ser classificada em cutânea, mucocutânea e visceral (BATES, P. A., 2007; MUSA, A. M. *et al.*, 2010).

A leishmaniose cutânea é a manifestação clínica de maior ocorrência ao redor do globo (mais de 90% dos casos), inclusive no Brasil, e pode ser dividida em três grupos, de acordo com as apresentações clínicas que ocorrem:

1. Leishmaniose cutânea: forma mais frequente da doença, com lesões formadas, geralmente no local da picada do inseto, sem disseminação à distância e com tendência à cura espontânea.
2. Leishmaniose cutâneo-mucosa: com lesões tanto na pele quanto na mucosa das vias aéreas superiores, com intensa atividade imunopatológica e metastatização das lesões.
3. Leishmaniose cutânea difusa: forma mais rara da doença, com lesões nodulares disseminadas por todo o tegumento, ricas em parasitas. (MAYRINK, W. *et al.*, 1979; CUNNINGHAM, A. C., 2002)

São conhecidas pelo menos treze espécies de *Leishmania spp.* causadoras de alguma variação da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), agrupadas em dois grandes grupos de Subgêneros, denominados 'Complexos', conforme as características morfológicas do agente causador (LAINSON, R. *et al.*, 1987). São eles:

- *Leishmania (Leishmania)*, que inclui as espécies patogênicas para seres humanos *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. pifanoi*, e *L. venezuelensis*.
- *Leishmania (Viannia)*, que inclui *L. brasiliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. shawi*, *L. lindenbergi* e *L. colombiensis*.

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é uma zoonose causada por protozoários parasitos constituintes do complexo “*Leishmania donovani*” que inclui os seguintes parasitos do gênero *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum* em países do Velho Mundo, e *Leishmania (Leishmania) chagasi* em países do Novo Mundo.

É uma doença crônica que ataca os órgãos internos, principalmente o fígado, baço, medula óssea e linfonodos (KAYE, P. e SCOTT, P., 2011). Causada por protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao complexo donovani do gênero *Leishmania* (BADARO, R. et al., 1986), como *L. donovani* no velho mundo e *L. chagasi/infantum* no novo mundo, que infectam preferencialmente macrófagos (LUKES, J. et al., 2007).

Pesquisando os aspectos moleculares da relação parasita-vetor e as interações vetor-hospedeiro da leishmaniose, Sacks e Kamhawi verificaram que a doença pode ser transmitida por mais de 29 vetores diferentes nas Américas, e que no Brasil o vetor principal da leishmaniose visceral é o *Lutzomia longipalpis* (SACKS, D. e KAMHAWI, S., 2001).

A doença é endêmica em 88 países, com prevalência de 12 milhões de casos e incidência estimada em 500.000 casos/ano, predominantemente pediátrica (MALLA, N. e MAHAJAN, R. C., 2006), com um amplo espectro de manifestações clínicas que vão desde o acometimento tegumentar leve até o envolvimento visceral grave.

Tabela 1- Principais espécies de *Leishmania* que afetam seres humanos*

Principais manifestações clínicas	Espécies
Velho mundo	
Leishmaniose visceral	<i>Leishmania donovani</i> e <i>Leishmania infantum</i>
Leishmaniose cutânea	<i>Leishmania major</i> , <i>Leishmania tropica</i> e <i>Leishmania aethiopica</i>
Leishmaniose cutâneo difusa	<i>L. aethiopica</i>
Novo mundo, Subgênero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniose visceral	<i>L. infantum</i> e <i>L. chagasi</i>
Leishmaniose cutânea	<i>L. infantum</i> , <i>Leishmania mexicana</i> , <i>Leishmania pifanoi</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>
Leishmaniose cutâneo difusa	<i>L. mexicana</i> e <i>L. amazonensis</i>
Novo mundo subgênero <i>Viania</i>	
Leishmaniose cutânea	<i>Leishmania braziliensis</i> , <i>Leishmania guyanensis</i> , <i>Leishmania panamensis</i> e <i>Leishmania peruviana</i>
Leishmaniose mucocutânea	<i>L. braziliensis</i> e <i>L. panamensis</i>

(*Adaptado de KAYE, 2011)

Todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas aos hospedeiros mamíferos por insetos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. As fêmeas destes vetores albergam na região média e posterior do intestino formas procíclicas, ditas imaturas, e formas *promastigota* metacíclicas infectivas. Estas últimas estão presentes no inóculo quando os vetores fazem a hematofagia em diversos vertebrados, que podem ser alguns roedores, cães ou o próprio homem. Após a entrada de formas *promastigota* metacíclicas no hospedeiro vertebrado, estas mudam de ambiente enfrentando assim seu primeiro obstáculo: escapar de mecanismos de resposta do sistema imune (HANDMAN, E., 1999; ANDRADE, B. B. *et al.*, 2007). Moléculas presentes na membrana do parasita tais como o Lipofosfoglicano (LPG) e a gp63

são responsáveis, em parte, por estes mecanismos que permitem ao parasita sobreviver neste novo microambiente (WINBERG, M. E. *et al.*, 2009)

O LPG é o principal antígeno de membrana da forma metacíclica e tem estrutura glicolípídica complexa, estando presente na superfície da *Leishmania*, inclusive no flagelo (SPATH, G. F. *et al.*, 2003). O LPG impede que moléculas do complexo de ataque à membrana do sistema complemento tenha acesso à superfície do parasita, reduzindo a sua lise. Além disso, a associação do LPG a moléculas séricas, C3b e C3bi, permite a entrada de formas infectivas do parasita em macrófagos humanos, através de seus receptores, CR1 e CR3, respectivamente (SPATH, G. F. *et al.*, 2003).

A gp63 também pode contribuir para a resistência das formas promastigota metacíclicas pela sua atividade proteolítica sobre as moléculas do sistema complemento. A proteólise do C3 e C5 do complemento pela gp63 gera peptídeos quimiotáticos, C3a e C5a, respectivamente, os quais atraem macrófagos imaturos que, por não estarem ativados, expressam poucas moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) da classe II, importantes para a apresentação de antígenos para os linfócitos T (GOMEZ, M. A. *et al.*, 2009). Esta expressão deficitária do MHC da classe II reduz a apresentação de antígenos para os linfócitos T, o que propicia a multiplicação do parasita durante a fase inicial da infecção.

Apesar das espécies de *Leishmania* serem consideradas como parasitas intracelulares obrigatórios de macrófagos, estudos recentes *in vitro* e *in vivo* demonstraram um grau maior de interação destes parasitas com outras células hospedeiras, inclusive células hematopoiéticas, que surgem a partir de um precursor mielóide comum e para células não hematopoiéticas como fibroblastos.

Em 2003, Laskay e colaboradores sugeriram que neutrófilos poderiam atuar na hipótese “cavalo de Tróia” ajudando formas promastigota a atingirem seus objetivos (LASKAY, T. *et al.*, 2003). Neste modelo, formas promastigota infectam neutrófilos que, por sua vez, entram em apoptose e são fagocitados por macrófagos. A internalização através do reconhecimento do neutrófilo apoptótico evita o contato

direto do parasita com receptores macrofágicos e induz a produção de fator de necrose tumoral beta- 1 (TGF- β 1). Desta forma, a entrada do parasita no macrófago é facilitada e a ativação desta célula inibida, resultando no estabelecimento da infecção

Na infecção por *L. major*, as consequências da fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos apresentam dois comportamentos que dependem do genótipo do hospedeiro (RIBEIRO-GOMES, F. L. *et al.*, 2004). Em camundongos BALB/c, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos leva a um aumento de sua carga parasitária em um mecanismo dependente da secreção de TGF- β 1 e prostaglandina E2 (PGE2). Já em camundongos C57BL/6, a carga parasitária diminui de maneira dependente de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e elastase neutrofílica (RIBEIRO-GOMES, F. L. *et al.*, 2004). Resultados recentes sugerem que a fagocitose de neutrófilos humanos apoptóticos favorece a replicação intramacrofágica de *L. amazonensis* via indução de TGF- β 1 e PGE2 (AFONSO, L. *et al.*, 2008). Nestes modelos, os parasitas intracelulares aproveitam o ambiente gerado pela interação entre as células apoptóticas e os macrófagos como mecanismo de escape devido à inibição da resposta inflamatória e evasão da morte no momento da infecção da célula hospedeira.

Além da capacidade que patógenos intracelulares têm de se beneficiarem dos processos anti-inflamatórios induzidos pelo reconhecimento de células apoptóticas por macrófagos, tem sido demonstrado que parasitas do gênero *Leishmania* são capazes de atuar de maneira ativa no programa de morte celular, seja pelo suicídio de uma subpopulação para garantir o sucesso do restante da população, seja por mimetizar o fenótipo apoptótico, ajudando o parasita a evadir os mecanismos microbicidas do sistema imune do hospedeiro.

O reconhecimento de células apoptóticas ocorre devido à expressão ou exposição de ligantes de superfície que interagem com as células fagocíticas do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas, sendo a fosfatidilserina (PS) um dos principais ligantes estudados nesse contexto (MOREIRA, M. E. e

BARCINSKI, M. A., 2004). O PS é um fosfolípido estrutural presente no folheto citoplasmático da membrana da bicamada lipídica que é externalizado em resposta a um estímulo apoptótico, caracterizando um dos eventos iniciais desse tipo de morte celular programada (MOREIRA, M. E. e BARCINSKI, M. A., 2004). Até este momento não está claro se existe um receptor específico para o PS e qual seria esse receptor, mas existe um consenso atual que o sistema de reconhecimento de ligantes na superfície de células apoptóticas compreende vários receptores na membrana de fagócitos que atuam de modo redundante, otimizando a capacidade do organismo de eliminar rapidamente essas células (BRATTON, D. L. e HENSON, P. M., 2008).

Em modelos murinos de infecção por *L. amazonensis*, a exposição de PS foi dependente do perfil genético de susceptibilidade (BALB/c) ou resistência (C57BL/6), induzindo respectivamente alta ou baixa expressão da molécula, com consequências diferenciais para a resposta imune na eliminação do parasita (WANDERLEY, J. L. *et al.*, 2006). O TGF- β 1 é uma das principais citocinas envolvidas na resposta macrofágica deflagrada em reconhecimento ao PS, é capaz de potencializar a via da arginase levando a produção de poliaminas, importantes moléculas envolvidas em eventos de proliferação celular e apoptose (WANDERLEY, J. L. *et al.*, 2005). A capacidade indutora da produção de TGF- β 1 tem sido considerada como um mecanismo de virulência potencial responsável pela infecção de humanos com *L. amazonensis*, bem como um mecanismo de escape para esse parasita (BARRAL-NETTO, M. *et al.*, 1992; BARRAL, A. *et al.*, 1995). Altos níveis de TGF- β 1 foram observados em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea difusa, quando comparado a lesões de cutânea localizada (DIAZ, N. L. *et al.*, 2006). Por outro lado, Giudice e *cols.* demonstraram que a resistência ao óxido nítrico de isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com diferentes formas clínicas se correlaciona com a severidade da doença (GIUDICE, A. *et al.*, 2007). Entretanto, a modulação negativa da produção de óxido nítrico na célula hospedeira induzida pela exposição de PS na superfície de *L. amazonensis* ainda não foi demonstrada.

A habilidade em induzir uma resposta anti-inflamatória utilizando características de células apoptóticas parece ser um mecanismo comum entre patógenos intracelulares que precisam lidar com mecanismos microbicidas das células hospedeiras. Situação semelhante parece ocorrer em outras infecções parasitárias, como tem sido mostrado na infecção por *Toxoplasma gondii* (SEABRA, S. H. *et al.*, 2004) e formas tripomastigotas de *T. cruzi* (DAMATTA, R. A. *et al.*, 2007), onde em ambos, a exposição de PS pelo parasita inibe a produção de óxido nítrico durante a infecção de macrófagos. Além disso, alguns vírus utilizam um mecanismo semelhante para serem internalizados por células hospedeiras, como o vírus Vaccinia (MERCER, J. e HELENIUS, A., 2008) e Citomegalovírus (SOARES, M. M. *et al.*, 2008).

1.1 APRESENTAÇÃO ANTIGÊNICA E O DESENVOLVIMENTO DAS RESPOSTAS IMUNE CELULAR E HUMORAL.

A apresentação antigênica é um fator determinante para que ocorra uma resposta imune efetora contra o patógeno. A resposta imune é mediada inicialmente pelas células dendríticas (DCs, *dendritic cells*), as quais ativadas fagocitam o parasita no local do inóculo e expressam os peptídeos antigênicos derivados do patógeno associados a moléculas do MHC de classe II. Nos linfonodos drenantes, esses peptídeos são apresentados a células T auxiliar *naïve* (virgem). A apresentação antigênica, a expressão de moléculas coestimuladoras, além de fatores relacionados à natureza do parasita e do microambiente celular levam os linfócitos T auxiliares a desenvolverem padrões de citocinas que definem as respostas Th1 e Th2, associadas à resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania*, respectivamente (KAYE, P. e SCOTT, P., 2011).

As citocinas são mediadores solúveis produzidos pelas células envolvidas na resposta imune. A presença dos parasitas está frequentemente associada com a produção de determinadas citocinas e a importância dessas moléculas na infecção parasitária é hoje bem conhecida, a partir de modelos murinos experimentais, principalmente na infecção por parasitas do gênero *Leishmania*. Nestes modelos, os mais conhecidos se referem a camundongos de linhagens isogênicas infectados pela espécie *Leishmania major* tais como C57Bl/6, CBA/J, C3H/He ou B10D2 que resistem de forma eficaz à infecção, curando-se em poucos meses (MOUGNEAU, E. *et al.*, 2011). Por outro lado, os camundongos BALB/c apresentam deficiência na resposta imune mediada por células T e falham no controle da multiplicação parasitária propiciando a visceralização do parasita e a morte dos animais (SACKS, D. e NOBEN-TRAUTH, N., 2002).

A resistência ou a susceptibilidade à leishmaniose em murinos está associada a duas populações de células T CD4⁺, funcionalmente diferentes e definidas pelo padrão de citocinas que produzem uma observação que tem sido estendida também à situação humana (ALEXANDER, J. e BRYSON, K., 2005).

Em camundongos isogênicos infectados com *Leishmania major* as células T CD4⁺ auxiliares 1 (Th1) produzem maiores concentrações de Interleucina 2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) e Linfotoxina (LT), enquanto que células T CD4⁺ auxiliares 2 (Th2) produzem IL-4, IL-5 e IL-13 (Launois *et al.*, 1998). Em termos gerais, esta dicotomia Th1/Th2 relaciona-se com diferentes funções efetoras: células Th1 produzem citocinas responsáveis por reações imunes mediadas por células, enquanto que células Th2 estão envolvidas na imunidade humoral.

A resposta Th1, desenvolvida por camundongos de linhagens isogênicas, tais como, a C57Bl/6 e a C3He, está associada à resistência contra a infecção por *L. major* demonstrada em experimentos nos quais, através de transferência adotiva comprovou-se a participação crucial das células T nesta resposta (Launois *et al.*, 1998). A relação entre a susceptibilidade à infecção por *Leishmania* e a presença de resposta Th2 foi confirmada a partir de observações feitas em camundongos BALB/c

susceptíveis, quando tratados no início da infecção com anticorpos contra moléculas de IL-4, revertendo à resposta Th2 predominante e conferindo a estes resistência acompanhada pelo desenvolvimento de resposta Th1 CD4⁺ (LAUNOIS, P. *et al.*, 1998).

Dentre os fatores solúveis que propiciam a resposta Th1 e consequente resistência contra a leishmaniose, a IL-12 desempenha um papel importante na diferenciação deste tipo de resposta e induz citotoxicidade e secreção de IFN- γ por linfócitos T e células NK (D'ANDREA, A. *et al.*, 1992). Neste contexto, o IFN- γ proveniente de células NK e linfócitos T, ativa macrófagos induzindo a produção de moléculas tóxicas tais como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o óxido nítrico (NO) (ESCALONA-MONTANO, A. R. *et al.*, 2010).

Enquanto que células Th1 produzem IFN- γ que confere proteção eficaz mediada por células contra a leishmaniose, a resposta Th2 propicia em contrapartida o desenvolvimento destes parasitas intracelulares, pois suplanta de forma satisfatória a resposta Th1. Em camundongos BALB/c, susceptíveis à leishmaniose, alguns tipos celulares tais como células T CD4⁺, mastócitos, eosinófilos e a subpopulação de células NKT 1.1 produzem níveis elevados de IL-4, logo no início da infecção por *Leishmania major*. Esta produção inicial de IL-4, no início da infecção, induz a diferenciação de células Th0 em Th2, que produzem IL-4, IL-5 e IL-13 (LAUNOIS, P. *et al.*, 1995).

Trabalhos têm demonstrado a participação da IL-13, uma citocina similar a IL-4, nos eventos que levam à diferenciação das células Th0 em Th2 (revisto por MCKENZIE, A. N., 2000). Estas duas citocinas inibem a síntese de IL-12, importante na indução da resposta Th1 e interferem de forma direta na produção de NO. Tanto a IL-4 quanto a IL-13 atuam reduzindo a expressão do mRNA da iNOS, responsável pela produção do NO (BOGDAN, C. *et al.*, 1994; BOGDAN, C. *et al.*, 1997).

No caso da IL-4, quando macrófagos peritoneais murinos, ativados *in vitro* com IFN- γ e LPS, são preincubados com esta citocina, ocorre inibição da iNOS e da produção de NO. Este mecanismo supressivo ocorre em duas etapas: inicialmente,

reduzindo a expressão do mRNA desta enzima e posteriormente diminuindo a concentração da iNOS (BOGDAN, C. *et al.*, 1994).

Além dos efeitos sobre os macrófagos, as citocinas de linfócitos Th2 induzem outros padrões efetores de respostas ineficientes na resposta a parasitas intracelulares. A IL-4 induz a produção de IgE por linfócitos B de camundongos e humanos, imunoglobulina importante no mecanismo de Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos (ADCC) contra helmintos (Handman *et al.*, 2000). A IL-4 é ainda importante na maturação de basófilos na medula óssea, células que ativadas pela IgE associada ao antígeno, liberam histamina e outras aminas vasoativas levando a migração de células para o foco inflamatório (MCKENZIE, A. N., 2000).

Outra citocina importante na resposta Th2 é a IL-5 que aumenta a produção e a ativação de eosinófilos contribuindo para a exacerbação de mecanismos da resposta humoral, desencadeada pela produção da IL-4 (BOGDAN, C. e ROLLINGHOFF, M., 1999).

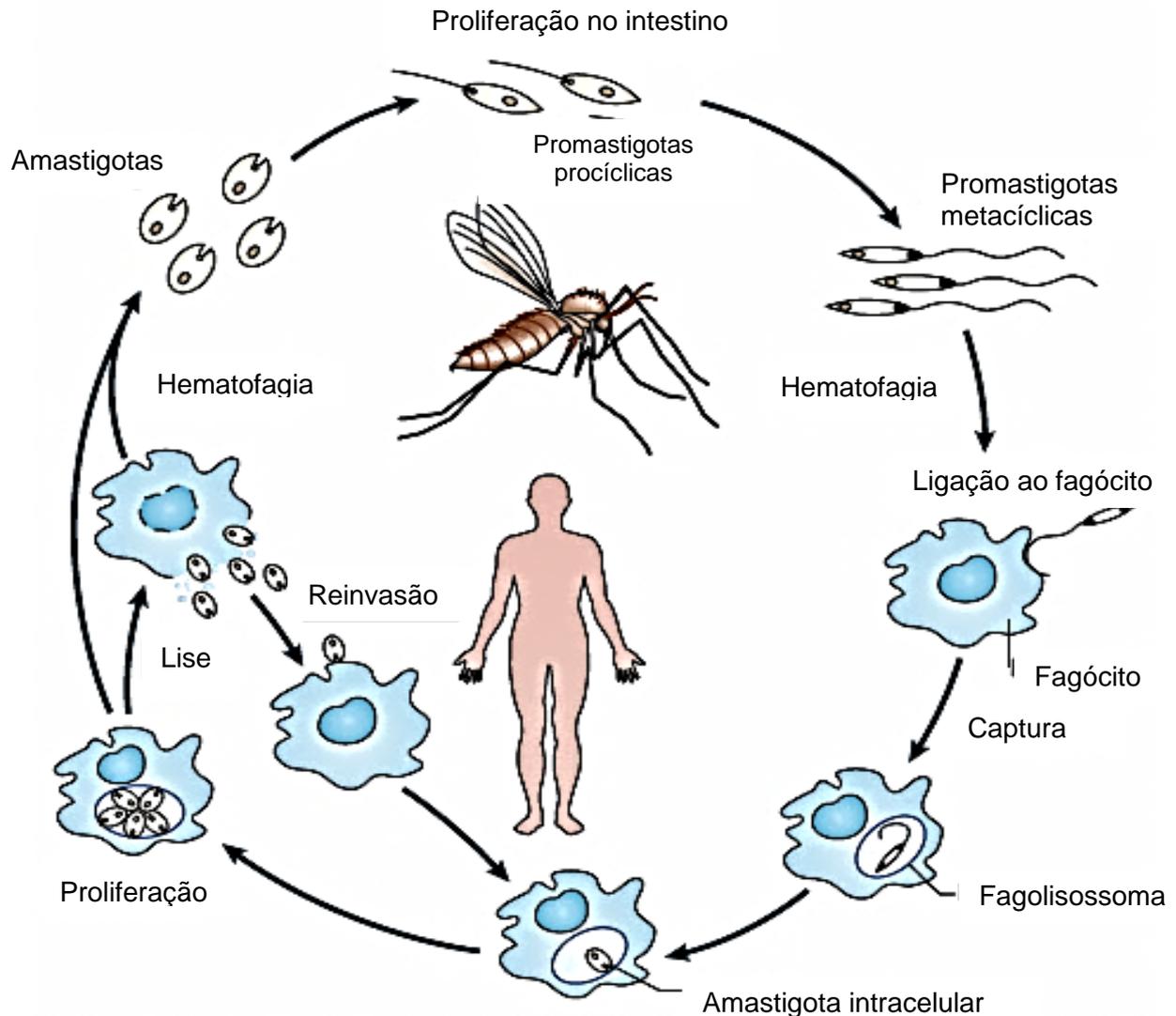
Moléculas tais como o TGF- β e a IL-10 também inibem uma série de atividades dos macrófagos, dentre elas a produção de IL-12 (revisito por MA, X., 2001). A produção de TGF- β também está associada à susceptibilidade a infecção por *Leishmania* porque aumenta a degradação do mRNA da iNOS, diminuindo a tradução da enzima iNOS (VODOVOTZ, Y. e BOGDAN, C., 1994).

A IL-10, assim como o TGF- β , inibe a produção de NO bloqueando a síntese de mRNA de TNF- α , importante na indução da iNOS em associação ao IFN- γ (OSWALD, I. P. *et al.*, 1992). Altas concentrações de IL-10 são produzidas durante a infecção por *Leishmania*, quando moléculas de IgG, ligadas a formas amastigota, associam-se a receptores para Fac. desta IgG (KANE, M. M. e MOSSER, D. M., 2001).

Recentemente, um novo padrão imune denominado Th17 tem sido descrito (IWAKURA, Y. e ISHIGAME, H., 2006; WEAVER, C. T. *et al.*, 2007), esta resposta é modulada pela citocina pró-inflamatória IL-17, secretadas principalmente por

linfócitos ativados (CD4+ e CD8+) (MIOSSEC, P., 2003) e que tem sido implicada em várias doenças inflamatórias humanas, por exemplo, artrite reumatoide, psoríase, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal e asma (IWAKURA, Y. e ISHIGAME, H., 2006; WEAVER, C. T. *et al.*, 2007). A IL-17 estimula uma variedade de células, por exemplo, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais a produzirem mediadores inflamatórios incluindo IL-1, TNF- α e quimiocinas. Estes eventos levam ao recrutamento de neutrófilos e outros leucócitos, células que caracterizam doenças inflamatórias. As células Th17 parecem desempenhar papéis complementares a respostas Th1 na leishmaniose visceral humana, sendo ambos requisitados para completa proteção do hospedeiro. A IL-17 também aumenta a produção de IL-6, que possui efeitos pró-inflamatórios e regulatórios da resposta imune (KORN, T. *et al.*, 2009) e a IL-22 aumenta a produção de moléculas pró-inflamatórias (BONIFACE, K. *et al.*, 2005). Sinergicamente IL-17 e IL-22 aumentaram a produção de peptídeos antimicrobianos, como as β defensinas, por células epiteliais (LIANG, S. C. *et al.*, 2006). Ambos os aumentos da barreira protetora epitelial e o recrutamento de células inflamatórias, incluindo neutrófilos, para a epiderme e fígado, podem contribuir para a proteção contra a *Leishmania* (BONIFACE, K. *et al.*, 2005; ZENEWICZ, L. A. *et al.*, 2007).

Figura 1 Ciclo de vida da *Leishmania*.



Durante o repasto sanguíneo, o mosquito regurgita formas *promastigota* metacíclicas em conjunto com imunomoduladores derivados do parasita (proteofosfoglicanos) e vários componentes salivares. As formas metacíclicas são depois fagocitadas por um dos vários tipos de células possíveis que são encontradas no local da infecção. Depois de se estabelecer intracelularmente as *promastigota* metacíclicas transformam-se em *amastigota* aflageladas, as quais replicam-se no interior das células hospedeiras, rompendo-as quando muitas *amastigota* estão presentes, permitindo a reinfeção dos fagócitos locais. O ciclo de transmissão é completo em um novo repasto sanguíneo quando *amastigota* convertem-se em *promastigota* no intestino médio dos flebotomíneos. (Adaptado de KAYE, 2011)

1.2 ÓXIDO NÍTRICO MOLÉCULA CHAVE NA RESPOSTA INTRACELULAR EFETIVA CONTRA *LEISHMANIA*

O óxido nítrico é uma das menores moléculas bioativas que pode ser produzido por diversos tipos celulares. Nos mamíferos três isoformas distintas são conhecidas: óxido nítrico neuronal (n)NOS ou NOS-I, óxido nítrico induzível (i)NOS ou NOS-II e óxido nítrico endotelial (e)NOS ou NOS-III. Estas enzimas são produtos da ativação de diferentes genes, com diferentes localizações, regulação, propriedades catalíticas e sensibilidade inibitória.

As isoformas NOS-III e NOS-I são ambas constitutivas e dependentes de Ca^{2+} -calmodulina (CaM). (BARRETO, R. D. L. *et al.*, 2005). A expressão de NOS- II é independente de cálcio e sua expressão pode ser induzida em grande variedade de células e tecidos através de citocinas e lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (ASSREUY, J. *et al.*, 1993), após indução a NOS-II produz continuamente óxido nítrico durante a degradação enzimática.

O NO é uma molécula extremamente reativa, produzida por um processo oxidativo a partir da L-arginina (NATHAN, C., 1992), dependendo das concentrações nos tecidos o óxido nítrico pode apresentar uma variedade de funções biológicas tais como o relaxamento vascular, a modulação da agregação plaquetária, algumas formas de neurotransmissão central e periférica, além de ação citotóxica e citostática de macrófagos (HIBBS, J. B., JR. *et al.*, 1988).

A produção de ânion superóxido (O_2^-) e do Óxido nítrico (NO) são os dois maiores mecanismos efetores na eliminação de parasitas intracelulares (BOGDAN, C. *et al.*, 1997). Apesar dos neutrófilos e macrófagos produzirem ânion superóxido, apenas a produção do óxido nítrico é verdadeiramente eficaz no combate à infecção por *Leishmania* (revisto em BOGDAN, C., 2001). Isto ocorre porque o parasita desenvolve mecanismos de escape à morte pelo O_2^- : o LPG e a gp63 inibem

respectivamente, a ativação da proteína quinase C (PKC) e a explosão oxidativa em monócitos e neutrófilos humanos (SORENSEN, A. L. *et al.*, 1994).

Numerosos estudos demonstraram a importância da NOSII e NO no controle de parasitos do gênero *Leishmania*. Camundongos knockout para iNOS infectados com *L. major* desenvolveram formas disseminadas da doença (EVANS, T. *et al.*, 1993) e observou-se aumento de iNOS em infecção *in vitro* de macrófagos humanos com *L. chagasi* (GANTT, K. R. *et al.*, 2001). Esses estudos indicam que o NO é uma molécula envolvida na viabilidade dos parasitos no interior de macrófagos.

O mecanismo de ação do NO parece estar correlacionado à sua capacidade de se associar a proteínas heme e proteínas não heme contendo Ferro e DNA, em geral. Estas interações têm muitas consequências sobre as células alvo: inibe a enzima ribonucleotídeo redutase e as consequentes sínteses de DNA e proteína; nitrosila o DNA levando à deaminação e quebras de cadeia; associa-se à aconitase e a complexos I e II suprimindo a respiração da mitocôndria; modula a regulação pós-transcricional em LB, além de suprimir a síntese de anticorpos e a proliferação de linfócitos T (revisito por STEFANOVIC-RACIC, M. *et al.*, 1993; NATHAN, C. e XIE, Q. W., 1994).

Um dos mecanismos de escape de formas *promastigota* de *Leishmania* em macrófagos consiste em impedir fosforilação e degradação do I κ B citoplasmático, resultando em posterior proliferação macrofágica de formas *amastigota*, pela consequente não formação de óxido nítrico, via translocação do NF- κ B para o núcleo. (PRIVE, C. e DESCOTEAUX, A., 2000). A ativação do NF- κ B demonstra ser um fator chave na regulação e indução de IL-12 e NOS-II (GRISCAVAGE, J. M. *et al.*, 1996).

1.3 NF-KB E SUA PARTICIPAÇÃO NA PRODUÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO

O mecanismo molecular envolvido na produção ou inibição de NO pela NOS-II está correlacionado com a ativação e desativação do NF- κ B. O NF- κ B é um fator nuclear (NF) heterodimérico, constituído de duas subunidades: p65 (também chamada RelA) e p50 que uma vez ativado, possui a capacidade de ligar-se a uma sequência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo das células B (κ B) (SEN, R. e BALTIMORE, D., 1986; BAEUERLE, P. A. e BALTIMORE, D., 1996; SIEBENLIST, U., 1997).

Na literatura, o termo NF- κ B autêntico designa a combinação p50/RelA, além dessas, outras subunidades foram descritas, tais como a c-Rel, RelB e p52, sendo provável que diferentes tipos de combinações sejam capazes de ativar diferentes genes ou ainda bloquear a transcrição do p50/RelA. (GLEZER, I. *et al.*, 2000)

As subunidades p50 e p52, sintetizadas como moléculas precursoras inativas, p105 e p100, respectivamente, formam homodímeros inibitórios da transcrição, pois se ligam a regiões promotoras sem exercer atividade, bloqueando a interação desses genes com o dímero ativo p50/RelA. (GHOSH, S. *et al.*, 1998)

O fator de transcrição NF- κ B é conservado na evolução e com ação descrita em diversas células que compõem os organismos complexos, apresentando uma gama de ação superior a todos os fatores de transcrição até então caracterizados. Essa superioridade deve-se aos variados estímulos que o ativam, bem como aos inúmeros genes e fenômenos que o NF- κ B regula. Entre esses estímulos estão os neurotransmissores (tais como o glutamato), proteínas neurotóxicas (como a β -amiloide), citocinas (interleucina-1 e fator de necrose tumoral), peptídeo natriurético atrial, ceramidas, produtos provenientes de vírus e bactérias por irradiação ultravioleta e ciclooxygenase tipo 2. Independente do estímulo, parece haver participação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e o aumento de cálcio intracelular para a ativação do NF- κ B.

Quando não estimulado, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do I κ B são necessárias para que ocorra a translocação (BAEUERLE, P. A. e BALTIMORE, D., 1996; BALDWIN, A. S., JR., 1996). O I κ B, assim como as subunidades que compõe o NF- κ B, pertence à família de proteínas Rel. Estudos de biologia molecular clonaram genes que codificam oito proteínas da família NF- κ B e sete da família I κ B até o momento. Os subtipos mais estudados de proteínas inibitórias são o I κ B α e o I κ B β , sendo o papel do I κ B α melhor caracterizado. Outras proteínas inibitórias dessa família incluem o I κ B ϵ , I κ B γ e o Bcl-3. A regulação da ativação do I κ B α e do I κ B β é diferente, o que aumenta a complexidade da ativação desse fator nuclear.

Vários estímulos levam à fosforilação do I κ B, que é fundamental para sua degradação. A proteína I κ B fosforilada recebe a adição de ubiquitina, pela ação da ubiquitina ligase, sendo em seguida degradada pelo complexo proteossoma 26S. Isso resulta na liberação do NF- κ B. Tanto o I κ B α como o I κ B β ligam-se ao p50, tornando a sequência localizadora de núcleo inacessível, impedindo sua translocação.

O desmembramento do complexo I κ B/NF- κ B permite o transporte do NF- κ B para o núcleo, com conseqüente ligação deste nos genes que apresentam a sequência regulatória GGGACTTTCC junto à região promotora, levando a um aumento na expressão do gene alvo. A fosforilação do I κ B ocorre pela ação de proteínas quinase específicas, como o complexo I κ B quinase (IKK), que contém duas subunidades com propriedades de quinase: IKK α e IKK β . O complexo IKK é capaz de discernir entre o I κ B complexado e o I κ B livre, explicando o fato do I κ B poder acumular-se nas células onde o IKK permanece ativado.

Muitas proteínas quinase estão envolvidas nesse processo de fosforilação e que esse mecanismo não está totalmente elucidado. A implicação desse fator de transcrição como alvo terapêutico decorre da enorme quantidade de genes que sofrem regulação pelo fator NF- κ B, implicados em vários processos celulares, tais

como desenvolvimento, plasticidade, morte e defesa celular. Entre tais genes pode-se enfatizar os envolvidos na expressão da NOS-II em macrófagos quando estimulados com LPS, IL-1 β , TNF- α ou citocinas de padrão Th1 efetivos na morte de parasitas intracelulares como as espécies de *Leishmania* (OZER, L. et al., 2010). A não expressão da NOS-II também tem sido comprovadamente atribuída à inibição da ativação do NF- κ B por agentes como glicocorticoide e antioxidantes, reforçando o envolvimento do NF- κ B na produção de fatores efetivos nas respostas celulares mediadas pelo óxido nítrico (PAUTZ, A. et al., 2010).

1.4 A TERAPIA CLÁSSICA

As drogas de escolha atualmente na terapêutica contra a *Leishmania* são derivadas de antimoniais. O primeiro agente antimonial contra esta parasitose foi o tártaro emético descoberto no início do século e rapidamente substituído por derivados antimoniais pentavalentes, menos tóxicos, estibogluconato de sódio e antimoniato de N-metilglucamina. Estes compostos são dez vezes menos tóxicos e podem ser tolerados em altas doses, sendo excretados lentamente (ROBERTS, W. L. et al., 1995). Os antimoniais pentavalentes são os medicamentos preferencialmente indicados contra a leishmaniose por apresentarem ótima excreção renal e não serem acumulados nos tecidos; entretanto, causam sérios efeitos colaterais como náuseas, diarreia, convulsões e cardiotoxicidade, além de algumas linhagens do parasita serem resistentes a estas drogas (LOISEAU, P. M. e BORIES, C., 1999).

Acredita-se que as drogas que utilizam estes compostos, atuem sobre o ciclo de vida da *Leishmania*, envolvendo vias bioquímicas específicas relacionadas ao metabolismo da glicose, purina, lipídeos e poliaminas (BERMAN, J. D. e FLECKENSTEIN, L., 1991).

1.5 ANTIMONIATO DE METILGLUCAMINA

No Brasil, o medicamento à base de antimônio, utilizado como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose, é o antimoníato de metilglucamina. O composto é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da N-metilglucamina, sendo a última obtida previamente a partir da aminação redutora da glicose em presença de metilamina. O composto, de fórmula estrutural não definida, é solúvel em água e pouco solúvel em solventes orgânicos. O antimoníato de metilglucamina é especialmente eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. O medicamento provoca regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença. Devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos, começaram a ocorrer falhas na terapia e consequente aumento das formas resistentes de parasitas (BERMAN, J. D. e WYLER, D. J., 1980; SERENO, D. e LEMESRE, J. L., 1997; BALANA-FOUCE, R. *et al.*, 1998).

A Organização Mundial de Saúde preconiza que as doses de antimoniais não devem ultrapassar 20 mg/kg/dia, não se ultrapassando o limite de 850 mg de antimônio (BALANA-FOUCE, R. *et al.*, 1998), devido à sua elevada toxicidade. Mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos são efeitos colaterais frequentemente associados ao uso destas drogas (HANDMAN, E., 1999). Após administração endovenosa ou intramuscular, o antimoníato de metilglucamina é rapidamente absorvido e, praticamente, 90% do antimônio é excretado nas primeiras 48 h pelos rins (LIMONGI, J. P., 1973). Em consequência, faz-se necessária a administração de doses elevadas do fármaco, em regime contínuo, para garantir um elevado teor de antimônio nos tecidos e, assim, obter a eficácia do tratamento. Efeitos colaterais como nefrites, distúrbios gastrintestinais, cardiovasculares e respiratórios têm sido observados.

Antimoniais pentavalentes são geralmente 10 vezes menos tóxicos em células de mamíferos, quando comparados aos antimoniais trivalentes (tártaro

emético), utilizados primeiramente por Vianna em 1912 (ROBERTS, W. L. *et al.*, 1998). Em determinados casos, além de destruir o parasita, o medicamento acaba por levar o paciente ao óbito (MARSDEN, P. D., 1985). O antimônio ainda pode ser detectado no cabelo do paciente tratado com antimoniais pentavalentes após um ano do término do tratamento (DOREA, J. G. *et al.*, 1987).

Apesar do emprego do antimoniato de metilglucamina no tratamento da leishmaniose por mais de 50 anos, a estrutura e composição do composto, igualmente ao gluconato de antimônio (V) sódico, ainda permanecem indeterminadas. Os dados mais recentes sobre a tentativa de caracterização do antimoniato de metilglucamina foram reportados por Roberts e colaboradores em 1988. Segundo os autores, a razão molar antimônio: N-metil-D-glucamina é de 1:1,37 e várias espécies complexas entre o antimônio e N-metil-D-glucamina coexistem em solução. Oligômeros foram observados, sendo a maior massa molar encontrada de 507. Espécies de forma geral (NMG-SB) n-NMG, onde NMG: N-metil-D-glucamina, foram identificadas. Demicheli e colaboradores em 1999, sintetizaram o antimoniato de metilglucamina e sugeriram que o antimônio se liga na metilglucamina através do oxigênio do carbono C-3. No entanto, a eficácia terapêutica destas formas poliméricas ou mesmo do antimônio pentavalente ainda não foi esclarecida (DEMICHELI, C. *et al.*, 1999). Há indícios que o Sb (III) é substancialmente mais potente do que o Sb(V) contra *promastigota* e *amastigota* de, pelo menos, três espécies de *Leishmania*. Esses resultados reforçam a hipótese de uma conversão metabólica intramacrofágica do Sb(V) em Sb (III) sendo, neste caso, o Sb (III) o elemento tóxico às Leishmanias no estado intracelular (SERENO, D. e LEMESRE, J. L., 1997). Pouco se compreende ainda sobre o mecanismo de ação desta droga e, sugere-se que o antimônio pentavalente possa ser uma pró-droga, sendo convertido a antimônio trivalente após sua administração (ROBERTS, W. L. *et al.*, 1998), e que assim possa interferir no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelular (BALANA-FOUCE, R. *et al.*, 1998). Além disso, existe na forma amastigota uma metaloprotease zinco-dependente, que poderia ser inativada se o antimônio

substituísse o zinco nesta enzima, essencial para o desenvolvimento do parasita (BANGS, J. D. *et al.*, 2001). Recentemente, Miekeley e colaboradores verificaram que, após administração intramuscular de antimoniato de N-metilglucamina em pacientes com leishmaniose, ocorre conversão *in vivo* do composto orgânico estibiado para as formas iônicas Sb^{3+} e Sb^{5+} . Ainda, foi observado que ocorre a bio-redução do Sb^{5+} para a sua forma trivalente, corroborando outros estudos que evidenciam que a formação *in vivo* do Sb^{3+} seja responsável tanto pela toxicidade da droga como pela atividade terapêutica da mesma (MIEKELEY, N. *et al.*, 2002).

1.6 OUTROS AGENTES QUIMIOTERÁPICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

Além dos antimoniais, outras drogas têm sido empregadas no tratamento das diversas formas da leishmaniose, entre as quais se destacam a pentamidina, anfotericina B, paromomicina e o miltefosine. A descoberta da atividade quimioterápica das substâncias do grupo das diamidas, do qual faz parte a pentamidina, foi inteiramente fortuita. A pentamidina, além de ser relativamente eficaz na terapia da leishmaniose, é eficaz no tratamento de casos incipientes de tripanossomíase gambiense ou rodesiana (DOUA, F. *et al.*, 1996). A pentamidina é comercializada sob o nome de Lomidina e encontra-se disponível, nos Estados Unidos, somente no Serviço de Medicamentos para Doenças Parasitárias do Serviço de Saúde Pública. No tratamento da *leishmaniose visceral* (leishmaniose por *L. donovani*, ou Calazar) a pentamidina foi usada com sucesso, em séries de 12 a 15 doses. A segunda série, administrada após intervalo de 1 a 2 semanas, pode ser necessária em áreas onde se sabe que a infecção responde de modo insatisfatório ao tratamento. A substância é particularmente útil em casos que não responderam aos antimoniais ou para pacientes com Calazar que sejam hipersensíveis ao

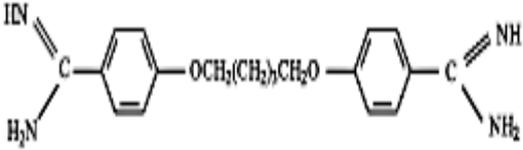
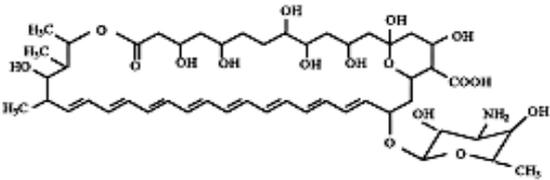
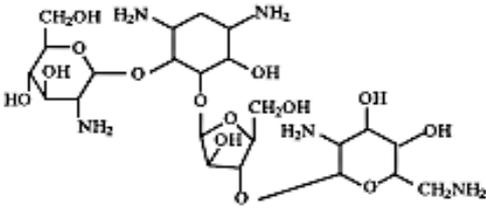
antimônio. A alta toxicidade desta droga também é fator limitante para o uso. Hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e, até mesmo, morte repentina foram descritas (BALANA-FOUCE, R. *et al.*, 1998).

A anfotericina B é um antibiótico antifúngico derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, sendo indicada para o tratamento da leishmaniose mucocutânea americana, embora não se considere fármaco de primeira eleição. A anfotericina B pode ser incorporada em lipossomas carregadores sendo absorvida pelo sistema reticuloendotelial onde o parasita da leishmania reside, e é assim pouco absorvido pelos rins, o maior órgão alvo para a toxicidade da anfotericina B. Outro medicamento que se tem mostrado efetivo contra a leishmaniose visceral é a paromomicina (também chamada aminosidine), antibiótico aminoglicosídeo que é ativo contra espécies de *leishmania in vitro* e *in vivo*. Estudos clínicos para se testar a eficácia da paromomicina injetável contra a leishmaniose visceral, têm sido realizados na Índia, onde o tratamento antimonial padrão não muito efetivo e as taxas de mortalidade são altas. Outro medicamento ainda utilizado no arsenal terapêutico é o alopurinol, vantajoso especialmente por sua administração oral e baixa toxicidade, porém há diversos casos relatados em que esta droga não foi eficaz no controle da infecção (MARTINEZ, S. e MARR, J. J., 1992). Atualmente, todos os medicamentos disponíveis para o tratamento da leishmaniose são injetáveis. Foi verificado que o miltefosine, uma droga anticâncer alquilfosfolipídica, é ativo contra *Leishmania spp.*, *in vitro* e *in vivo*, e pode vir a ser o primeiro tratamento oral para a leishmaniose visceral. Resultados de estudos de fase II, na Índia, indicam que quando o miltefosine é oralmente administrado é bem tolerado. Em todas as doses testadas, a droga produziu excelentes resultados de cura parasitológica (contra *Leishmania donovani*). Estudos clínicos de fase III do miltefosine contra leishmaniose visceral estão sendo planejados (FISCHER, C. *et al.*, 2001).

Tabela 2. Estrutura química de antimoniais pentavalentes empregados na clínica médica

Fórmula estrutural	Nome químico/nome comercial
$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{NHCH}_3^+ \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} \cdot (\text{OH})_2\text{Sb}_2\text{O}^+ $	<p>Antimoniato de N-metil gulacima</p> <p>Glucantime</p> <p>Antimoniato de meglumina</p>
$ \left[\begin{array}{ccc} \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{HCO} \\ \\ \text{HCO} \\ \\ \text{HCO} \\ \\ \text{COO}^- \end{array} & \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O}^- \\ \\ \text{Sb} - \text{O} - \text{Sb} \\ \\ \text{O}^- \end{array} & \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{OCH} \\ \\ \text{OCH} \\ \\ \text{OCH} \\ \\ \text{COO}^- \end{array} \end{array} \right] \cdot \text{Na}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O} $	<p>Gluconato de antimônio (V) sódico ou Estibogluconato de sódio</p> <p>Pentostam</p> <p>Solustibosan</p>
$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O} = \text{Sb} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{NH} - \text{CO} - \text{NH}_2 \end{array} $	<p>Uréia estibamina</p> <p>Estibamine</p>

Tabela 3- Outras drogas empregadas na terapia da leishmaniose, com os respectivos nomes químicos e comerciais

Fórmula estrutural	Nome químico/nome comercial
	<p>Isetionato de Pentamidina</p> <p>Lomidina</p>
	<p>Anfotericina B</p> <p>Fungizone</p>
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	<p>Miltefosine</p>
	<p>Paromomicina</p> <p>Humatin</p>

1.7 O USO DE PRODUTOS NATURAIS, SEUS CONSTITUINTES NA TERAPÊUTICA DAS LEISHMANIOSES E A BUSCA DE ALVOS TERAPÊUTICOS ESPECÍFICOS.

A descoberta de terapias para doenças tropicais está relacionada a estratégias tais como focar na identificação de novos compostos, sejam eles sintéticos, semissintéticos ou produtos naturais como pretendidos fármacos que irão compor o arsenal terapêutico.

A observação das propriedades terapêuticas de produtos naturais tem levado à pesquisa dos princípios ativos de várias espécies vegetais. Metabólitos especiais tais como alcaloides, terpenoides, flavonoides, considerados no passado como inativos, são hoje ferramentas importantes no tratamento e investigação clínica.

Compostos que estimulam o sistema imune são úteis quando usados como adjuvantes no tratamento de certas doenças causadas por fungos, bactérias e protozoários. No caso da leishmaniose, estudos químicos e imunofarmacológicos têm sido realizados com o intuito de encontrar novos compostos menos tóxicos, economicamente mais viáveis de efeito específico e que reverta a resistência do parasita às drogas.

Dentre as numerosas espécies com potencial na modulação da resposta imune na leishmaniose, a *Kalanchoe pinata* demonstrou efeito sobre a redução das lesões em camundongos de linhagem susceptível associado ao aumento da produção de óxido nítrico por macrófagos (BERGMANN, B. R. *et al.*, 1997).

O efeito leishmanicida dos compostos isolados das espécies vegetais tem sido avaliado *in vitro* sobre formas *promastigota* e/ou *amastigota* de *Leishmania* no decorrer dos anos; dentre eles terpenoides de *Artemisia annua* (YANG, D. M. e LIEW, F. Y., 1993), de *Peperomia galioides* (MAHIOU, V. *et al.*, 1995) e de *Guarea rhopalocarpa* (DEL RAYO CAMACHO, M. *et al.*, 2001); aminoglicosteroides e

aminosteroides de *Holarrhena curtisii* (KAM, T. S. *et al.*, 1998), naftoquinonas de *Pera benensis* (FOURNET, A. *et al.*, 1992; KAYSER, O. *et al.*, 2000), iridoídes glicosídicos de *Picrorhiza kurroa* (MITTAL, N. *et al.*, 1998); e neolignananas de *Virola surinamensis* (BARATA, L. E. *et al.*, 2000).

Estudos recentes focados em produtos naturais tem sido uma excelente maneira de se obter verdadeiramente uma rica fonte potencial de candidatos a fármacos contra a leishmaniose. Neste contexto, as classes dos alcalóides demonstraram-se mais eficientes, pois, além destes metabólitos secundários serem especialmente importantes para a defesa das espécies vegetais contra microrganismos e grande variedade de herbívoros; estes são igualmente relevantes para o desenvolvimento de drogas devido à sua ampla gama de efeitos farmacológicos, colocando-os também como moléculas bioativas de interesse para avaliação farmacológica em doenças negligenciadas (MISHRA, B. B. *et al.*, 2009).

A maioria dos fármacos são micromoléculas bioativas, que exercem seu efeito terapêutico graças a interações específicas com uma biomacromolécula ou receptor. Métodos computacionais modernos permitem que se determinem quali- e quantitativamente as diferentes contribuições das distintas subunidades estruturais dos fármacos, tanto aquelas de natureza eletrônica como estérica, quando de seu reconhecimento molecular pelos sítios receptores. Ademais, fatores farmacocinéticos e toxicofóricos das substâncias candidatas a novos fármacos podem ser simuladas virtualmente através de ferramentas computacionais modernas.

Pelo exposto, observa-se que a informática passou a ser aliada inseparável da química medicinal, especialmente através da química computacional que permite estudos de modelagem e dinâmica molecular. Desta forma, podem se planejar, virtualmente, candidatos a novos ligantes de determinados sítios receptores, em três dimensões (3D) pela construção de mapas farmacofóricos. Na leishmaniose, estes sítios podem estar relacionados a diversos alvos moleculares tais como os sistemas de transporte para glicose, purinas e outras biomoléculas essenciais, topoisomerase

tipo II, bem como diversos sistemas enzimáticos importantes e específicos do parasito. Desta maneira o uso mais racional, utilizando critérios seletivos de bioativos com potencialidade farmacológica podem melhor direcionar o estudo de fármacos, acelerando o estudo *in vitro*, pois apenas as moléculas mais propensas a desempenhar uma atividade *in silico* são aquelas utilizadas para prosseguirem os estudos *in vitro*, melhorando o tempo e o custo empregados nos ensaios, além de um melhor refinamento para possíveis alvos moleculares envolvidos com o parasita. Apesar da existência de ampla literatura sobre o uso de produtos naturais no tratamento de parasitoses (KIM, H. M. *et al.*, 1999), relativamente poucos trabalhos científicos, tem sido realizados em modelos experimentais de leishmaniose preocupando-se em elucidar o mecanismo de ação destes produtos.

Biomoléculas indutoras da produção de NO pelos macrófagos representam uma importante abordagem de investigação (BRUNET, L. R., 2001). Compostos bioativos de plantas, pertencentes a várias classes de metabólitos especiais tais como alcalóides, terpenóides e flavonóides têm revelado resultados promissores em estudos imunofarmacológicos, quando associados com alvos terapêuticos bem-definidos (SHUKLA, A. K. *et al.*, 2010).

1.8 SPIRANTHERA ODORATISSIMA ST. HIL (RUTACEAE)

A família Rutaceae é caracterizada por uma diversidade de metabólitos secundários, dentre os quais os mais representativos são alcaloides derivados do ácido antranílico, cumarinas, flavonoides e limonoides (PETER G, W., 1999)

Spiranthera odoratissima (Rutaceae) (Fig. 2), espécie vegetal encontrada no cerrado do Centro-Oeste brasileiro e na Bolívia, é popularmente conhecida como manacá nos estados de Mato Grosso e Goiás, cheirosa no estado de Minas Gerais e

acabadeira ou sarrinha no estado da Bahia (FREITAS, C. M. J. *et al.*, 2003; TRESVENZOL, L. M., 2006)

A espécie está distribuída nos estados de Goiás, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso e no Distrito Federal (ALMEIDA, C. F. C. B. R. e ALBUQUERQUE, U. P., 2002). Encontra-se na lista de espécies ameaçadas da flora de Minas Gerais, enquadrando-se na categoria vulnerável, ameaça que é atribuída, principalmente, à exploração de suas raízes para fins medicinais (MENDONÇA, M. P. e LINS, L. V., 2000).

Investigações etnobotânicas sobre o manacá revelam que a comercialização de suas raízes é realizada com frequência nos mercados e feiras livres do centro-oeste, sendo vendidas *in natura* ou associadas com outras plantas na composição de garrafadas para o tratamento de reumatismo (TRESVENZOL, L. M., 2006). Outras referências etnofarmacológicas mostram que o chá das raízes é utilizado para dores de estômago, dores de cabeça, dores musculares, disfunções hepáticas e para estimular o apetite (VIEIRA, R. F. e MARTINS, M. V. M., 2000) e o extrato etanólico das raízes apresenta compostos com atividade analgésica e anti-inflamatória (MATOS, L. G. *et al.*, 2004).

Estudos fitoquímicos desta espécie realizados por Ribeiro *et al.* (2005) e Terezan *et al.*, (2010) isolaram das raízes onze substâncias: dois novos limonoides, o limonoide já conhecido limonina, três alcaloides furoquinolínicos (dictamina, γ -fagarina e esquimianina), três alcaloides β -indoloquinazolínicos (rutaecarpina, evodiamina e 1-hidroxitrutaecarpina), a cumarina aurapteno e β -sitosterol (RIBEIRO, T. A. N. *et al.*, 2005; TEREZAN, A. P. *et al.*, 2010).

Recentemente, Albernaz *et al.*, (2010) demonstrou um efeito leishmanicida preliminar do extrato hexânico das raízes da *Spiranthera odoratissima*, contra formas *promastigota* de *L. (L.) chagasi*, vislumbrando, portanto uma maior necessidade de investigação desta espécie contra o gênero *Leishmania* (ALBERNAZ, L. C. *et al.*, 2010).

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar, *in vitro*, *in vivo* e *in silico* o efeito antileishmania de frações oriundas de diferentes partes de *Spiranthera odoratissima* e de compostos isolados oriundos das raízes e frutos, contribuindo para o estudo imunofarmacológico desta espécie encontrada amplamente na região central do Brasil, utilizada pela população para diversos fins terapêuticos.

Figura 2 - *Spiranthera odoratissima* ST. HIL (RUTACEAE) (Manacá)



Fonte: <http://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/sets/72157624320072118/>

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antileishmania da espécie *Spiranthera odoratíssima* St. Hill (Rutaceae) utilizando as frações e compostos isolados oriundos de diferentes partes desta espécie vegetal, utilizando ensaios *in vitro*, *in vivo* e *in silico*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antipromastigota *in vitro* das frações e compostos isolados oriundos da *Spiranthera odoratíssima* St. Hill sobre as formas promastigota e amastigota de *L.(V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903, *L.(L.)pifanoi* MHOM/VE/1957/LL1, *L.(L.)lainsoni* MHOM/BR/1987/M6426, *L.(L.)chagasi* MHOM/BR/1981/phufms-181
- Estudar a citotoxicidade das frações e compostos isolados sobre as células de linhagem macrofágica -J774 A.1.
- Avaliar a capacidade anti-amastigota dos compostos isolados de *S. odoratíssima* em macrófagos infectados com *L. braziliensis*.
- Verificar a capacidade de induzir óxido nítrico dos compostos isolados de *Spiranthera odoratíssima* St. Hill por estudo de modelagem molecular.
- Investigar, *in vitro*, os compostos selecionados, via a produção de citocinas envolvidas na resposta celular e humoral.
- Avaliar, *in vivo*, a ação leishmanicida das frações e substâncias da *Spiranthera odoratíssima* St. Hill previamente selecionados *in vitro* e *in silico*.

MATERIAL E MÉTODOS

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Reagentes e drogas.

Os seguintes reagentes e drogas foram utilizados: canamicina, tripsina (Gibco, NY, EUA), soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, SP, Brasil). Estreptoavidina-fosfatase alcalina conjugada, IFN- γ recombinante de camundongo, anticorpo monoclonal IL-10 de camundongo e padrão IL10 recombinante de camundongo, anticorpo monoclonal IL-12 de camundongo e padrão IL12 recombinante de camundongo adquiridos da BD Bioscience (Pharmingen™, CA, USA) e alamarBlue® (Invitrogen, CA, USA). Todos os outros reagentes e drogas apresentaram grau analítico (Sigma Aldrich, MO, USA).

3.1.2 Células

Macrófagos murinos da linhagem J774 A.1 (ATCC CR-107), tipo celular macrófago/monócito, oriunda de um sarcoma de uma adulta fêmea da linhagem BALB/c foram utilizados e cultivados em meio de cultura celular RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA), suplementado com antibióticos estreptomomicina (10mg/mL), penicilina (6mg/mL) e canamicina (2mg/mL; Gibco, Grand Island, NY, USA) e 10% de soro bovino fetal (SBF), mantidos a 37°C e 5% de CO₂. Repiques semanais para

o estabelecimento da cultura celular foram realizados. As células J774 A.1 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

3.1.3 Parasitos

Formas *promastigota* de fase estacionária de *L.(V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903, *L. (L.) pifanoi* MHOM/VE/1957/LL1, *L. (L.) lainsoni* MHOM/BR/1987/M6426, *L. (L.) chagasi* MHOM/BR/1981/phufms-181 foram utilizadas e mantidas em meios de cultura Schneider suplementado com antibióticos estreptomicina (10mg/mL; Sigma, St. Louis, MO, USA) e penicilina (6mg/mL; Sigma, St. Louis, MO, USA) e 20% de soro bovino fetal (SBF; Cultilab, Campinas, SP, BR), mantidas a 26°C em estufa incubadora B.O.D. Os parasitos utilizados foram obtidos de cultura celular de 6 a 7 dias de crescimento quando as formas *promastigota* estão na fase estacionária. As espécies de *Leishmania* foram adquiridas da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz- CLIOC- Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação das frações e compostos de *S. odoratissima*

Amostras de *S. odoratissima* St. Hill foram coletadas no município de Barão de Melgaço, Km 1, Mato Grosso, Brasil. A exsicata foi depositada no herbário central da Universidade Federal de Mato Grosso (registro # 24246). As frações metanólicas das raízes e folhas, e os compostos aurapteno e limonina foram gentilmente cedidos

pela Dra. Tereza A. N. Ribeiro. Os extratos dos frutos foram obtidos por maceração a frio, com 197.0 g de material inicial, utilizando-se hexano como solvente (3.0 L). O macerado foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida. A fração hexânica foi separada por sistema de cromatografia em coluna (CC) utilizando-se misturas Hex /AcOEt com polaridade crescente. Este procedimento resultou em 17 frações. A Fração de número 12 foi purificada por cromatografia em coluna (CC) e preparativa, resultando no alcaloide esquimianina (148,3mg).

3.2.2 Determinação da concentração que inibe 50% do crescimento do parasita (IC50).

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* foi realizado para determinar a concentração inibitória de 50% (IC50) das frações e compostos da *S. odoratíssima*, utilizando-se 1×10^5 de formas promastigota de *L. braziliensis*, *L. pifanoi*, *L. chagasi*, e *L. lansonii*, mantidas em meio Schneider, suplementado com soro bovino fetal a 26°, incubados em placas de 96 poços com a droga padrão anfotericina B (10 µg/ml) e as frações hexânica do fruto (Fhf), metanólica das folhas (Lmf) metanólica das raízes (Rmf), e isolados esquimianina (Skm), aurapteno (Aup) e limonina extraídos da *S. odoratíssima*. Estes compostos foram testados em concentrações entre 0.5 a 250 µg/mL, dissolvido em meio de cultura Schneider e DMSO 0,1%. Como controle negativo, os parasitas foram cultivados apenas em meio Schneider e meio Schneider contendo o diluente das frações e compostos (DMSO 0,1%).

A viabilidade das formas *promastigota* foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor da absorbância gerada em espectrofotômetro. Após 72 h, de incubação a 26°C, 50µl de solução de MTT (2mg/mL) foram adicionados em cada poço e depois incubados por 4h a temperatura de 24° C. Após este período, a placa foi centrifugada a 5.000 rpm por 7

mim e os sobrenadantes de cada poço foi removido e 100 µl de DMSO foi adicionado. Os cristais de formazan foram dissolvidos por agitação, a absorbância foi determinada por leitora de ELISA (Bio-Tek, Eix800) utilizando-se o filtro de 540nm. Os dados foram plotados em curva de regressão linear (GraphPad Prism versão 5.02 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia USA) e os resultados expressos em IC50 como descrito por Sereno e Lemestre (1997). Este experimento foi realizado em triplicata.

3.2.3 Determinação da citotoxicidade (CC50) e índice de seletividade (IS) das frações e compostos isolados da *SPIRANTHERA ODORATISSIMA* St. Hill.

Macrófagos J774-A.1, foram cultivados em frascos de cultivo celular 25 cm², em meio RPMI-1640 (Sigma), suplementado com antibióticos estreptomicina (10mg/mL), penicilina (6mg/mL) e canamicina (2mg/mL) e 10% de soro bovino fetal (SBF), mantidas a 37°C e 5% de CO₂, esta cultura após adquirir semi-confluência, foi lavada uma vez com a solução tampão Hanks, tripsinizada e as células contadas em câmara de Neubauer, ajustando o número de células para 2 x 10⁵ células/mL em meio RPMI completo. Desta suspensão, as células foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. A seguir foram preparadas diferentes concentrações de Fhf, Lmf, Rmf, Skm, Aup e limonina em concentrações entre 0.5 a 250 µg/mL, as quais foram adicionadas as células, sendo incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Como controle negativo as células foram cultivadas contendo o diluente DMSO 0,1%. A doxorubicina (10 µg/mL; Eurofarma, São Paulo, SP, BR) foi utilizada como controle positivo neste bioensaio.

A concentração citotóxica 50% (CC50) de cada fração ou composto foi avaliada do indicador de oxirredução (redox) alamar blue (AB; Biosource, Camarillo, CA) conforme Al-Nasiry e cols. (AL-NASIRY, S. et al., 2007). Após o período de

incubação, o meio de cultura foi retirado e a seguir foram adicionados 20µL de alamar blue e 180 µL de meio RPMI completo. Após 6 horas de incubação, a absorbância foi lida em filtros de 570 nm (estado oxidado) e 595 nm (estado reduzido) no leitor de ELISA (BIORAD 640) e a leitura visual da placa foi feita pelo indicador redox, onde a cor azul oxidada representa morte celular e a cor lilás representa células viáveis. Os dados foram analisados em curva de regressão linear (GraphPad Prism versão 5.02 para Windows, GraphPad Software, Califórnia, USA) e os resultados foram expressos como CC50, sendo considerado citotóxico $CC_{50} < 50$ µg/ml de acordo com Froelich e cols. (FROELICH, S. et al., 2007). Os experimentos foram realizados em triplicata. O índice de seletividade foi calculado considerando-se a razão entre CC50 e IC50 para cada composto testado (CC50/IC50).

3.2.4 Análise *in silico*

Para analisar a possibilidade da ligação da Skm com a NOS-II murina, foi realizado um estudo de docking molecular, utilizando-se o programa Molegro Virtual Docker (THOMSEN, R. e CHRISTENSEN, M. H., 2006). A Skm foi justaposta frente a estrutura cristalográfica do domínio oxigenase da NOS-II murina (PDB ID: 3E68) (GARCIN, E. D. *et al.*, 2008).

3.2.5 Determinação da produção de óxido nítrico em macrófagos.

A síntese de NO foi avaliada em microplacas por método indireto através dos níveis de nitrito (DING, A. H. *et al.*, 1988); (GREEN, L. C. *et al.*, 1982). Para quantificação do nitrito, foram utilizadas alíquotas de 0.1 ml dos sobrenadantes das culturas de macrófagos J774 A.1 tratadas na presença de Fhf ou Skm (em

concentrações entre 1.6, 8 ou 40 µg/mL) durante 24 h. Os sobrenadantes foram incubados com igual volume de reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0.1% de dihidroclorato de N-(1-naphtil)-etilenodiamina, 2,5% H₃PO₄) em temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi lida em leitor de Elisa em filtro de 540 nm (BIORAD 640). Como controles positivos foram utilizadas concentrações de 100 U/ml de IFN-γ (Recombinant Mouse IFN-γ/BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) e 50 ng/ml de LPS (Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* Serotype 0111:B4 – Sigma, St. Louis, MO, USA). Os níveis de nitrito foram determinados comparando-se as absorbâncias obtidas com uma curva padrão previamente determinada. Todos os reagentes e materiais além da Fhf e Skm encontravam-se livres de LPS (< 0.2 ng/ml of endotoxin) parâmetros determinados pelo ensaio Limulus de lisado de amebócitos (Sigma).

3.2.6 Infecção de macrófagos com *Leishmania braziliensis* e tratamento com os compostos em estudo.

Macrófagos J774 A.1 (10⁵ células por 0.1 mL) foram semeados sobre lamínulas circulares de vidro no interior de placas de 24 poços em meio RPMI 1640 (Sigma), suplementado com 10% de SBF por 24 horas, a 37°C na presença de 5% de CO₂ para adesão das células. Após este período as células não aderidas foram retiradas e as células aderentes foram lavadas em meio RPMI incompleto e infectadas com 2x10⁶ formas *promastigota* infectivas de *Leishmania (V.) braziliensis*, proporção 20:1, após 12 horas as formas *promastigota* extracelulares foram removidas lavando-se os poços com PBS, logo em seguida as células foram tratadas com 1.6 µg/ml de Fhf ou Skm, LPS (50ng/mL), IFN-γ (100 U/mL), LPS e IFN-γ e incubadas por 24, 48 e 72 horas a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂. Os macrófagos foram fixados com metanol e corados com hematoxilina/eosina (HE). *Amastigotas* intracelulares foram contadas e o índice de infecção determinado

multiplicando-se a percentagem de macrófagos infectados pela média do número de *amastigota* por macrófagos. Foi padronizado duzentos macrófagos em cada lamínula analisada (DE SOUZA CARMO, E. V. *et al.*, 2010). Procedimento semelhante foi realizado para avaliação da participação do óxido nítrico na morte de parasitas intracelulares tendo como parâmetro o índice de infecção. Para esta análise, foi adicionado aminoguanidina (2mM), um inibidor seletivo da NOS-II, durante 72h a cultura de macrófagos na presença ou ausência dos estímulos (LPS e IFN- γ) citados acima.

3.2.7 Quantificação de citocinas: IFN- γ , IL-12 e IL-10

IFN- γ , IL-12 e IL-10 foram determinadas por ELISA utilizando-se anticorpos e padrões obtidos da Pharmingen™ (San Diego, CA, USA). Placas de 96 poços de poliestireno (Dynatech, Alexandria, VA, USA) foram mantidas overnight a 4°C com 50 μ l dos anticorpos monoclonais (*anti mouse*) para IFN- γ , IL-12 e IL-10, logo em seguida as placas foram lavadas com solução (PBS) e 10% de Tween-20, bloqueadas por 60 min a 37°C com uma solução SBF diluída em PBS. Foram utilizados 100 μ L de sobrenadante das culturas estabelecidas, infectadas e não infectadas com *L. braziliensis*, submetidas ao tempo de tratamento de 48h com Fhf e Skm (1.6 μ g/ml) e foram adicionados 100 μ l dos padrões (IFN- γ , IL-12 e IL-10 recombinantes) em triplicata aos poços e incubados a 37°C por 24 h. Após a lavagem das placas, foram adicionados 100 μ l dos anticorpos monoclonais *anti mouse* IFN- γ , IL-12 e IL-10, em cada poço por 45 min a 37°C. Streptavidina conjugada a fosfatase alcalina (Pharmingen) foi adicionada e incubada por mais 30 min a 37 °C, após incubação 100 μ l de p-nitrophenil-fosfato (Sigma, usado até 1 mg/ml) diluído em 0.1 M de tampão glicina foi adicionada. As placas foram incubadas por 30 min à 37°C em ambiente escuro, em seguida as placas foram lidas em comprimento de onda de 405 nm em leitor de ELISA (BIORAD 640).

3.2.8 Determinação da expressão P38 E NF-κB (p50, p65) por Western blot

Macrófagos infectados e não infectados ($5 \times 10^6/5$ mL) foram cultivadas em garrafas de 10 cm de diâmetro (Corning Incorporated, NY, USA). Vinte e quatro horas (24 h) após infecção com 25×10^6 *promastigota* na proporção 1:5 (células/parasita), os parasitas livres foram removidos e as células aderidas tratadas como Fhf e Skm na concentração de 1.6 µg/mL, após 18 horas de exposição, as células foram lavadas três vezes com PBS e logo após expostas a tampão de lise (NaCl 150 mM, 1% NP-40, 0.5% DOC, dodecilsulfato de sódio 0.1%, 50 mM de Tris, pH-8 (RIPA), contendo um coquetel de inibidores de proteases (3.2 mg/ml) (Roche, Suíça). As células foram posteriormente coletadas por scrapping e após 30 min de incubação em gelo, o lisado foi centrifugado a 5000 rpm durante 30 min a 4° C. O sobrenadante foi coletado e estocado a -70 °C. Os sobrenadantes provenientes dos macrófagos infectados não tratados e macrófagos não infectados oriundo da lise celular foram igualmente preparados e usados como controle. A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de proteína Bio-Rad (laboratório Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Para a determinação do conteúdo de NF-κB e p38, foram aplicadas 30-80 µg de proteína no gel de poli-acrilamida com SDS a 10% (SDS-PAGE). Foi utilizado sistema de eletroforese (modelo mini protean II cell - Bio Rad®) e gel de acrilamida: bisacrilamida (40:1) com 1,5 mm de espessura. A corrida foi realizada em tampão de eletroforese (200 mM de Tris-HCl; 1,52 M de glicina; 7,18 mM de EDTA, 0,4% de SDS; pH 8,3) sob corrente de 50 V até a passagem das proteínas do gel de empilhamento e de 120 V no gel de separação por aproximadamente duas horas. Ao término da corrida, os géis foram preparados para a transferência para membranas de PVDF (Amershan Hybond- P Biosciences - UK England HP97 9NA). O gel foi colocado em solução de transferência (25 mM de Tris-HCl; 192 mM de glicina; 20% de metanol e 0,02% de SDS, pH 8,3) com as esponjas, filtros e a membrana. A transferência das proteínas do gel para a membrana foi

conduzida a 120 V, por 2 horas e 30 minutos. Após a transferência, a membrana foi corada com 0,1% de Ponceau S (Sigma) em ácido acético 5% para a conferência da transferência. A ligação não-específica de proteínas à membrana foi reduzida pela incubação da membrana em tampão de bloqueio com leite desnatado 10% em solução basal TBS-T (10 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween-20) por 1 hora, seguido de lavagens (3 vezes de 20 minutos com solução basal). As membranas foram posteriormente incubadas *overnight* em geladeira com anticorpos primários correspondentes a cada uma das proteínas em estudo, diluídos em solução basal contendo 0,3% de BSA. Após incubação com o anticorpo primário, foi realizada a lavagem da membrana (3 vezes de 10 minutos com solução basal) e incubação por 2 horas à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário diluído em solução basal. Em seguida, a membrana foi incubada por 5 minutos com a mistura de reagente (1:1) do kit de quimioluminescência amplificada *Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific), o excesso de reagente foi removido e a revelação realizada em filme *Kodak medical X-ray film* (Kodak, Rochester, NY, USA). A análise da densitometria foi realizada utilizando o programa ImageJ (Wayne Rasband, *National Institute of Health*, NY, USA). O termo unidade arbitrária refere-se ao valor densitométrico da banda no filme radiográfico.

3.2.9 Tratamento com fração hexânica do fruto e esquimianina dos camundongos infectados com *Leishmania braziliensis*.

Camundongos *Swiss* foram divididos em quatro grupos (N=6) e posteriormente infectados no coxim plantar com formas promastigota de *Leishmania braziliensis* na fase estacionária ($4,5 \times 10^8$ /ml). Posteriormente, cada grupo foi tratado respectivamente durante três dias com Fhf (2mg/kg), Skm (1,6µg/kg), PBS e Glucantime (200 mg/kg). O crescimento da lesão foi mensurado semanalmente com um paquímetro (Mutitoyo; 0,01mm) durante 8 semanas, e expresso como a

diferença entre a espessura da pata infectada e da contralateral. Este procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal de Mato Grosso, sob o registro nº 23108.024472/09-9.

3.2.10 Análise da carga parasitária

Camundongos Swiss foram infectados com $4,5 \times 10^8$ /ml de *L. braziliensis* e posteriormente foram tratados com Fhf e Skm (2,0 mg/kg e 1.6 µg/kg) respectivamente, Glucantime (200mg/kg) e PBS. Após estes procedimentos, foram retirados linfonodo e baço destes animais na sexta e oitava semanas pós-infecção. Estes órgãos foram homogeneizados e as células obtidas foram lavadas, contadas e diluídas (2×10^6 /ml) em meio Schneider na razão 1/2 (entre 5×10^5 e $1,5 \times 10^4$) e 200µl destas suspensões foram cultivadas em duplicata em placas de 96 poços. A quantificação das formas *promastigota* foi realizada após 7 dias em Câmara de Neubauer (LIMA, H. C. *et al.*, 1997) Registro nº 23108.024472/09-9 CEPA-UFMT.

3.2.11 Análises estatísticas

As diferenças entre as médias foram obtidas através da análise de variância *one-way* (ANOVA). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes, utilizado o método de Bonferroni para ajustar comparações múltiplas.

RESULTADOS

4.0 RESULTADOS

4.1 EFEITO DAS FRAÇÕES E COMPOSTOS DA *SPIRANTHERA ODORATÍSSIMA* ST. HIL SOBRE FORMAS PROMASTIGOSTAS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* E MACRÓFAGOS MURINOS DA LINHAGEM J774 A.1.

O potencial leishmanicida das frações (metanólica e hexânica) de *S. odoratíssima* St. Hill e seus compostos (esquimianina - Skm, aurapteno e limonina) isolados de diferentes partes (frutos, raízes e folhas) contra *L. braziliensis*, *L. chagasi*, *L. lansoni* and *L. pifanoi* foram avaliados. Estes compostos foram utilizados nas concentrações que variaram entre 0.5 a 250 µg/ml e analisados em diferentes períodos de tempo (24, 48 e 72 h) a fim de determinar a concentração inibitória destes compostos frente às cepas de Leishmania testadas. Os resultados obtidos demonstraram que dentre os compostos testados apenas o Fhf e Skm exibiram IC50 de 0,972 e 0,783 µg/ml respectivamente, e ambos apresentaram a maior eficácia contra as formas *promastigota* de *L. braziliensis* (Tabela 3). A droga padrão anfotericina B, utilizada como controle positivo, apresentou efeito inibitório na proliferação das formas *promastigota* reduzindo este parâmetro em 0,38 µg/ml e o agente diluente DMSO (0,1%) não apresentou alteração na viabilidade e proliferação das formas *promastigota* (dados não mostrados). O alamar blue (AB) foi utilizado como ferramenta efetiva para avaliar a atividade metabólica e proliferação de linhagens celulares. Neste bioensaio é quantificada apenas a redução da resazurina á resorufina o qual revelou que todos os compostos apresentaram baixa toxicidade frente à linhagem celular J774. A.1. Os resultados forneceram a CC50 para Fhf de 58,94 e Skm de 54,73. Estes dados demostram que Fhf e Skm podem ser testadas em concentrações abaixo de 50 µg/ ml. O índice de seletividade (IS) avalia a

seletividade de drogas contra o parasita, e os maiores IS foram para Skm (69,9) e Fhf (60,6), indicando uma maior eficácia e segurança destes compostos contra *L.braziliensis* comparados com os outros compostos testados. Os IS para os demais compostos testados foram inferiores aos obtidos para o Fhf e Skm, variando entre 0,47 a 1,23. Portanto Skm e Fhf foram escolhidos para uma avaliação leishmanicida mais aprofundada, utilizando-se concentrações entre 1,6 µg/ml a 40 µg/ml. Todos os dados obtidos CI50, CC50 e IS, estão apresentados na tabela 3.

Tabela 4: Efeito das frações e compostos da *Spiranthera odoratissima* ST. HIL sobre formas promastigota de diferentes espécies de *Leishmania* e macrófagos murinos da linhagem J774 A.1

Tratamento	CC ₅₀ (µg/mL) J774 Cell	<i>L. pifanoi</i>		<i>L. chagasi</i>		<i>L. brasiliensis</i>		<i>L. lansoni</i>	
		IC ₅₀ (µg/mL)	IS						
Lmf	61.05 (53.01-70.05)	128.03 (104.1-141.2)	0.47	157.02 (138.3-167.8)	0.38	62.36 (48.67-87.34)	0.97	204.7 (198.3-210.60)	0.29
Rmf	75.50 (66.74-85.73)	98.67 (86.9-102.3)	0.76	183.87 (168.4-194.7)	0.41	73.22 (61.63-92.48)	1.03	176.8 (167.3-183.1)	0.42
Fhf	58.94 (45.38-70.48)	73.07 (68.09-76,710)	0.80	43.84 (40.97-47.86)	1.34	0,972 (0.678-1.23)	60.6	206.5 (199.4-211.2)	0.28
Skm	54.73 44.17-68.03	86.65 (74.87-89.62)	0.63	167.45 (153.8-176.4)	0.32	0.783 (0.569-1.04)	69.9	232.7 (226.8-241.2)	0.23
Aurapteno	63.95 (52.75-80.25)	53.42 (47.12-63.02)	0.99	183.91 (169.2-195.8)	0.34	198.92 (187.4-201.1)	0.32	84.82 (73.57 – 91.87)	0.75
Limonina	86.20 (77.8- 101,3)	74.7 (68.93-77.02)	1.15	87.94 (76.53-92.03)	0.98	176.83 (165.3-179.7)	0.48	69.73 (61.52-81.53)	1.23

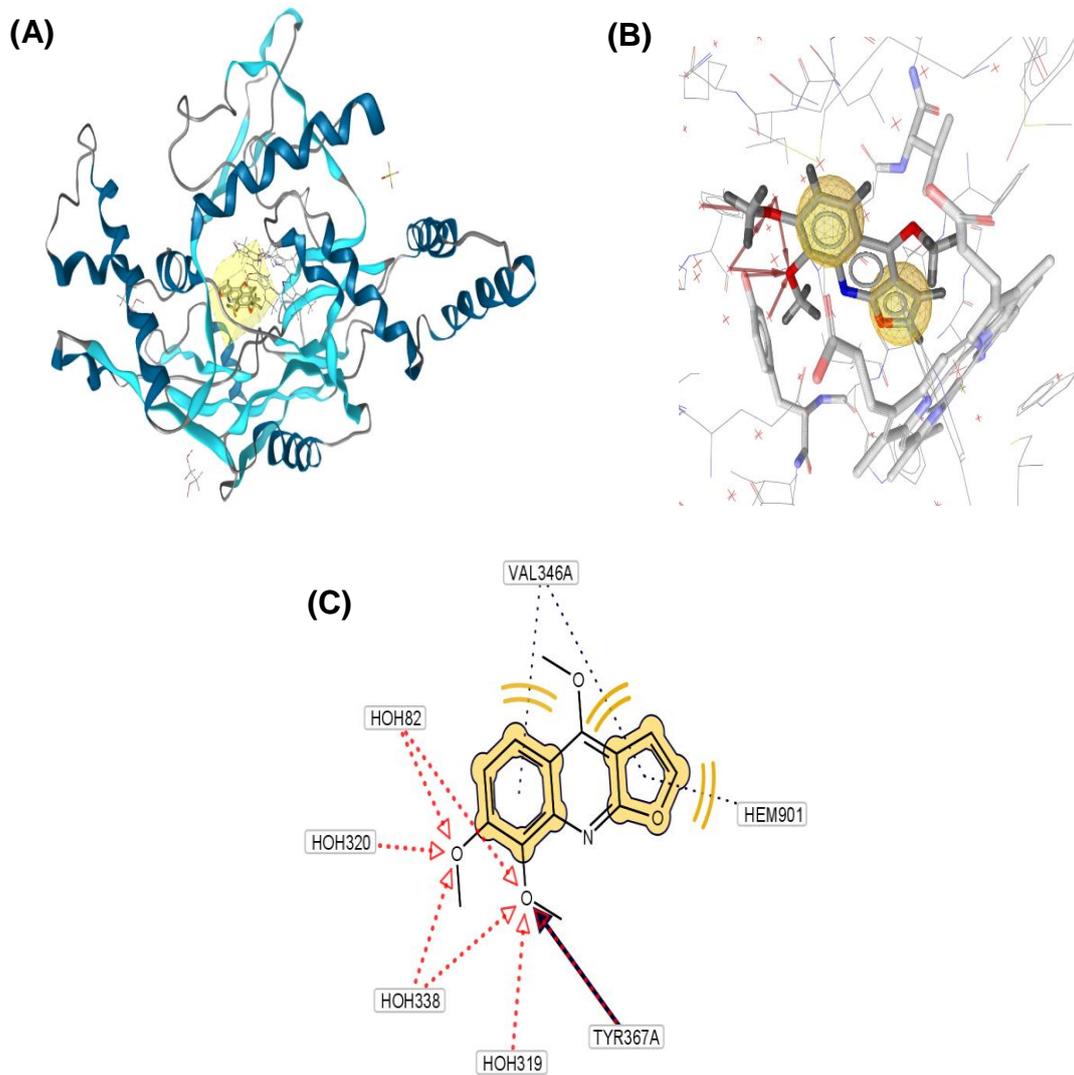
Lmf = fração metanólica das folhas; Rmf = fração metanólica das raízes; Fhf = fração hexânica dos frutos; Skm = esquimianina; CC₅₀ = concentração citotóxica 50%, CI₅₀= concentração inibitória 50%, SI = índice de seletividade determinado por CC50/CI50. Os dados experimentais foram obtidos de três experimentos independentes. Dados em parênteses representam intervalos de confiança (mínimo e máximo) dos valores de IC50, obtidos pela curva de regressão linear.

4.2 ESTUDO MOLECULAR DA ESQUIMIANINA (DOCKING)

O estudo de docking molecular virtual realizado demonstrou uma forte interação entre Skm e a enzima NOS-II (Figura 3A). A interação ocorreu entre grupos farmacofóricos da Skm e resíduos de aminoácidos da seguinte forma: tirosina 367A, através da doação da ligação de hidrogênio ao grupo metoxi de skimmianine; valina 364A através da interação hidrofóbica com os anéis furano e benzeno da Skm e, além de interações de hidrogênios ligados com moléculas de água, a partir do sítio de ligação da NOS2 (Figura 3B, 3C).

A aproximação da esquimianina ao grupo heme da enzima também foi demonstrada, a qual é mantida pela interação hidrofóbica com a cadeia de carbono do grupo heme (Fig. 3B, 3C).

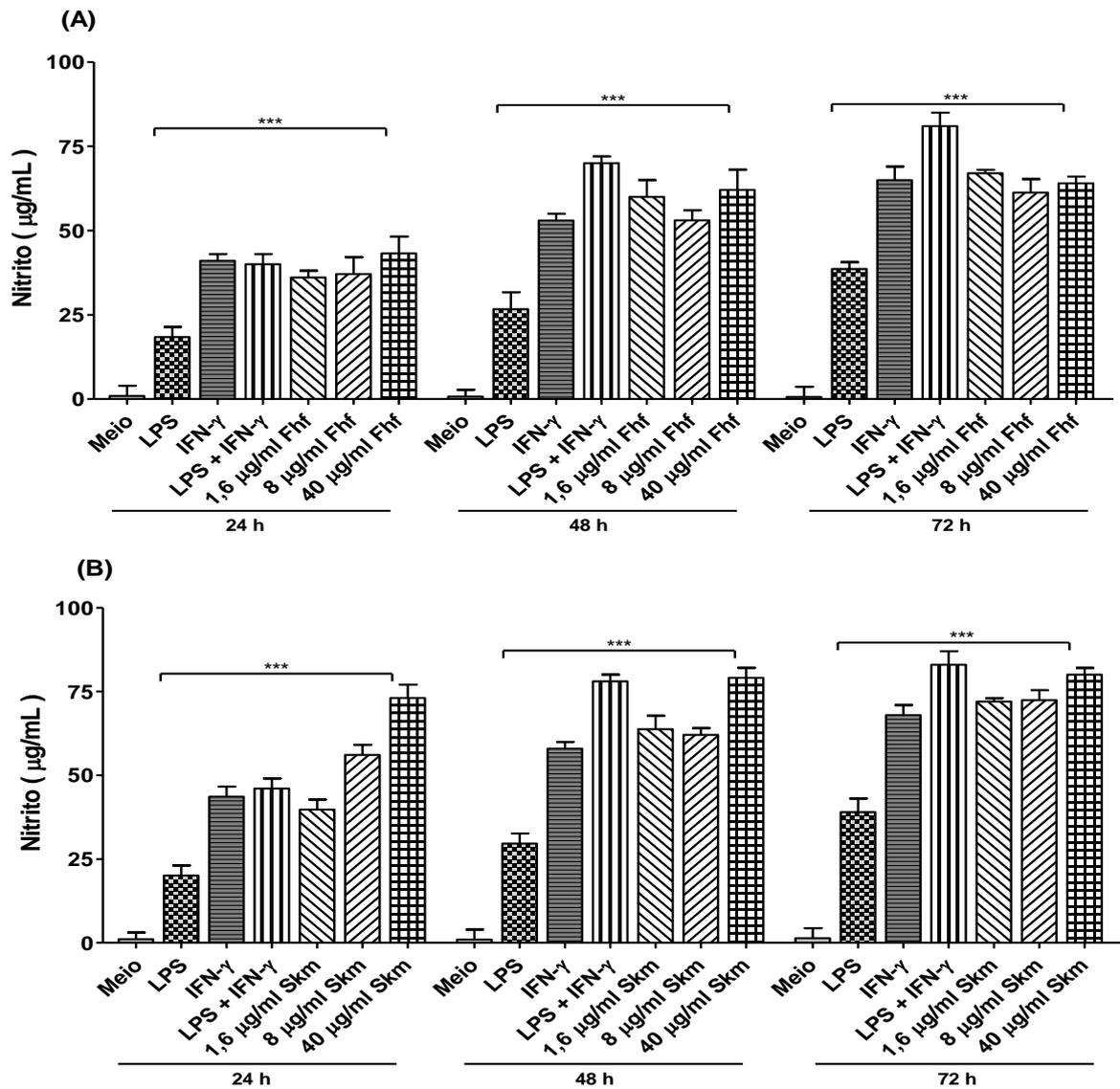
Figura 3. Estudo de docking molecular da Esquimianina e NOS-II.



4.3 EFEITO DA FRAÇÃO HEXÂNICA DO FRUTO DE *SPIRANTHERA ODORATISSIMA* E SEU ALCALÓIDE ESQUIMIANINA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A produção macrofágica de NO estimulada por citocinas inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e LPS têm sido bem documentada em modelos experimentais *in vitro*. A produção de NO é considerada um dos mecanismos de defesa contra a *Leishmania*. No presente trabalho foi avaliada a capacidade da Fhf e Skm em induzir a síntese de óxido nítrico em macrófagos. Neste sentido, foi avaliada a produção de NO por macrófagos murinos da linhagem J774 A.1 em resposta ao tratamento com diferentes concentrações (1,6, 8 ou 40 $\mu\text{g/mL}$) de Fhf e de Skm (Gráfico 1 A e B). A produção do nitrito (NO_2^-) foi mensurada nos sobrenadantes dos macrófagos nos tempos de 24, 48 e 72 horas, na presença ou ausência de LPS (50 ng/mL) e IFN- γ (100 U/mL). Os resultados apresentados no Gráfico. (1A e B) mostram um aumento significativo ($P < 0.001$) na produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com Fhf (A) e Skm (B) em todos os períodos de tempo analisados quando comparados com macrófagos não estimulados. As células estimuladas com LPS e/ou IFN- γ também mostraram um aumento da produção de NO como esperado (Gráfico 1 A e B).

Gráfico 1 - Efeito da fração hexânica do fruto de *Spiranthera odoratissima* e seu alcaloide esquimianina sobre a produção de óxido nítrico (NO).

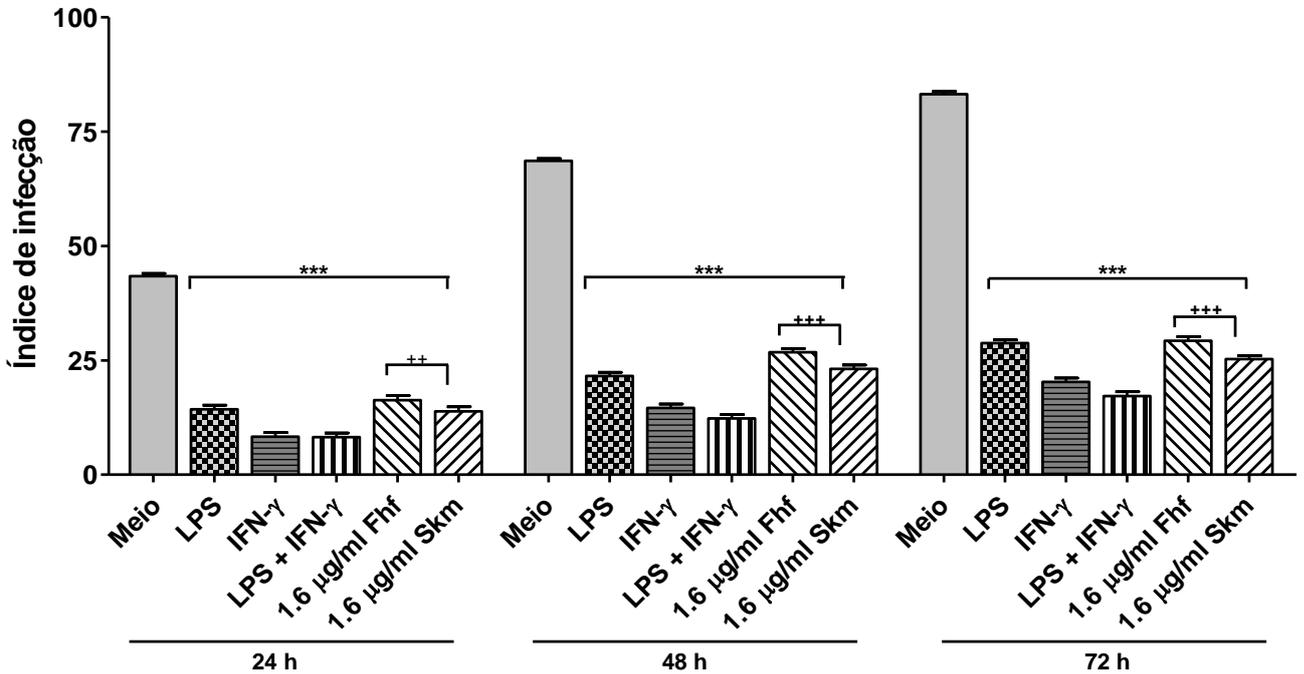


Macrófagos J774 A.1 foram estimulados com Fhf (A) ou Skm (B) nas concentrações 1,6, 8 ou 40 $\mu\text{g/mL}$ e controles estimulados com LPS (50 ng/mL) e/ou IFN- γ (100 U/mL). O grupo controle recebeu apenas meio RPMI 1640. Durante 24, 48 e 72 h os níveis de nitrito foram quantificados nos sobrenadantes das culturas de macrófagos. Cada barra representa a média \pm SD de três experimentos independentes. *** $p < 0.001$ quando comparados ao grupo controle.

4.4 Efeito da fração do fruto hexânico de *Spiranthera odoratissima* e seu alcaloide esquimianina sobre a carga parasitária em macrófagos J774 A.1

Macrófagos murinos da linhagem J774 A.1, foram utilizados para avaliar a atividade antileishmania *in vitro* da FHF e SKM, frente às formas *amastigota* intracelulares de *L. braziliensis* (Gráfico2). Macrófagos infectados e tratados com 1,6µg/ml tanto com Fhf ou Skm apresentaram diminuição significativa ($P < 0.001$) do número de *amastigota* intracelulares nas 24, 48 e 72 h observadas. As culturas de macrófagos tratadas com LPS e/ou IFN- γ tiveram redução da taxa de infecção intracelular superiores quando comparados às culturas de células controle. O alcalóide SKM foi significativamente ($P < 0.001$) mais efetivo em inibir a proliferação do parasita intracelular em relação à Fhf (Graf. 2).

Gráfico 2. Efeito da fração do fruto hexânico (Fhf) de *Spiranthera odoratíssima* e seu alcaloide esquimianina (Skm) sobre a carga parasitária em macrófagos J774 A.1.

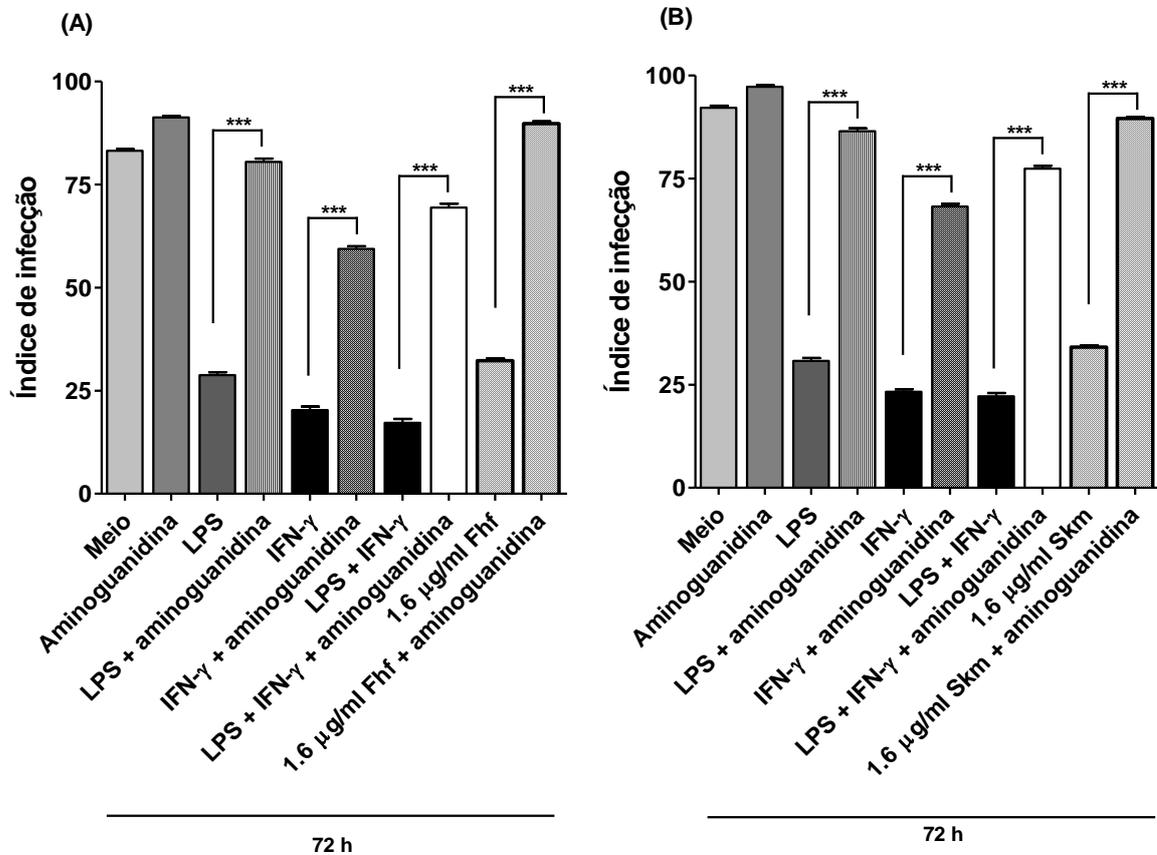


Estas células foram infectadas com *promastigota* de *L. braziliensis* e após 24 h tratadas com Fhf ou Skm (1.6 μg/mL), LPS (50 ng/mL), IFN-γ (100 U/mL), LPS mais IFN-γ. O grupo controle recebeu apenas meio RPMI completo. O índice de infecção (quantidade de *amastigota* nos macrófagos) foi estimado. Cada barra representa a média ± SD de três experimentos independentes. *** p < 0.001 quando comparado com o controle. ** p < 0.01 e +++ p < 0.001 quando comparado com o tratamento Fhf.

4.5 EFEITO DA FRAÇÃO HEXANICA DO FRUTO DE *SPIRANTHERA ODORATISSIMA* E SEU ALCALÓIDE ESQUIMIANINA SOBRE A CARGA PARASITÁRIA DE MACRÓFAGOS NA PRESENÇA DE AMINOGUANIDINA.

A atividade antileishmania contra formas *amastigota* pode ser devido a mecanismos estabelecidos tais como inibição de topoisomerase, interferência no metabolismo do parasita e/ou produção de óxido nítrico por macrófagos. Os resultados apresentados neste estudo indicaram que a morte de formas *amastigota* de *L. braziliensis* em macrófagos J774 A.1 foi dependente da ativação de NOS-II como mostra o Gráfico 3. As células infectadas com *L. braziliensis* tratadas com LPS e IFN- γ (indutores de óxido nítrico) e na presença de aminoguanidina, apresentaram um aumento significativo ($p < 0.001$) no índice de infecção parasitária, quando comparadas às células controle (meio RPMI sem aminoguanidina e meio RPMI com aminoguanidina). O gráfico 3 mostra que à semelhança do que foi observado para LPS e IFN- γ , o efeito anti-amastigota da fração hexânica do fruto e da esquimianina foi abolida na presença do inibidor da iNOS.

Gráfico 3: Efeito da fração hexânica do fruto (Fhf) de *Spiranthera odoratíssima* e seu alcaloide esquimianina (Skm) sobre a carga parasitária de macrófagos na presença de aminoguanidina.



Macrófagos infectados foram tratados com Fhf (A) ou Skm (B) na concentração 1.6 μ g/mL ou na presença de aminoguanidina (2 mM) e posteriormente incubados com meio completo RPMI 1640, LPS (50 ng/mL) e/ou IFN- γ (100 U/mL) na presença ou ausência de aminoguanidina, foram usados como controle. Cada barra representa a média \pm SD de três experimentos independentes. *** p < 0.001 quando comparado com o controle. ++ p < 0.01 e +++ p < 0.001 quando comparado com o tratamento com Skm.

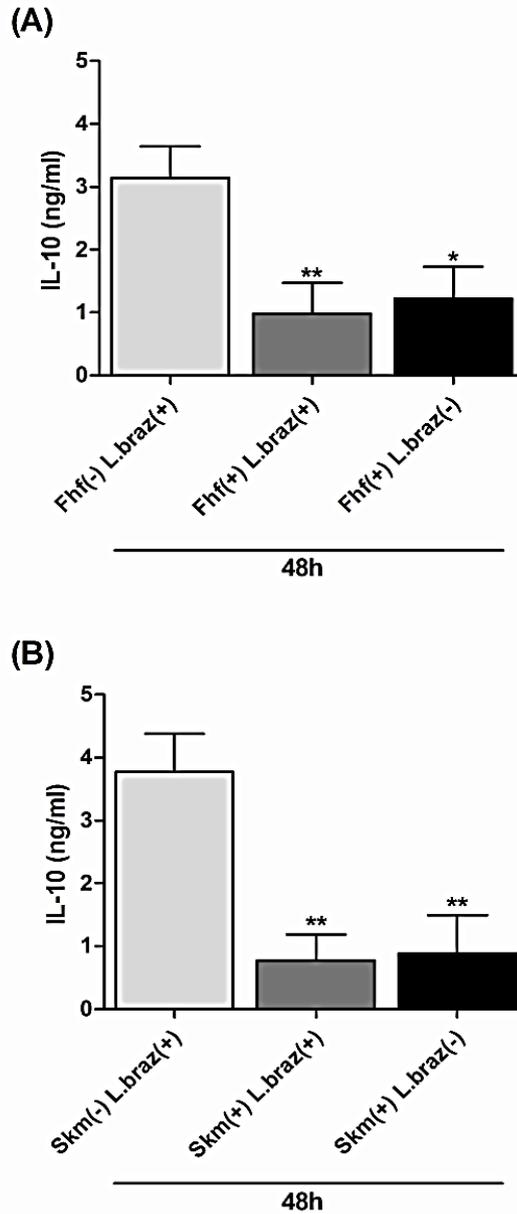
4.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS DE PADRÃO TH1 E TH2 EM CULTURAS DE MACRÓFAGOS J774 A.1 TRATADOS COM FRAÇÃO HEXÂNICA DO FRUTO DE *SPIRANTHERA ODORATISSIMA* E SEU ALCALÓIDE ESQUIMIANINA

A síntese das citocinas IFN- γ , IL-12, e IL-10 foram quantificadas em sobrenadante de cultura de células, neste sentido, foi avaliada a síntese de citocinas de padrão Th1 e Th2 em macrófagos J774 infectados com formas promastigota de *L. braziliensis* e tratados com 1.6 μ g/ml de Fhf e Skm.

4.6.1 Determinação dos níveis de IL-10 em culturas em culturas de macrófagos J774 A.1 tratados com fração hexânica do fruto de *Spiranthera odoratissima* e seu alcaloide esquimianina.

A IL-10 tem sido associada a um aumento intracelular de infecções por *Leishmania*. O gráfico 4 (A e B) apresenta os níveis de IL-10 dos sobrenadantes de macrófagos infectados com *L. braziliensis* na presença dos compostos Fhf e Skm os quais foram capazes de reduzir significativamente ($P < 0.001$) a produção de IL-10, sugerindo que a atividade antileishmania destes compostos está relacionada à modulação da IL-10.

Gráfico 4. Efeito da fração hexânica do fruto (Fhf) de *Spiranthera odoratíssima* e seu alcaloide esquimianina (Skm) na produção de IL-10.



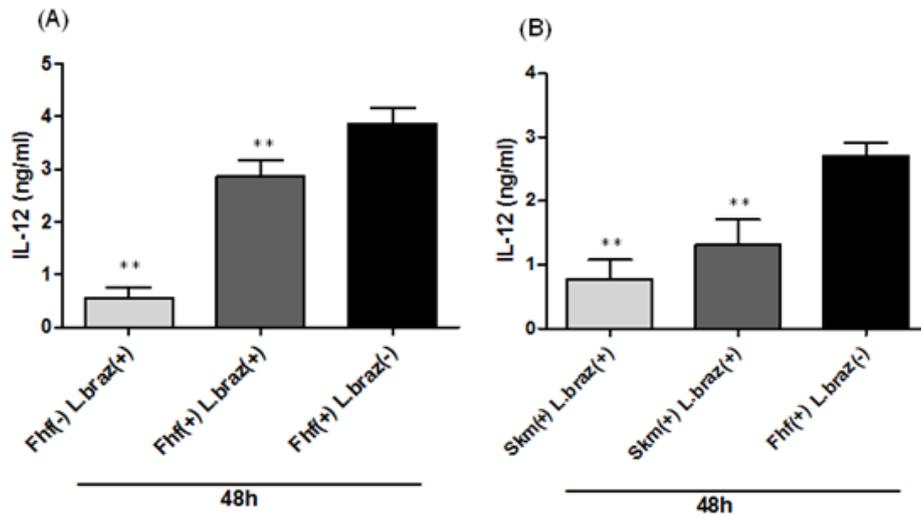
Macrófagos infectados e não infectados foram incubados durante 48 horas com Fhf (A) ou Skm (B) a 1.6 µg/mL. Os controles foram incubados apenas com meio RPMI 1640 completo. Os sobrenadantes foram coletados e IL-10 foi quantificado por ELISA a 405 nm. Os dados foram expressos como média ± SD de três experimentos independentes, em triplicata. ** p<0.01 e *p<0.05 quando comparado ao controle macrófagos infectados.

4.6.2 Determinação dos níveis de IL-12 e IFN- γ em culturas de macrófagos J774

A.1 tratados com fração hexânica do fruto de *Spiranthera odoratissima* e seu alcaloide esquimianina.

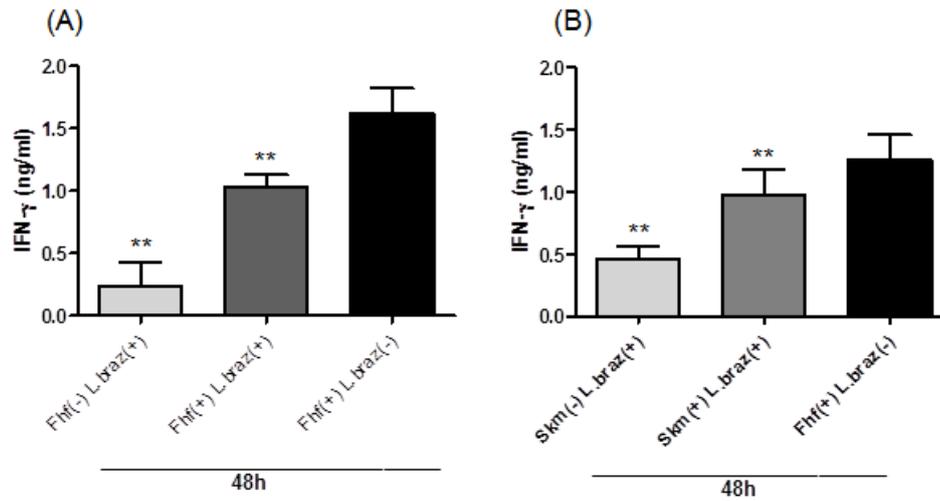
A geração da resposta Th1 depende de uma produção inicial de IL-12 e IFN- γ . A IL-12 não é importante apenas no início da infecção por leishmania, mas a manutenção da produção de IL-12 é decisiva para o controle da doença (Stobie *ET al.*, 2000). No presente estudo foi observado aumento significativo ($P < 0.001$) dos níveis de IL-12 e IFN- γ nos sobrenadantes de macrófagos infectados com *L. braziliensis* na presença dos compostos Fhf e Skm gráfico 5 (A e B) e gráfico 6 (A e B), sugerindo que a atividade antileishmania destes compostos está relacionada à modulação de citocinas de padrão celular.

Gráfico 5 - Efeito da fração do fruto hexânico (Fhf) da *Spiranthera odoratíssima* e do alcaloide esquimianina (Skm) na produção de IL-12.



Macrófagos infectados e não infectados foram incubados por 48 horas com Fhf (A) ou Skm (B) a 1.6 µg/mL. O grupo controle foi incubado apenas com meio RPMI 1640. Os sobrenadantes foram coletados e a IL-12 foi quantificada por ELISA a 405 nm. Os dados foram expressos como média ± SD de três experimentos independentes, em triplicata. ** p<0.01 e *p<0.05 quando comparado ao controle macrófagos infectados.

Gráfico 6 - Efeito da fração do fruto hexânico (Fhf) da *Spiranthera odoratíssima* e do alcaloide esquimianina (Skm) na produção de IFN- γ .

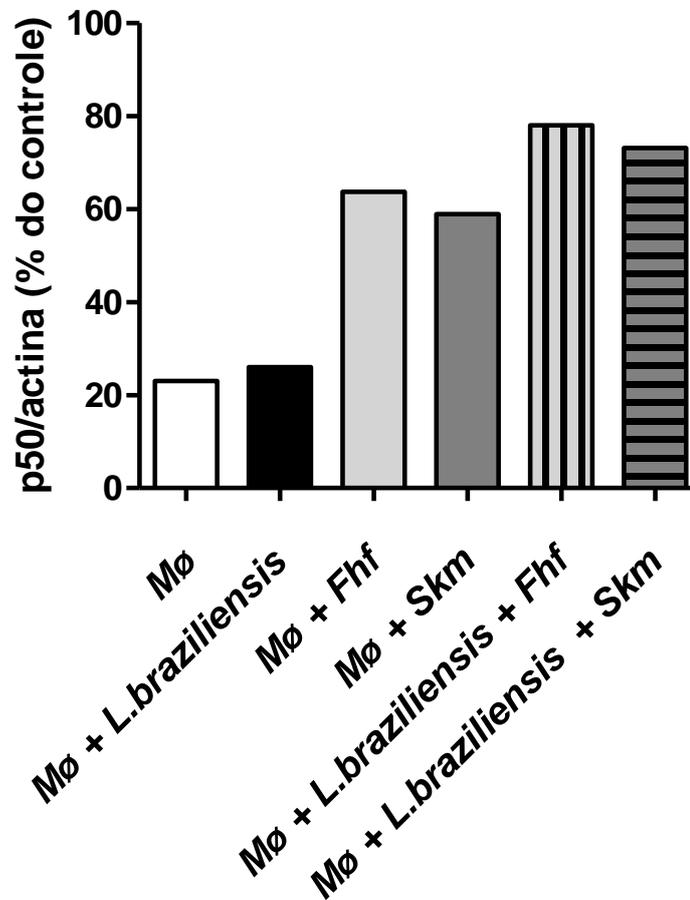


Macrófagos infectados e não infectados foram incubados por 48 horas com Fhf (A) ou Skm (B) a 1.6 $\mu\text{g/mL}$. O grupo controle foi incubado apenas com meio RPMI 1640. Os sobrenadantes foram coletados e o IFN- γ foi quantificado por ELISA a 405 nm. Os dados foram expressos como média \pm SD de três experimentos independentes, em triplicata. ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ quando comparado ao controle macrófagos infectados.

4.7 EFEITO DA FRAÇÃO HEXÂNICA DO FRUTO DE *SPIRANTHERA ODORATISSIMA* E DA ESQUIMIANINA NA EXPRESSÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF-KB E DA VIA P38.

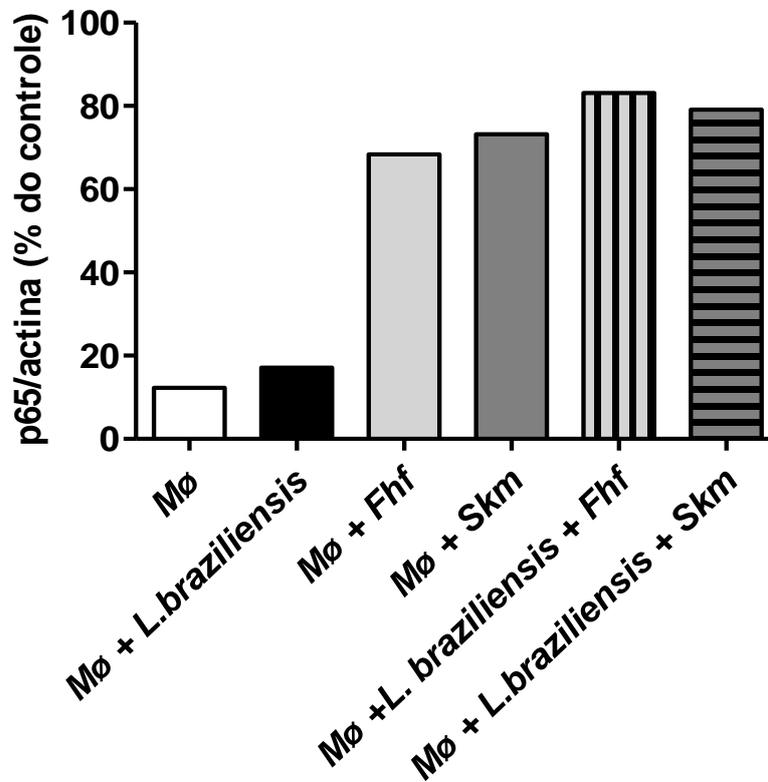
Para determinar se Fhf e Skm afetam a expressão do NF-kB, mais especificamente em suas duas subunidades p50 e p65, e da via p38, macrófagos infectados e não infectados foram incubados por 24 h e os níveis proteicos de p50 e p65 foram avaliados pelo ensaio de Western blot. Os resultados obtidos demonstraram que as expressões de p50 (gráfico 7) e p65 (gráfico 8) foram aumentadas na presença dos compostos Fhf e Skm após 18 horas de tratamento. Nos macrófagos apenas infectados com *L. braziliensis* foram observados baixa expressão de NF-kB. Em células não infectadas o aumento da expressão do NF-kB, também foi determinado. A p38 (Gráfico 9) de forma semelhante seguiu o mesmo padrão de expressão do NF-kB.

Gráfico 7. Efeito da Fhf e Skm sobre a expressão de NF-κB (p50) em macrófagos infectados e não infectados com formas *promastigota* de *L. braziliensis*.



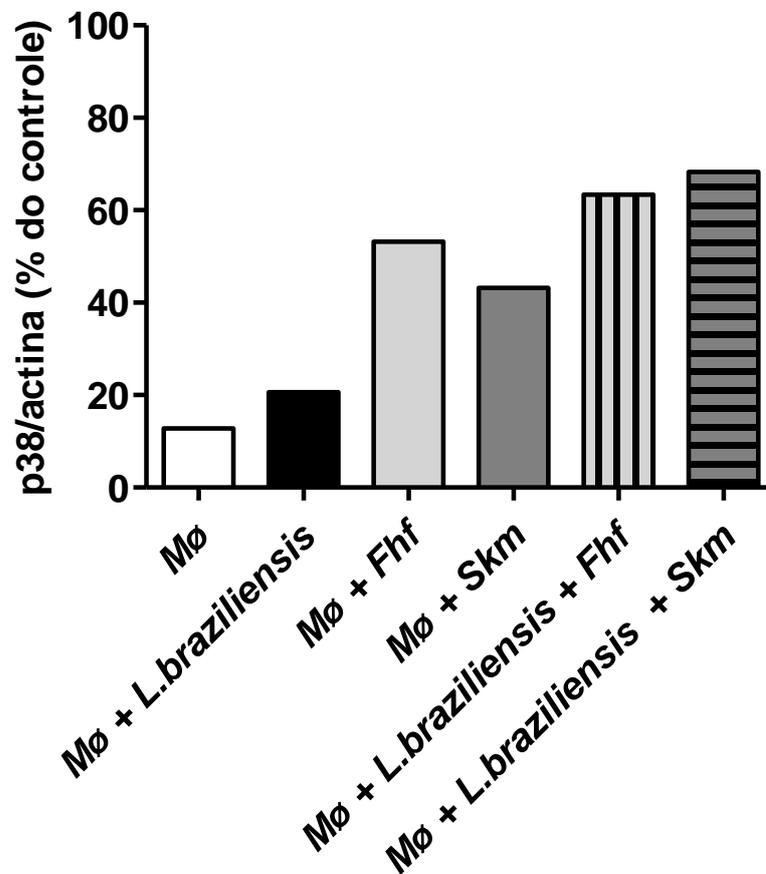
Macrófagos foram infectados com *L. braziliensis* na proporção de 1:5 e tratados por 24 h com Fhf e Skm na concentração de 1.6 µg/mL. Análise por western blot foi realizada utilizando-se anticorpos monoclonais. As intensidades das bandas da p65 foram normalizadas com o conteúdo de β-actina.

Gráfico 8. Efeito da Fhf e Skm sobre a expressão de NF-kB (p65) em macrófagos infectados e não infectados com formas *promastigota* de *L. braziliensis*.



Macrófagos foram infectados com *L. braziliensis* na proporção de 1:5 e tratados por 24 h com Fhf e Skm na concentração de 1.6 µg/mL. Análise por western blot foi realizada utilizando-se anticorpos monoclonais. As intensidades das bandas da p65 foram normalizadas com o conteúdo de β-actina.

Gráfico 9: Efeito da Fhf e Skm sobre a expressão de p38 em macrófagos infectados e não infectados com formas *promastigota* de *L. braziliensis*.

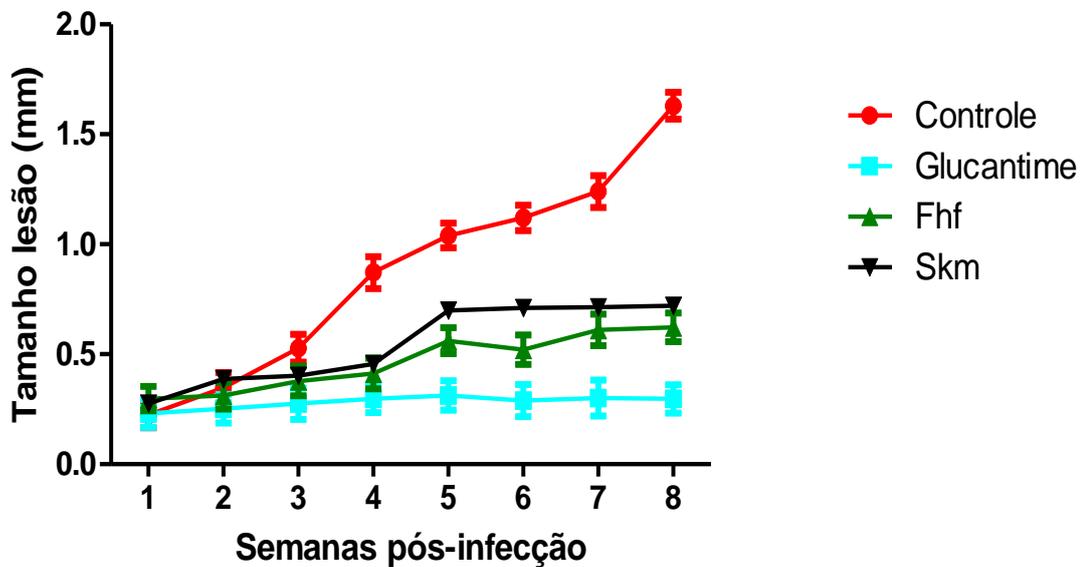


Macrófagos foram infectados com *L. braziliensis* na proporção de 1:5 e tratados por 24 h com Fhf e Skm na concentração de 1.6 µg/mL. Análise por western blot foi realizada utilizando-se anticorpos monoclonais. As intensidades das bandas da p38 foram normalizadas com o conteúdo de β-actina.

4.8 EFEITO DA FRAÇÃO DO FRUTO HEXANICO E ESQUIMIANINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE LESÃO EM CAMUNDONGOS SWISS.

Um dos parâmetros para o estudo *in vivo* dos efeitos de uma vacina ou outro tipo de molécula sobre a infecção com *Leishmania* é a avaliação do desenvolvimento de lesão após inóculo do parasita (FOURNET, A. *et al.*, 1992; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. *et al.*, 1996; WAECHTER, A. I. *et al.*, 1997). Nos camundongos Swiss tratados, via intradérmica, durante 3 dias, com Fhf e Skm na dose de 2 mg/kg e 1,6 µg/kg respectivamente, observou-se redução significativa ($p < 0,05$) do tamanho da lesão quando comparado com os animais tratados com PBS, durante 8 semanas de observação (gráfico 10). Na dose de 2 mg/kg de Fhf, observou-se uma redução média no tamanho da lesão de 57,0%, até a 8^a semana, tendo um efeito mais acentuado nas quinta e sétima semanas, com redução de 65,7% e 66,0 %, respectivamente (gráfico 10). A dose de 1,6 µg/kg de Skm apresentou efeito redutor da lesão em 80,1% na quarta semana pós-infecção, efeito este que se manteve em média de 55,0% entre a quinta e a oitava semana. O glucantime apresentou um efeito redutor que variou entre 88,8% e 90,8% No gráfico 10, estão representados também os resultados dos controles tratados com PBS e glucantime durante as semanas pós-infecção, apresentado respectivamente progressão contínua da lesão em camundongos tratados com PBS e redução significativa do tamanho da lesão. Estes resultados demonstraram que o Fhf e Skm nas doses de 2 mg/kg e 1.6µg/kg respectivamente, tem efeito na redução da lesão embora este não seja tão eficiente quanto o obtido com a droga padrão (glucantime).

Gráfico 10: Efeito da fração do fruto hexânico (Fhf) e esquimianina (Skm) sobre o desenvolvimento de lesão em camundongos Swiss

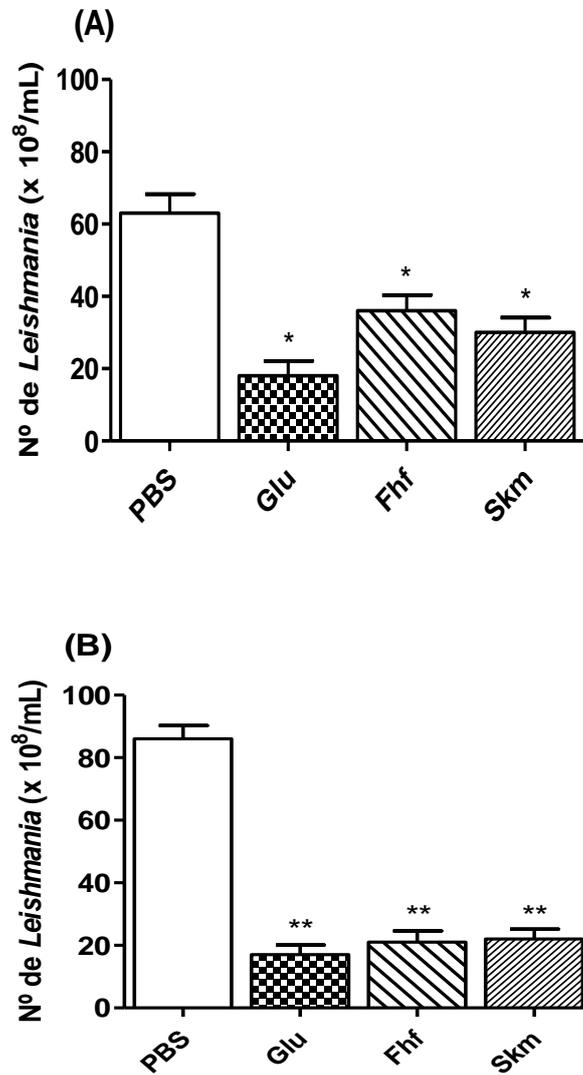


Camundongos *Swiss* foram tratados via intralesional no coxim plantar, durante 3 dias, com PBS, Fhf (2 mg/kg) Skm 1.6µg/kg e glucantime (200 mg/kg) e posteriormente infectados com $4,5 \times 10^8$ /ml de formas promastigota de *L. braziliensis* /ml. As lesões foram mensuradas semanalmente com paquímetro. Este experimento é representativo de 3 realizados (n = 6) *p < 0,05, ** p<0,01 *** p<0,001 quando comparados aos animais tratados com PBS.

4.9 EFEITO DA FRAÇÃO DO FRUTO HEXANICO E ESQUIMIANINA SOBRE A CARGA PARASITÁRIA DE LINFONODO E BAÇO DE CAMUNDONGOS SWISS.

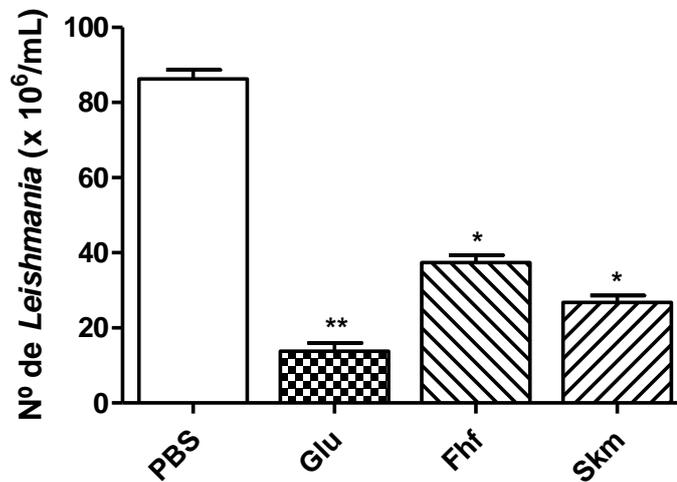
O tamanho da lesão formada com formas infectivas de *Leishmania* pode refletir o número de células infectadas ou a reação inflamatória local (LIMA, H. C. *et al.*, 1997). Para avaliar se a redução do tamanho da lesão induzida pela Fhf e Skm está relacionada à redução do número de parasitas foram realizados ensaios para quantificá-los no linfonodo drenante (linfonodo poplíteo) e no baço (LIMA, H. C. *et al.*, 1997). O número de parasitas no linfonodo poplíteo de camundongos tratados com a dose de 2 mg/kg de Fhf e 1,6 µg/kg de Skm na sexta semana de infecção sofreu uma redução média de 76,0 % no número de parasitas para Fhf e 73% para Skm. O glucantime reduziu em 83,0% a carga parasitária, quando comparados aos camundongos tratados com PBS gráfico 12 (A). Na sexta semana de infecção não foram observados parasitas no baço dos grupos de animais analisados. Resultados similares no linfonodo foram observados na oitava semana de infecção. A dose de 2 mg/kg de Fhf reduziu a carga parasitária em média 79,3% e Skm em média 78%, similar ao glucantime (83,2%), em relação aos camundongos tratados com PBS gráfico 11 (B). Na oitava semana de infecção foram observados parasitas também no baço. Os camundongos tratados com a dose de 2 mg/kg de Fhf e 1,6 µg/kg de Skm apresentaram uma redução de 62,6% e 73,2% respectivamente na carga parasitária no baço em relação ao controle PBS enquanto que os tratados com glucantime apresentaram uma redução de 86,2% (gráfico 12). Portanto os resultados apresentados demonstraram que o Fhf e Skm induziram a redução da carga parasitária nos linfonodos de 6 e 8 semanas, apresentando também diminuição de parasitas no baço na oitava semana pós-infecção.

Gráfico 11. Efeito do Fhf e Skm sobre a carga parasitária no linfonodo poplíteo de camundongos Swiss infectados com *Leishmania braziliensis*.



Camundongos Swiss foram tratados, durante 3 dias, com PBS, Fhf (2mg/kg) Skm e 1.6µg/kg), glucantime (200mg/kg) e posteriormente infectados com 4,5x10⁹/ml de formas promastigota de *Leishmania braziliensis*. Os linfonodos poplíteos foram coletados na sexta (A.) e na oitava semana pós-infecção (B.) e submetidos à análise de diluição limitante. Os resultados expressam o número de formas promastigota de *Leishmania* nos linfonodos *p< 0.05, ** p<0.01*** p<0,001 quando comparados aos animais tratados com PBS.

Gráfico 12. Efeito do Fhf e Skm sobre a carga parasitária do baço de camundongos Swiss infectado com *Leishmania braziliensis*.



Camundongos *Swiss* foram tratados, durante 3 dias, com PBS, Fhf (2mg/kg), Skm 1.6µg/kg e glucantime (200 mg/kg) e posteriormente infectados com $4,5 \times 10^8$ /ml de formas promastigota de *L. braziliensis*. Os baços foram coletados na oitava semana pós-infecção e submetidos à análise de diluição limitante. Os resultados representam o número de formas promastigota de *Leishmania* nos baços *p< 0,05 ** p<0,01 ***p<0,001, quando comparados aos animais tratados com PBS.

DISCUSSÃO

5.0 DISCUSSÃO

O uso empírico de produtos naturais pela população tem levado à pesquisa de princípios ativos de plantas e seus prováveis efeitos na terapia de algumas doenças. Modelos experimentais *in silico*, *in vivo* e *in vitro* têm sido utilizados no estudo de produtos naturais contra as leishmanioses, a fim de que sejam encontradas novas substâncias menos tóxicas que as drogas em uso e que estimulem o sistema imune contra o parasita (BERGMANN, B. R. *et al.*, 1997).

Os antimoniais pentavalentes são drogas de primeira escolha utilizadas no tratamento da leishmaniose. No entanto, o tratamento com estes fármacos causam sérios efeitos colaterais incluindo náusea, diarreia, convulsão e cardiotoxicidade, além disso, o desenvolvimento de resistência em algumas linhagens do parasita é também cada vez mais comum.

A quimioterapia baseada em moléculas naturais bioativas é uma das estratégias que tem sido adotadas na descoberta de novas drogas leishmanicidas (TIUMAN, T. S. *et al.*, 2005). A atividade antileishmania contra formas amastigota e promastigota pode está relacionada a mecanismo bem estabelecidos tais como inibição de topoisomerase, interferência com o metabolismo do parasita e a produção de óxido nítrico por macrófagos (DAS, B. B. *et al.*, 2006).

No presente estudo, o mecanismo de ação da Fhf e Skm foi investigado focando-se na produção de óxido nítrico como o provável mecanismo de ação envolvido na morte de *amastigotas* intracelulares de *L. braziliensis* em células J774 A.1. Fhf e Skm demonstraram atividade principalmente contra *L. braziliensis* com nenhuma toxicidade aparente para os macrófagos quando comparados com outras frações e compostos isolados da mesma planta. Fournet e colaboradores (1993) demonstraram, através de modelo experimental *in vivo*, que a esquimianina apresentou efeito terapêutico semelhante ao antimoniato de meglumina contra *L.*

amazonensis e recentemente, Albernaz *et al.* (2010) demonstraram que a fração hexânica da raiz de *S. odoratissima* também apresentou propriedades leishmanicida contra formas *promastigota* de *L. (L.) chagasi*.

Corroborando com estes achados a espécie *S. odoratissima* demonstrou no presente trabalho significativo efeito inibitório contra formas *promastigota* de *L. braziliensis*, sugerindo poder ser uma ferramenta importante no tratamento da leishmaniose tegumentar. As concentrações inibitórias e citotóxica (IC50 e CC50) e particularmente, o índice de seletividade (>60) da fração hexânica do fruto e do alcaloide esquimianina, obtiveram valores promissores (NDJAKOU LENTA, B. *et al.*, 2007; SINGH, N. *et al.*, 2008) os quais nortearam inicialmente os passos deste estudo.

A maioria dos medicamentos comerciais utilizados no tratamento da leishmaniose são moléculas bioativas, que exercem o seu efeito terapêutico através de interações específicas com biomacromoléculas ou receptores (TIAN, R. *et al.*, 2005). Métodos computacionais modernos, como os ensaios *in silico* têm sido usados para determinar as interações entre as moléculas e receptores de forma qualitativa e quantitativa (LIMA, L. M., 2007).

NOS-II é a enzima responsável pela produção de NO nos macrófagos, também envolvida na morte de parasitas intracelulares nestas mesmas células (BOGDAN, C., 2001). Tanto em termos estruturais quanto funcionais, NOS-II pode ser dividido em dois domínios: um domínio redutase C-terminal e um domínio oxigenase N-terminal. O domínio redutase contém os sítios de ligação para nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato (NADPH) e cofatores de flavina adenina e flavinamonucleótido, os quais transferem elétrons do grupo heme, localizado no domínio oxigenase onde se ligam a tetrahidrobiopterina e o substrato L-arginina (L-arg) (BARRETO, R. D. L. *et al.*, 2005).

Baseados no ensaio *in silico* realizado frente à molécula de Skm e NOS-II sugere-se que o aumento da produção de óxido nítrico por macrófagos na presença do alcaloide esquimianina é provavelmente devido à ligação desta molécula no sítio

catalítico da NOS-I II (domínio oxidase). As interações químicas da Skm com a enzima parecem ativar esta enzima transferindo elétrons disponíveis ao grupo heme presente na NOS-II, este processo favorece a monoxigenação por seu substrato natural enzimático L-arg, resultando no aumento da formação de óxido nítrico.

Alguns compostos derivados de plantas possuem capacidade imunomodulatória na leishmaniose com consistente demonstração da participação da via do NO em seus mecanismos de ação (UKIL, A. *et al.*, 2005; BHATTACHARJEE, S. *et al.*, 2009). Os resultados aqui apresentados corroboram com estas investigações já que Fhf e o alcalóide Skm foram capazes de induzir a produção de NO nos macrófagos tratados com estes compostos, estes resultados também respaldaram a fundamentação teórica do estudo virtual de docking demonstrando uma possível ativação da iNOS pela Skm e a capacidade destes compostos em também induzir a produção de NO nos experimentos *in vitro*.

O aumento do óxido nítrico neste modelo experimental foi correlacionado diretamente com a carga parasitária, confirmando-se que, os resultados obtidos da avaliação do efeito leishmanicida de Fhf e Skm, foi devido ao aumentada produção de NO, com respectiva diminuição do número de parasitas intracelulares.

Para constatar a participação direta do óxido nítrico na morte de parasitas intracelulares modelos utilizando inibidores da NOS-II são constantemente aplicados *in vitro* e *in vivo*. L-NMMA um inibidor competitivo da enzima NOS-II foi utilizado, por exemplo, para confirmar o envolvimento do óxido nítrico na proteção conferida pelo taxol durante a infecção por leishmania. Estas observações descrevem o papel protetor do taxol, mediada pela geração de intermediários reativos de nitrogênio no controle de parasitas intracelulares em macrófagos murinos (DOHERTY, T. M. *et al.*, 1998).

Seguindo o raciocínio descrito acima a participação efetiva do óxido nítrico induzida pelos compostos em teste deste estudo, foi confirmado pela ação da aminoguanidina, um inibidor seletivo da NOS-II quando adicionado em combinação com Fhf e Skm. A aminoguanidina atenuou significativamente a atividade

antileishmania de ambos os compostos, aumentando a carga parasitária macrofágica, evidenciando a dependência da morte de formas *amastigota* intracelulares a um mecanismo cuja participação do óxido nítrico é essencial.

Vários trabalhos também têm relatado a capacidade de produtos naturais na produção de NO em diferentes espécies de *Leishmania*. Do Socorro e cols. demonstraram que a atividade antileishmania do óleo essencial linalol contra *L. amazonensis*, foi mediado pelo aumento da produção de óxido nítrico (DO SOCORRO, S. R. M. S. *et al.*, 2003). Soares e cols. avaliou o látex de *Himatanthus sucuba* (HSL) que exibiu uma potente atividade contra *L. amazonensis*, através do aumento do NO e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) em macrófagos, avaliando a integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial, mostrando-se ainda baixa toxicidade do HSL para os macrófagos hospedeiros (SOARES, D. C. *et al.*, 2010).

Estudos recentes realizados por Saha e cols., com o alcaloide quaternário isoquinolínico berberina, demonstraram uma correlação direta deste metabólito com a participação efetiva da indução da via do óxido nítrico, em macrófagos infectados e não infectados com *Leishmania donovani*, o cloreto de berberina induziu 10 a 17 vezes a expressão do mRNA para NOS-II, correlacionado com a produção de óxido nítrico (SAHA, P. *et al.*, 2011). Resultados semelhantes podem ser observados no estudo realizado por Bhattacharjee e cols., que demonstraram o papel da quassina, um quasinoide, extraído das cascas da árvore *Quassia amarana*, na indução da expressão de NOS-II o qual levou a um aumento significativo da geração do óxido nítrico. Além disso, a quassina também induziu citocinas de padrão Th1 e suprimiu citocinas de tipo Th2 em macrófagos peritoneais provenientes de BALB/c infectados com *L. donovani*. Estas observações sugerem que a quassina medeia a resposta leishmanicida de macrófagos peritoneais murinos, não só através da geração de NO, mas também através da indução da resposta imune Th1 (BHATTACHARJEE, S. *et al.*, 2009). Estes achados também podem ser associados aos resultados encontrados aqui para Fhf e Skm, já que os níveis de citocinas de padrão Th1 foram satisfatoriamente elevados em detrimento dos níveis de IL-10.

Estas observações indicam a sensibilidade a Fhf e Skm nas respostas efetoras de macrófagos J774 A.1 na produção de citocinas e na indução de óxido nítrico, sugerindo que estes produtos naturais podem ser utilizados como um imunomodulador em potencial, podendo ser útil não apenas no tratamento da leishmaniose, mas também para outras doenças cujo desvio para o padrão Th1 seja necessário para cura ou controle. O efeito imunomodulador da Fhf e Skm será mais bem discutido a seguir.

Parte das pesquisas contra leishmaniose está focada na tentativa de identificar novos compostos que modulem a resposta imune para um padrão de citocinas de proteção (NABORS, G. S. *et al.*, 1995; LI, J. *et al.*, 1997; SIEGERS, C. P. *et al.*, 1999)

IL-10, uma potente citocina anti-inflamatória produzida por macrófagos, linfócitos B e T (LAUW, F. N. *et al.*, 2000) é em parte, responsável pela virulência dos parasitas nos macrófagos. Ghalib e *cols.* mostraram que a presença de IL-10 na leishmaniose humana aumentou a manifestação clínica da doença, indicando que a IL-10 parece suprimir a produção de NO pelos macrófagos (GHALIB, H. W. *et al.*, 1993). Achados similares também foram observados em modelo experimental de leishmaniose por Gazzinelli e *cols.*(1992). Esta citocina diminui a expressão das classes de MHC classe I e II interferindo na apresentação antigênica (GRUTZ, G., 2005) e reduz a transcrição e transdução de citocinas pró-inflamatória como TNF α , IL-12 e IL-18 de macrófagos (CONTI, P. *et al.*, 2003).

A redução observada da IL-10 em macrófagos infectados com *L.braziliensis* e tratados com Fhf ou Skm, sugere um efeito imunomodulador da planta. Em contraste com os resultados apresentados com Fhf e Skm, Alexandre-Moreira *et al.*(2003) observaram que a planta *Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae), rica em alcaloides bisbenzilisquinolinicos, inibiu a produção de NO e quantidade elevada induzida de IL-10 por macrófagos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* (ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. *et al.*, 2003). Este efeito induziu um aumento de formas

tripomastigotas liberadas dos macrófagos, confirmando a relação inversa entre estas duas moléculas biogênicas, IL-10 e NO, nas infecções parasitárias.

A IL-12, uma citocina heterodimérica secretada por macrófagos e outras células apresentadoras de antígeno é essencial para o desenvolvimento do padrão Th1, que por sua vez produz IFN- γ e assim ativa macrófagos. A IL-12 não é importante apenas no início da infecção por leishmania, mas a manutenção da produção de IL-12 é decisiva para o controle da doença (STOBIE, L. *et al.*, 2000). O Fhf e Skm induziram a produção de IL-12 de forma significativa, nas 48 horas de tratamento, demonstrando ter a capacidade de induzir a produção de uma citocina característica da resposta celular, este resultado associado à diminuição de IL-10 e ao aumento de óxido nítrico por células J774 A.1 sinaliza uma modulação efetiva contra *L. braziliensis*, colocando-os também como candidatos a novos fármacos contra este parasita.

A capacidade do Fhf e Skm na indução de IFN- γ reforça a hipótese da capacidade destes compostos em modular uma resposta celular efetiva, diretamente correlacionada com a prévia indução de IL-12, induzindo assim a produção de altos níveis de óxido nítrico.

As citocinas produzem seus efeitos celulares pela ativação de vários fatores de transcrição como o AP-1, o NF-kB e o STAT, os quais ativam ou reprimem genes alvo. Estes fatores podem também intensificar a expressão de citocinas, visto que as regiões promotoras de muitas destas e seus genes revelam numerosos sítios reguladores para estes fatores de transcrição. As citocinas não atuam sozinhas, sendo produzidas e liberadas em rede bem coordenada; portanto os níveis relativos destes fatores de transcrição podem ser responsáveis pela ação inflamatória prolongada das citocinas e seus ativadores.

Diferentes vias de sinalização que desencadeiam a ativação do NF-kB podem afetar de forma diferente o desenvolvimento de doenças. A ativação do NF-kB está correlacionada com a prevenção de apoptose durante a infecção com *Rickettsia rickettsii* (SPORN, L. A. *et al.*, 1997), e a regulação positiva do mRNA foi demonstrada

em cultura de fibroblastos infectados com citomegalovírus (YUROCHKO, A. D. *et al.*, 1997). O aumento da expressão do NF- κ B em tumores está correlacionado com a resistência a fármacos antitumorais. Esta via é induzida através da fosforilação de seu inibidor I κ Ba (SACCANI, S. *et al.*, 2002) que rapidamente transloca-se para o núcleo e ativa a transcrição de múltiplos genes κ B dependente, incluindo NOS-II e citocinas Th1 (SACKS, D. L., 1989) de participação efetiva contra parasitas intracelulares, portanto, na leishmaniose o aumento da atividade de NF- κ B induz um efeito letal sobre estes parasitas (UKIL, A. *et al.*, 2005).

No presente trabalho, a atividade leishmanicida de Fhf e Skm foi correlacionada com o aumento da expressão do NF- κ B nos macrófagos infectados, levando a um aumento da produção da NOS-II, demonstrado indiretamente pelo aumento de nitrito *in vitro* em células J774 A.1. Estes tratamentos resultaram em um aumento da expressão NF- κ B durante as primeiras 18 h de tratamento. Fhf e Skm demonstraram induzir NF- κ B p50/p65 em macrófagos infectados e não infectados com *L. braziliensis*, levando a uma diminuição significativa de parasitas intracelulares, associado à produção NOS-II/NO.

Estes resultados corroboram com os achados de Ozer *et al.*, que demonstraram que o extrato de *Nuphar lutea*, também apresentou atividade leishmanicida mediada através da ativação de NF- κ B e aumentou a expressão de iNOS, além disso, a inibição de óxido nítrico, associada à NG-monometil-L-arginina, reverteu totalmente o efeito leishmanicida do extrato desta espécie, semelhantes aos resultados observados com o Fhf e Skm, já discutidos neste trabalho (OZER, L. *et al.*, 2010).

A expressão induzida por Fhf e Skm ativou comprovadamente NF- κ B, porém macrófagos infectados por parasitas do gênero *Leishmania* tem sido associada com a capacidade de interferir com a cascata de sinalização da via MAPK up stream NF κ b, a qual consiste em três subtipos denominados ERK, JNK e p38 MAPK.

Para manter a infecção causada por *Leishmania*, fatores críticos são induzidos pela IL-10, cuja liberação é dependente de proteínas quinase ativadas

MAPKs (BUCHMULLER-ROUILLER, Y. e MAUEL, J., 1987). Fatores inerentes ao parasita tais como LPG podem interferir e subverter a função de macrófagos pela ativação da quinase extracelular (ERK 1 / 2), eleva ao aumento dos níveis de IL-10, juntamente com a inibição da IL-12, inibição esta dependente da regulação negativa da p38 MAPK, favorecendo a sobrevivência do parasita (JUNGHAE, M. e RAYNES, J. G., 2002). Portanto, tanto a ERK como a p38 MAP quinases regulam diferencialmente a indução de moléculas efetoras em macrófagos ditam o curso da infecção, tornando-as alvos potenciais para o desenvolvimento de novas estratégias para combater a leishmaniose.

Na leishmaniose o modelo de sinalização CD40-CD40L foi proposto para regular a secreção das citocinas IL-12 e IL-10 através da MAPK p38 e via ERK, a sinalização CD40 para ERK1 / 2 induz IL-10; por sua vez, a IL-10 aumentada impede a ativação induzida pelo próprio CD40 via p38MAPK, traduzindo-se numa redução de IL-12 (SEGER, R. e KREBS, E. G., 1995). Portanto, como a atividade antileishmania de Fhf e Skm foi acompanhada de uma diminuição da IL-10 e aumento da IL-12, pode-se extrapolar que estes compostos podem ter a capacidade de regular a p38MAPK (aumentando assim a IL-12), e inibir a regulação da ERK e, assim, diminuir os níveis de IL-10.

A evolução do tamanho da lesão durante as semanas de infecção é o resultado de uma combinação de fatores tais como o aumento do número de parasitas ou um aumento da resposta inflamatória do hospedeiro. Portanto, o tamanho da lesão não é necessariamente um dado indicativo da intensidade da infecção (carga parasitária local), pois lesões podem estar presentes quando não existem parasitas no local, e parasitas podem estar presentes na ausência de lesões. É relatado que meses após a lesão cutânea cicatrizar em camundongos resistentes infectados com *L. major*, o parasita ainda está presente no local da lesão e no tecido linfático drenante (LIMA, H. C. *et al.*, 1997).

No nosso trabalho, a análise do número de parasitas nos linfonodos drenantes demonstrou que a redução no tamanho da lesão está correlacionada à

redução concomitante da carga parasitária nestes órgãos linfoides, sendo esta similar ao obtido com o glucantime. Estes resultados sugerem um possível efeito imunomodulador da Fhf e Skm também *in vivo* no início da infecção, inclusive reduzindo a metástase das *Leishmanias* do linfonodo para o baço.

A evolução da infecção por *Leishmania* em hospedeiro susceptível pode estar correlacionado ao fato de que macrófagos imaturos são deficientes na capacidade de matar parasitas intracelulares, pois, são inativos ou pouco ativos na presença de citocinas. Por outro lado, macrófagos maduros tornam-se ativos quando estimulados por IFN- γ , TNF- α e LPS, os quais induzem a expressão da enzima NOS-II levando à produção de óxido nítrico por macrófagos (BEIL, W. J. *et al.*, 1992; LIEW, F. Y. e O'DONNELL, C. A., 1993). A atividade do óxido nítrico contra parasitas intracelulares foi comprovada em camundongos deficientes da NOS-II, os quais não foram capazes de controlar a infecção causada por *L. major* (LIEW, F. Y. e O'DONNELL, C. A., 1993).

A resistência à infecção por *Leishmania* pode ser induzida em camundongos geneticamente susceptíveis através de vários tratamentos; na maioria dos casos, entretanto, tais manipulações são apenas efetivas se realizadas antes da infecção, ou durante a primeira semana, provavelmente devido ao estímulo diferencial de células de padrão Th0 ocorrer nos primeiros dias depois do inóculo do parasita. Estas considerações enfatizam a importância da fase inicial da infecção (MOLL, H., 1993).

Dependendo do tipo de modelo utilizado (*in vivo* ou *in vitro*) as substâncias estudadas podem apresentar diferentes efeitos quanto ao seu mecanismo de ação. Apesar das vantagens de um modelo *in vitro*, tais como quantificar de forma precisa a concentração efetiva da droga, este modelo não leva em consideração fatores importantes, observados *in vivo*, tais como a absorção, o metabolismo e a farmacocinética das drogas (CROFT, S. L., 1986).

No presente trabalho quando o Fhf e Skm foram administrados *in vivo*, o resultado obtido indicou que provavelmente o extrato ativou células, cuja participação é essencial na resposta efetiva contra a *Leishmania*. Dentre estas

encontramos as células de Langerhans, presentes na epiderme, cuja função como apresentadora antigênica depende de seu estado de ativação. Estas células migram para os linfonodos drenantes, onde interagindo com os linfócitos T podem induzir mecanismos de morte intracelular mediados pelo óxido nítrico (TAPIA, F. J. *et al.*, 1994).

A grande maioria dos extratos de plantas que têm sido estudados contra a leishmaniose demonstrou efeito quando administrada em camundongos até a segunda semana de infecção, sugerindo que podem interferir no padrão de resposta imune Th2 já estabelecido (DA SILVA, S. A. *et al.*, 1995).

A importância do tipo de extrato utilizado e da via de administração é observada em relação à *Kalanchoe pinnata* cuja fração aquosa protege camundongos contra a infecção progressiva por *Leishmania amazonensis*, sendo o efeito melhor observado quando o extrato é administrado por via oral (DA SILVA, S. A. *et al.*, 1995).

Nossos dados confirmam que o sucesso para o tratamento na leishmaniose não exige apenas uma redução da carga parasitária, mas também o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva mediada por células.

Em conclusão, este estudo demonstrou que o efeito antileishmania de Fhf e Skm obtidos de *Spiranthera odoratíssima* ocorreu via participação efetiva e dependente do óxido nítrico. Os dados *in silico* sugeriram a interação física com NOS-II, provavelmente ativando esta enzima. Os ensaios *in vitro* demonstraram a capacidade tanto da Skm quanto da Fhf em ativar as principais vias de indução da resposta Th1, p38 e NF-kB, induzindo a produção de IL-12 e óxido nítrico respectivamente.

CONCLUSÕES

6.0 CONCLUSÕES

- A fração hexânica do fruto de *Spiranthera odoratíssima* e seu alcaloide esquimianina apresentaram efeito antileishmania sobre forma *promastigota* de *Leishmania braziliensis*.
- A fração hexânica do fruto de *Spiranthera odoratíssima* e seu alcaloide esquimianina apresentaram efeito anti-amastigota, reduzindo o índice de infecção em macrófagos infectados com *L. braziliensis*.
- A morte das formas *amastigota* intracelulares de *L. braziliensis* ocorreu através da indução da produção do NO pela fração hexânica do fruto e esquimianina.
- A fração do fruto hexânico (Fhf) e a esquimianina (Skm) estimulam a produção de citocinas de padrão Th1 como IL-12 e IFN- γ .
- A fração do fruto hexânico (Fhf) e a esquimianina (Skm) inibem a produção de citocinas de padrão Th2 como IL-10.
- As vias sinalizadoras na produção de óxido nítrico (NF- κ B) e de citocinas de padrão Th1 (p38) são ativadas quando células J774 A.1 são tratadas com a fração do fruto hexânico (Fhf) e esquimianina (Skm).
- A fração hexânica do fruto (Fhf) e esquimianina (Skm) reduzem o tamanho da lesão na infecção por *Leishmania braziliensis* em camundongos Swiss, além de diminuir a carga parasitária em linfonodos e baço.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, L.; BORGES, V. M.; CRUZ, H. *et al.* Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 2, p. 389-96, Aug 2008.

AKOPYANTS, N. S.; KIMBLIN, N.; SECUNDINO, N. *et al.* Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. **Science**, v. 324, n. 5924, p. 265-8, Apr 10 2009.

AL-NASIRY, S.; GEUSENS, N.; HANSSENS, M. *et al.* The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1304-9, May 2007.

ALBERNAZ, L. C.; DE PAULA, J. E.; ROMERO, G. A. *et al.* Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 116-21, Aug 19 2010.

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology letters**, v. 99, n. 1, p. 17-23, Jun 15 2005.

ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; TRINDADE, M. N. *et al.* *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) leaf extract induces interleukin-10-dependent inhibition of *Trypanosoma cruzi* killing by macrophages. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]**, v. 36, n. 2, p. 199-205, Feb 2003.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P. Uso de plantas e animais medicinais no Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): Um estudo de caso. **Interciência**, v. 27, p. 8, 2002.

ANDRADE, B. B.; DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I. *et al.* Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scandinavian journal of immunology**, v. 66, n. 2-3, p. 122-7, Aug-Sep 2007.

ASSREUY, J.; CUNHA, F. Q.; LIEW, F. Y. *et al.* Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. **British journal of pharmacology**, v. 108, n. 3, p. 833-7, Mar 1993.

BADARO, R.; JONES, T. C.; LORENCO, R. *et al.* A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 154, n. 4, p. 639-49, Oct 1986.

BAEUERLE, P. A.; BALTIMORE, D. NF-kappa B: ten years after. **Cell**, v. 87, n. 1, p. 13-20, Oct 4 1996.

BALANA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRIA, J. C. *et al.* The pharmacology of leishmaniasis. **General pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 435-43, Apr 1998.

BALDWIN, A. S., JR. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annual review of immunology**, v. 14, p. 649-83, 1996.

BANGS, J. D.; RANSOM, D. A.; NIMICK, M. *et al.* In vitro cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 114, n. 1, p. 111-7, Apr 25 2001.

BARATA, L. E.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H. *et al.* Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 589-95, Nov 2000.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C. E. *et al.* Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, v. 257, n. 5069, p. 545-8, Jul 24 1992.

BARRAL, A.; TEIXEIRA, M.; REIS, P. *et al.* Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. **The American journal of pathology**, v. 147, n. 4, p. 947-54, Oct 1995.

BARRETO, R. D. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, p. 1046-1054, 2005.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-106, Aug 2007.

BEIL, W. J.; MEINARDUS-HAGER, G.; NEUGEBAUER, D. C. *et al.* Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **Journal of leukocyte biology**, v. 52, n. 2, p. 135-42, Aug 1992.

BERGMANN, B. R.; COSTA, S. S.; MORAES, V. L. G. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. **Brazilian Journal Association for the Advancement of Science**, n. 49 p. 7, 1997.

BERMAN, J. D.; FLECKENSTEIN, L. Pharmacokinetic justification of antiprotozoal therapy. A US perspective. **Clinical pharmacokinetics**, v. 21, n. 6, p. 479-93, Dec 1991.

BERMAN, J. D.; WYLER, D. J. An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 142, n. 1, p. 83-6, Jul 1980.

BHATTACHARJEE, S.; GUPTA, G.; BHATTACHARYA, P. *et al.* Quassin alters the immunological patterns of murine macrophages through generation of nitric oxide to exert antileishmanial activity. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 317-24, Feb 2009.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-16, Oct 2001.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitology today**, v. 15, n. 1, p. 22-8, Jan 1999.

BOGDAN, C.; THURING, H.; DLASKA, M. *et al.* Mechanism of suppression of macrophage nitric oxide release by IL-13: influence of the macrophage population. **Journal of immunology**, v. 159, n. 9, p. 4506-13, Nov 1 1997.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; PAIK, J. *et al.* Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 55, n. 2, p. 227-33, Feb 1994.

BONIFACE, K.; BERNARD, F. X.; GARCIA, M. *et al.* IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. **Journal of immunology**, v. 174, n. 6, p. 3695-702, Mar 15 2005.

BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. Apoptotic cell recognition: will the real phosphatidylserine receptor(s) please stand up? **Current biology : CB**, v. 18, n. 2, p. R76-9, Jan 22 2008.

BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. **International immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1457-67, Aug 2001.

BUCHMULLER-ROUILLER, Y.; MAUEL, J. Impairment of the oxidative metabolism of mouse peritoneal macrophages by intracellular *Leishmania* spp. **Infection and immunity**, v. 55, n. 3, p. 587-93, Mar 1987.

CONTI, P.; KEMPURAJ, D.; KANDERE, K. *et al.* IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. **Immunology letters**, v. 86, n. 2, p. 123-9, Apr 3 2003.

CROFT, S. L. In vitro screens in the experimental chemotherapy of leishmaniasis and trypanosomiasis. **Parasitology today**, v. 2, n. 3, p. 64-9, Mar 1986.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. **Experimental and molecular pathology**, v. 72, n. 2, p. 132-41, Apr 2002.

D'ANDREA, A.; RENGARAJU, M.; VALIANTE, N. M. *et al.* Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 176, n. 5, p. 1387-98, Nov 1 1992.

DA SILVA, S. A.; COSTA, S. S.; MENDONÇA, S. C. *et al.* Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 60, n. 3, p. 201-10, Dec 1995.

DAMATTA, R. A.; SEABRA, S. H.; DEOLINDO, P. *et al.* *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. **FEMS microbiology letters**, v. 266, n. 1, p. 29-33, Jan 2007.

DAS, B. B.; SEN, N.; DASGUPTA, S. B. *et al.* Topoisomerase research of kinetoplastid parasite *Leishmania*, with special reference to development of

therapeutics. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 221-32, Mar 2006.

DE SOUZA CARMO, E. V.; KATZ, S.; BARBIERI, C. L. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. **PloS one**, v. 5, n. 11, p. e13815, 2010.

DEL RAYO CAMACHO, M.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, S. L. *et al.* Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 2, p. 203-10, Jan 2001.

DEMICHELI, C.; DE FIGUEIREDO, T. L.; CARVALHO, S. *et al.* Physico-chemical characterization of meglumine antimoniate. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 12, n. 1, p. 63-6, Mar 1999.

DIAZ, N. L.; ARVELAEZ, F. A.; ZERPA, O. *et al.* Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Clinical and experimental dermatology**, v. 31, n. 1, p. 114-7, Jan 2006.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of immunology**, v. 141, n. 7, p. 2407-12, Oct 1 1988.

DO SOCORRO, S. R. M. S.; MENDONCA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R. *et al.* Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 1895-901, Jun 2003.

DOBSON, D. E.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P. *et al.* *Leishmania major* survival in selective *Phlebotomus papatasi* sand fly vector requires a specific SCG-encoded lipophosphoglycan galactosylation pattern. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 11, p. e1001185, 2010.

DOHERTY, T. M.; SHER, A.; VOGEL, S. N. Paclitaxel (Taxol)-induced killing of *Leishmania major* in murine macrophages. **Infection and immunity**, v. 66, n. 9, p. 4553-6, Sep 1998.

DOREA, J. G.; COSTA, J. M.; HOLZBECHER, J. *et al.* Antimony accumulation in hair during treatment of leishmaniasis. **Clinical chemistry**, v. 33, n. 11, p. 2081-2, Nov 1987.

DOUA, F.; MIEZAN, T. W.; SANON SINGARO, J. R. *et al.* The efficacy of pentamidine in the treatment of early-late stage *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 55, n. 6, p. 586-8, Dec 1996.

ESCALONA-MONTANO, A. R.; PARDAVE-ALEJANDRE, D.; CERVANTES-SARABIA, R. *et al.* *Leishmania mexicana* promastigotes secrete a protein tyrosine phosphatase. **Parasitology research**, v. 107, n. 2, p. 309-15, Jul 2010.

EVANS, T.; CARPENTER, A.; KINDERMAN, H. *et al.* Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. **Circulatory shock**, v. 41, n. 2, p. 77-81, Oct 1993.

FISCHER, C.; VOSS, A.; ENGEL, J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. **Medical microbiology and immunology**, v. 190, n. 1-2, p. 85-7, Nov 2001.

FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUNOZ, V. *et al.* Effect of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. **Tropical medicine and parasitology : official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit**, v. 43, n. 4, p. 219-22, Dec 1992.

FREITAS, C. M. J.; LUCHESE, A. M.; SILVA, F. S. *et al.* **Coumarins, furoquinoline alkaloids and terpenes from *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae)**. Kidlington, ROYAUME-UNI: Elsevier, 2003. 3

FROELICH, S.; ONEGI, B.; KAKOOKO, A. *et al.* Plants traditionally used against malaria: phytochemical and pharmacological investigation of *Momordica foetida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 1-17, 2007.

GANTT, K. R.; GOLDMAN, T. L.; MCCORMICK, M. L. *et al.* Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Journal of immunology**, v. 167, n. 2, p. 893-901, Jul 15 2001.

GARCIN, E. D.; ARVAI, A. S.; ROSENFELD, R. J. *et al.* Anchored plasticity opens doors for selective inhibitor design in nitric oxide synthase. **Nature chemical biology**, v. 4, n. 11, p. 700-7, Nov 2008.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; JAMES, S. L. *et al.* IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. **Journal of immunology**, v. 148, n. 6, p. 1792-6, Mar 15 1992.

GHALIB, H. W.; PIUVEZAM, M. R.; SKEIKY, Y. A. *et al.* Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 1, p. 324-9, Jul 1993.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF- κ B and rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. **Annual review of immunology**, v. 16, p. 35, 1998.

GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P. T. *et al.* Resistance of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC infectious diseases**, v. 7, p. 7, 2007.

GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, M. C. W. *et al.* O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 22, p. 26-30, 2000.

GOMEZ, M. A.; CONTRERAS, I.; HALLE, M. *et al.* *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. **Science signaling**, v. 2, n. 90, p. ra58, 2009.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-8, Oct 1982.

GRISCAVAGE, J. M.; WILK, S.; IGNARRO, L. J. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF- κ B. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 8, p. 3308-12, Apr 16 1996.

GRUTZ, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. **Journal of leukocyte biology**, v. 77, n. 1, p. 3-15, Jan 2005.

HANDMAN, E. Cell biology of Leishmania. **Advances in parasitology**, v. 44, p. 1-39, 1999.

HIBBS, J. B., JR.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. *et al.* Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 157, n. 1, p. 87-94, Nov 30 1988.

IWAKURA, Y.; ISHIGAME, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 5, p. 1218-22, May 2006.

JUNGHAE, M.; RAYNES, J. G. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates Leishmania donovani infection in macrophages. **Infection and immunity**, v. 70, n. 9, p. 5026-35, Sep 2002.

KAM, T. S.; SIM, K. M.; KOYANO, T. *et al.* Cytotoxic and leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. **Journal of natural products**, v. 61, n. 11, p. 1332-6, Nov 1998.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **Journal of immunology**, v. 166, n. 2, p. 1141-7, Jan 15 2001.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-15, Aug 2011.

KAYE, P. M.; BLACKWELL, J. M. Postgenomic research on leishmaniasis: a critical self-appraisal. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 9, p. 401-5, Sep 2008.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; LAATSCH, H. *et al.* In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta tropica**, v. 77, n. 3, p. 307-14, Dec 1 2000.

KIM, H. M.; KIM, M. J.; LI, E. *et al.* The nitric oxide-producing properties of *Solanum lyratum*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 67, n. 2, p. 163-9, Nov 1 1999.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M. *et al.* IL-17 and Th17 Cells. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 485-517, 2009.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 421-4, Jul-Sep 1987.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210-4, May 2003.

LAUNOIS, P.; OHTEKI, T.; SWIHART, K. *et al.* In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4+ T cells which are NK1.1. **European journal of immunology**, v. 25, n. 12, p. 3298-307, Dec 1995.

LAUNOIS, P.; TACCHINI-COTTIER, F.; PARRA-LOPEZ, C. *et al.* Cytokines in parasitic diseases: the example of cutaneous leishmaniasis. **International reviews of immunology**, v. 17, n. 1-4, p. 157-80, 1998.

LAUW, F. N.; PAJKRT, D.; HACK, C. E. *et al.* Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. **Journal of immunology**, v. 165, n. 5, p. 2783-9, Sep 1 2000.

LI, J.; SUTTERWALA, S.; FARRELL, J. P. Successful therapy of chronic, nonhealing murine cutaneous leishmaniasis with sodium stibogluconate and gamma interferon depends on continued interleukin-12 production. **Infection and immunity**, v. 65, n. 8, p. 3225-30, Aug 1997.

LIANG, S. C.; TAN, X. Y.; LUXENBERG, D. P. *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 10, p. 2271-9, Oct 2 2006.

LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. **Advances in parasitology**, v. 32, p. 161-259, 1993.

LIMA, H. C.; BLEYENBERG, J. A.; TITUS, R. G. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. **Parasitology today**, v. 13, n. 2, p. 80-2, Feb 1997.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, p. 1456-1468, 2007.

LIMONGI, J. P. In: (Ed.). **Farmacodinâmica**. São Paulo: Livraria Editora Artes Médicas, 1973. cap. 61,

LOISEAU, P. M.; BORIES, C. Recent strategies for the chemotherapy of visceral leishmaniasis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 12, n. 6, p. 559-64, Dec 1999.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHONIAN, G. *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 22, p. 9375-80, May 29 2007.

MA, X. TNF-alpha and IL-12: a balancing act in macrophage functioning. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 3, n. 2, p. 121-9, Feb 2001.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R. *et al.* Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. **Journal of natural products**, v. 58, n. 2, p. 324-8, Feb 1995.

MALLA, N.; MAHAJAN, R. C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 267-74, Mar 2006.

MARSDEN, P. D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, n. 18

p. 11, 1985.

MARTINEZ, S.; MARR, J. J. Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **The New England journal of medicine**, v. 326, n. 11, p. 741-4, Mar 12 1992.

MATOS, L. G.; PONTES, I. S.; TRESVENZOL, L. M. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activity of the ethanolic extract from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (Manaca) roots. **Phytotherapy research : PTR**, v. 18, n. 12, p. 963-6, Dec 2004.

MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; COELHO, M. V. *et al.* Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 73, n. 2, p. 123-37, Apr 1979.

MCKENZIE, A. N. Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13. **Pharmacology & therapeutics**, v. 88, n. 2, p. 143-51, Nov 2000.

MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Brasil: Fundação Biodiversitas, Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, 2000. 160

MERCER, J.; HELENIUS, A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. **Science**, v. 320, n. 5875, p. 531-5, Apr 25 2008.

MIEKELEY, N.; MORTARI, S. R.; SCHUBACH, A. O. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 372, n. 3, p. 495-502, Feb 2002.

MIOSSEC, P. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. **Arthritis and rheumatism**, v. 48, n. 3, p. 594-601, Mar 2003.

MISHRA, B. B.; SINGH, R. K.; SRIVASTAVA, A. *et al.* Fighting against Leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-Leishmanial agents. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 9, n. 1, p. 107-23, Jan 2009.

MITTAL, N.; GUPTA, N.; SAKSENA, S. *et al.* Protective effect of Picroliv from *Picrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. **Life sciences**, v. 63, n. 20, p. 1823-34, 1998.

MOLL, H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. **Immunology today**, v. 14, n. 8, p. 383-7, Aug 1993.

MOREIRA, M. E.; BARCINSKI, M. A. Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 76, n. 1, p. 93-115, Mar 2004.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 286-96, Mar 2011.

MUSA, A. M.; NOAZIN, S.; KHALIL, E. A. *et al.* Immunological stimulation for the treatment of leishmaniasis: a modality worthy of serious consideration. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 1, p. 1-2, Jan 2010.

NABORS, G. S.; AFONSO, L. C.; FARRELL, J. P. *et al.* Switch from a type 2 to a type 1 T helper cell response and cure of established Leishmania major infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostam. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 8, p. 3142-6, Apr 11 1995.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 6, n. 12, p. 3051-64, Sep 1992.

NATHAN, C.; XIE, Q. W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 915-8, Sep 23 1994.

NDJAKOU LENTA, B.; VONTHRON-SENECHEAU, C.; FONGANG SOH, R. *et al.* In vitro antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 8-12, Apr 20 2007.

OSWALD, I. P.; WYNN, T. A.; SHER, A. *et al.* Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 18, p. 8676-80, Sep 15 1992.

OZER, L.; EL-ON, J.; GOLAN-GOLDHIRSH, A. *et al.* Leishmania major: anti-leishmanial activity of Nuphar lutea extract mediated by the activation of transcription factor NF-kappaB. **Experimental parasitology**, v. 126, n. 4, p. 510-6, Dec 2010.

PAUTZ, A.; ART, J.; HAHN, S. *et al.* Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 23, n. 2, p. 75-93, Sep 15 2010.

PETER G, W. The chemical systematics of alkaloids: A review emphasising the contribution of Robert Hegnauer. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 4, p. 395-406, 1999.

PRIVE, C.; DESCOTEAUX, A. Leishmania donovani promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. **European journal of immunology**, v. 30, n. 8, p. 2235-44, Aug 2000.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; OTERO, A. C.; GOMES, N. A. *et al.* Macrophage interactions with neutrophils regulate Leishmania major infection. **Journal of immunology**, v. 172, n. 7, p. 4454-62, Apr 1 2004.

RIBEIRO, T. A. N.; NDIAYE, E. A. D. S.; VELOZO, E. D. S. *et al.* Limonoids from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1347-1352, 2005.

ROBERTS, W. L.; BERMAN, J. D.; RAINEY, P. M. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1234-9, Jun 1995.

ROBERTS, W. L.; MCMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1076-82, May 1998.

SACCANI, S.; PANTANO, S.; NATOLI, G. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. **Nature immunology**, v. 3, n. 1, p. 69-75, Jan 2002.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual review of microbiology**, v. 55, p. 453-83, 2001.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845-58, Nov 2002.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 69, n. 1, p. 100-3, Jul 1989.

SADLOVA, J.; PRICE, H. P.; SMITH, B. A. *et al.* The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 12, p. 1765-79, Dec 2010.

SAHA, P.; BHATTACHARJEE, S.; SARKAR, A. *et al.* Berberine chloride mediates its anti-leishmanial activity via differential regulation of the mitogen activated protein kinase pathway in macrophages. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e18467, 2011.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RAZMILIC, I.; SAUVAIN, M. *et al.* Antiprotozoal activity of Jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and Jatrophone from *Jatropha isabellii*. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 5, p. 375-378, 1996.

SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. A. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 324, n. 2, p. 744-52, Nov 12 2004.

SEGER, R.; KREBS, E. G. The MAPK signaling cascade. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, n. 9, p. 726-35, Jun 1995.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, v. 46, n. 5, p. 705-16, Aug 29 1986.

SERENO, D.; LEMESRE, J. L. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 5, p. 972-6, May 1997.

SHUKLA, A. K.; SINGH, B. K.; PATRA, S. *et al.* Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2208-18, Apr 2010.

SIEBENLIST, U. NF kappa B/I kappa B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. Madrid, Spain, July 7-10, 1996. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1332, n. 1, p. R7-13, Feb 22 1997.

SIEGERS, C. P.; STEFFEN, B.; ROBKE, A. *et al.* The effects of garlic preparations against human tumor cell proliferation. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 6, n. 1, p. 7-11, Mar 1999.

SINGH, N.; KUMAR, R.; GUPTA, S. *et al.* Antileishmanial activity in vitro and in vivo of constituents of sea cucumber *Actinopyga lecanora*. **Parasitology research**, v. 103, n. 2, p. 351-4, Jul 2008.

SOARES, D. C.; ANDRADE, A. L.; DELORENZI, J. C. *et al.* Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuba* latex against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology international**, v. 59, n. 2, p. 173-7, Jun 2010.

SOARES, M. M.; KING, S. W.; THORPE, P. E. Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases. **Nature medicine**, v. 14, n. 12, p. 1357-62, Dec 2008.

SORENSEN, A. L.; HEY, A. S.; KHARAZMI, A. *Leishmania major* surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 102, n. 4, p. 265-71, Apr 1994.

SPATH, G. F.; GARRAWAY, L. A.; TURCO, S. J. *et al.* The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 16, p. 9536-41, Aug 5 2003.

SPORN, L. A.; SAHNI, S. K.; LERNER, N. B. *et al.* *Rickettsia rickettsii* infection of cultured human endothelial cells induces NF-kappaB activation. **Infection and immunity**, v. 65, n. 7, p. 2786-91, Jul 1997.

STEFANOVIC-RACIC, M.; STADLER, J.; EVANS, C. H. Nitric oxide and arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 36, n. 8, p. 1036-44, Aug 1993.

STOBIE, L.; GURUNATHAN, S.; PRUSSIN, C. *et al.* The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 15, p. 8427-32, Jul 18 2000.

TAPIA, F. J.; CACERES-DITTMAR, G.; SANCHEZ, M. A. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology today**, v. 15, n. 4, p. 160-5, Apr 1994.

TEREZAN, A. P.; ROSSI, R. A.; ALMEIDA, R. N. A. *et al.* Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 882-886, 2010.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315-21, Jun 1 2006.

TIAN, R.; XU, S.; LEI, X. *et al.* Characterization of small-molecule–biomacromolecule interactions: From simple to complex. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 810-825, 2005.

TIUMAN, T. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; GARCIA CORTEZ, D. A. *et al.* Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 176-82, Jan 2005.

TRESVENZOL, L. M. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. . **Revista Eletrônica de Farmácia**, n. 3, 2006.

UKIL, A.; BISWAS, A.; DAS, T. *et al.* 18 Beta-glycyrrhetic acid triggers curative Th1 response and nitric oxide up-regulation in experimental visceral leishmaniasis associated with the activation of NF-kappa B. **Journal of immunology**, v. 175, n. 2, p. 1161-9, Jul 15 2005.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 3, p. 22, 2000.

VODOVOTZ, Y.; BOGDAN, C. Control of nitric oxide synthase expression by transforming growth factor-beta: implications for homeostasis. **Progress in growth factor research**, v. 5, n. 4, p. 341-51, 1994.

WAECHTER, A. I.; FERREIRA, M. E.; FOURNET, A. *et al.* Experimental treatment of cutaneous leishmaniasis with argentilactone isolated from *Annona haematantha*. **Planta medica**, v. 63, n. 5, p. 433-5, Oct 1997.

WANDERLEY, J. L.; BENJAMIN, A.; REAL, F. *et al.* Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]**, v. 38, n. 6, p. 807-12, Jun 2005.

WANDERLEY, J. L.; MOREIRA, M. E.; BENJAMIN, A. *et al.* Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. **Journal of immunology**, v. 176, n. 3, p. 1834-9, Feb 1 2006.

WEAVER, C. T.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R. *et al.* IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annual review of immunology**, v. 25, p. 821-52, 2007.

WHO. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases.**2010.

WINBERG, M. E.; HOLM, A.; SARND AHL, E. *et al.* *Leishmania donovani* lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 11, n. 2, p. 215-22, Feb 2009.

YANG, D. M.; LIEW, F. Y. Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**, v. 106 (Pt 1), p. 7-11, Jan 1993.

YUROCHKO, A. D.; MAYO, M. W.; POMA, E. E. *et al.* Induction of the transcription factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promoters. **Journal of virology**, v. 71, n. 6, p. 4638-48, Jun 1997.

ZENEWICZ, L. A.; YANCOPOULOS, G. D.; VALENZUELA, D. M. *et al.* Interleukin-22 but Not Interleukin-17 Provides Protection to Hepatocytes during Acute Liver Inflammation. **Immunity**, v. 27, n. 4, p. 647-659, 2007.