

**ANNA LÉA SILVA BARRETO**

**ATIVIDADE ANTI-*Leishmania amazonensis* DO  
EXTRATO DA ESPONJA MARINHA *Stoeba latex***



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

ORIENTADOR: Prof<sup>a</sup> Rosangela Maria de Araújo Soares

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES  
RIO DE JANEIRO

MARÇO 2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**FICHA CATALOGRÁFICA****Barreto, Anna Léa Silva**

Atividade anti-*Leishmania amazonensis* do extrato da esponja marinha  
*Stoeba latex*/ Anna Léa Silva Barreto – Rio de Janeiro, 2010  
xi, 64p.:il

Dissertação: Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia  
Prof. Paulo de Góes, 2010.

Orientador: Rosangela Maria de Araújo Soares

Referências bibliográficas: f. 44

1. *Leishmania amazonensis* 2. *Stoeba latex* 3. Produtos naturais 4. Atividade proteolítica 5. Arginase 6. Leishmanicida.

I. Soares, Rosangela Maria de Araújo

II. UFRJ. Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes. Mestrado em Ciências Biológicas.

III. Atividade anti-*Leishmania amazonensis* do extrato da esponja marinha *Stoeba latex*.

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**ANNA LÉA SILVA BARRETO**

**Atividade anti-*Leishmania amazonensis* do extrato da esponja marinha  
*Stoeba latex***

**Rio de Janeiro, 04 de Março de 2010.**

---

Rosângela Maria de Araújo Soares. Doutorado em Ciências. IMPPG/UFRJ

---

Marta Helena Branquinha de Sá. Doutorado em Ciências. IMPPG/UFRJ

---

Antônio Ferreira Pereira. Doutorado em Química. IMPPG/UFRJ

---

Bartira Rossi Bergman. Doutorado em Biological Sciences. IBCCF/UFRJ

---

Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes. Doutorado em Ciências IMPPG/UFRJ

*A pesquisa intitulada “**Atividade anti-Leishmania amazonensis do extrato da esponja marinha Stoeba latex**” foi realizada no Laboratório de Biologia de Protistas do Departamento de Microbiologia geral do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), do Centro de Ciências da Saúde (CCS, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosângela Maria de Araújo Soares (Professora Associada do Departamento de Microbiologia Geral IMPPG/CCS/UFRJ)*

O futuro tem muitos nomes.  
Para os fracos é o inalcançável.  
para os temerosos, o desconhecido.  
Para os valentes é a oportunidade.  
(Vitor Hugo)

O segredo é não correr atrás das borboletas...  
É cuidar do jardim para que elas venham até você.  
(Mário Quintana)

## AGRADECIMENTOS

A minha família por estar sempre ao meu lado nesta caminhada;

A minha filha Anna Cecília, companheira de bancada durante os nove meses de gestação, você é meu maior incentivo e meu melhor projeto;

Ao meu marido Celso pelo incentivo e apoio desde a graduação, esta vitória também é sua;

A minha orientadora Rosangela Soares pelo voto de confiança e ensinamentos durante o curso;

A minha amiga e comadre Danielle por ter acreditado em mim e aberto as portas do Instituto. Espero que ainda possamos dar muitas risadas juntas e curtir os nossos filhotes;

Ao meu amigo Msc. Rodrigo Alípio pela revisão do português desta dissertação;

Aos espíritos de luz que estiveram ao meu redor durante esta jornada me ajudando a manter o equilíbrio nos momentos mais difíceis;

Aos colegas de laboratório Maristela, Sínthia, Elisa, Ariadne, Camila, Cristina, Davi, Fátima, Luís, Mariana, Vanila, Gleiser e Cátia e aos que foram colegas de laboratório Aline, Éber e Senda. A participação de vocês em experimentos, incentivos e trocas de experiências foi fundamental;

Ao meu companheiro de mestrado Alexandre por tudo que passamos juntos, os momentos de alegria, desespero, descontração, exames de  $\beta$ -HCG... (um dos episódios mais engraçados...), o melhor ainda está por vir e você vai ter que aprender a fazer PBS;

A colega do laboratório de Bioquímica de Proteases, Fernanda Marinho pela paciência e desprendimento ao me ensinar os experimentos de interação;

As colegas do laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura, Roberta e Camila pela ajuda com a microscopia eletrônica;

A professora Daniela Alviano pelos conhecimentos concedidos, disponibilidade e gentileza e pelos experimentos de citometria de fluxo;

Aos professores Celuta Alviano, Marta Branquinha e Antônio Pereira pelas colaborações e delicadeza;

Aos professores Thais Souto-Padrón e Kildare Miranda pelos experimentos de microscopia eletrônica;

A professora Angela Hampshire pela revisão criteriosa desta dissertação;

Ao CNPQ e a FAPERJ pelo financiamento dos estudos e do projeto.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram desta caminhada, muito obrigada.



**ANNA LÉA SILVA BARRETO****Atividade anti-*Leishmania amazonensis* do extrato da esponja marinha *Stoeba latex*.**

ORIENTADOR: Rosangela Maria de Araújo Soares

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

O estudo teve como objetivos avaliar o emprego do extrato aquoso de *Stoeba latex* sobre *Leishmania amazonensis*, com testes *in vitro*, em formas promastigotas e em cultura de macrófagos infectados, analisando a atividade leishmanicida, a ação sobre proteases celulares, atividade da enzima arginase, na interação parasito-macrófago e na ultraestrutura do parasito. Os promastigotas foram crescidos em meio Schneider Insecta a 26°C. Para realização dos experimentos, os parasitos foram crescidos na presença ou na ausência do extrato aquoso de *Stoeba latex*. O teste de atividade leishmanicida revelou valores de MIC e IC<sub>50</sub> de 372 e 150 µg/ml, respectivamente. “In vitro”, o extrato foi capaz de inibir parcialmente a atividade da enzima arginase e a atividade de serina proteases. Parasitos crescidos na presença do IC<sub>50</sub> do extrato aquoso tiveram a expressão de gp63 e cisteína protease b aumentadas e mudanças no perfil de proteínas totais associadas à célula com a diminuição da expressão de proteínas de 40, 21 e 10 kDa. O extrato aquoso de *S. latex* provocou alterações ultraestruturais no núcleo e nos acidocalcissomas de promastigotas de *L. amazonensis*, quando estes eram crescidos em 150 µg/ml do extrato. Quando analisamos o efeito do extrato sobre amastigotas intracelulares, observamos redução de 32,6% do percentual de macrófagos infectados, após 24 horas de tratamento; no entanto, não foi observada influência na interação parasito-macrófago. Levando-se em consideração a problemática da resistência ao tratamento e os efeitos colaterais provocados pelos poucos medicamentos usualmente utilizados no combate as leishmanioses, além da co-infecção *Leishmania*-HIV, nosso estudo revela novos aspectos sobre o emprego de extrato da esponja *S. latex* sobre *L. amazonensis*.

Palavras chave: *Leishmania amazonensis*; *Stoeba latex*; arginase; enzimas proteolíticas

**ANNA LÉA SILVA BARRETO****Activity against *Leishmania amazonensis* extract from the marine sponge *Stoeba latex***

ORIENTADOR: Rosangela Maria de Araújo Soares

*Abstract* da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

The goal of this study was to evaluate the use of aqueous extract of *Stoeba latex* on *Leishmania amazonensis* in vitro tests. Promastigote forms and infected macrophages were used, analyzing the leishmanicidal activity, the action of cellular proteases, the enzyme arginase, effect on parasite-macrophage interactions and the ultrastructure of the parasite. The promastigotes were grown in Schneider's Insecta medium at 26°C and then the experiments were performed after the parasites were grown in the presence or absence of aqueous extract of *Stoeba latex*. The tests showed leishmanicidal activity values of MIC and IC<sub>50</sub> of 372 and 150 µg/ml, respectively. The extract was able to partially inhibit the activity of the enzymes arginase and serine proteases "in vitro". The aqueous extract of *S. latex* induced ultrastructural changes in the nucleus and acidocalcisomes of *L. amazonensis* promastigotes, when they were grown in 150 µg/ml extract. When analyzing the effects of the extract on intracellular amastigotes, it was observed a 32.6% reduction in the percentage of infected macrophages, after 24 hours treatment. However, there was no effect on parasite-macrophage interaction. Parasites grown in the presence of the aqueous extract at the IC<sub>50</sub> concentration presented an increase on the expression of gp63 and cysteine protease b, as well as changes in the profile of total protein associated with cell, which presented a decrease on the expression of proteins of 40, 21 and 10 kDa. Taking into account the problem of resistance to treatment and side effects caused by the few drugs usually used against leishmaniasis, and coinfection of Leishmania-HIV, our study shows new aspects on the use of *S. latex* extract on *L. amazonensis*.

Key words: *Leishmania amazonensis*; *Stoeba latex*, arginase, proteolytic activity.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>Viii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ix</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 – O Gênero <i>Leishmania</i>	1
1.2 – Ciclo de vida	3
1.3 – Fatores de virulência e evasão do sistema imune	4
1.4 – Leishmaniose	9
1.5 – Tratamento	11
1.6 – Substâncias ativas a partir de poríferos	14
<b>2 – JUSTIFICATIVA</b>	<b>17</b>
<b>3 – OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
3.1 – Objetivos gerais	18
3.2 – Objetivos específicos	18
<b>4 – MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>19</b>
4.1 – Microorganismo	19
4.2 – Extratos de esponja testados em <i>Leishmania amazonensis</i>	19
4.3 – Teste de atividade leishmanicida e determinação da concentração inibitória de 50% (IC <sub>50</sub> )	20
4.4 – Efeito do extrato aquoso de <i>S. latex</i> sobre a ultraestrutura de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	20
4.5 – Efeito do extrato aquoso de <i>S. latex</i> sobre macrófagos peritoneais de camundongos	20
4.6 – Efeito do extrato aquoso de <i>S. latex</i> sobre a atividade da enzima arginase de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	21
4.7 – Efeito do extrato aquoso de <i>S. latex</i> sobre proteases e proteínas de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	22
4.8 – Efeito do extrato aquoso de <i>S. latex</i> sobre o perfil de proteínas totais de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	24
4.9 – Efeito do extrato aquoso de <i>S. latex</i> na interação <i>Leishmania</i> -macrófago	25
4.10 – Análise do efeito do extrato aquoso de <i>S. latex</i> sobre amastigotas intracelulares (Pós-tratamento)	26
<b>5 – RESULTADOS</b>	<b>27</b>
5.1 – Teste de atividade leishmanicida	27
5.2 – Citotoxicidade	28
5.3 – Efeito do extrato aquoso de <i>S. latex</i> sobre a ultraestrutura de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	29

5.4 - - Efeito do extrato aquoso de <i>S. latex</i> sobre proteases e proteínas de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	31
5.5 – Análise do efeito do extrato sobre a atividade da enzima arginase	35
5.6 - Efeito do extrato aquoso de <i>S. latex</i> na interação <i>Leishmania</i> -macrófago	35
5.7 - – Análise do efeito do extrato aquoso de <i>S. latex</i> sobre amastigotas intracelulares (Pós-tratamento)	36
<b>6 – DISCUSSÃO</b>	37
<b>7 – CONCLUSÃO</b>	43
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	44

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1- O Gênero *Leishmania*

A primeira observação de parasitos do gênero *Leishmania* foi feita por Cunningham (1885) na Índia, em casos de leishmaniose visceral; no Brasil, em 1855 Cerqueira observou a existência da leishmaniose cutânea identificando-a como “botão de Biskra”. Entretanto, a natureza leishmaniótica das lesões cutâneas e mucocutâneas só foi confirmada por Lindenberg em 1909 e Gaspar Vianna em 1911 denominou-a *Leishmania brasiliensis* (NEVES, 1998).

No Brasil, até a década de setenta, todos os casos de leishmaniose eram atribuídos a *L. brasiliensis*, porém com o aprimoramento de técnicas de análises e estudos epidemiológicos, outras espécies foram descritas como causadoras da leishmaniose tegumentar (LT) (BASANO & CAMARGO, 2004).

Estes protozoários alocam-se no sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Essa ordem abrange indivíduos com uma organela característica, o cinetoplasto, que contém DNA e é capaz de auto-replicação (REY, 1991; MURRAY *et al.*, 2004).

O gênero *Leishmania* foi subdividido em complexos fenotípicos agrupados em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. O subgênero *Viannia* tem distribuição neotropical, causam leishmaniose cutânea e mucocutânea e compreende as espécies descritas primeiramente como do complexo *L. brasiliensis*, como: *L.(V.) brasiliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) panamensis*, e *L.(V.) peruviana* (REY, 1991). O subgênero *Leishmania* abrange espécies que causam a leishmaniose cutânea no Velho Mundo com *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica* e dois complexos, o complexo *L. mexicana* onde se

incluem as espécies *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) pifanoi* e *L. (L.) venezuelensis* e o complexo *L. donovani* cujos membros são *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* que causam leishmaniose cutânea e visceral, respectivamente (GRIMALDI *et al.*, 1989).

Esses parasitos apresentam duas formas evolutivas durante seu ciclo de vida, amastigotas e promastigotas. As formas amastigotas são tipicamente ovóides ou esféricas, podemos encontrar vacúolos em seu citoplasma, um núcleo ovóide e o cinetoplasto em forma de bastão situado próximo ao núcleo, o flagelo está presente na bolsa flagelar. As formas promastigotas (figura 1) são alongadas e da bolsa flagelar emerge um flagelo livre; no citoplasma também são observados vacúolos e o núcleo é semelhante ao da forma amastigota. O cinetoplasto é geralmente ovóide situado entre a extremidade da região anterior (da bolsa flagelar) e o núcleo, variando bastante sua posição (VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002).



Figura 1. Promastigotas de *Leishmania* sp. Disponível em <http://www.fiocruz.Br/ccs>. Acesso em 19 abr. 2008.

## 1.2 - Ciclo de vida

A infecção causada por espécies do gênero *Leishmania* se inicia quando promastigotas metacíclicos são introduzidos na circulação do hospedeiro vertebrado pela fêmea do flebotomíneo, que durante o repasto sanguíneo regurgita estes parasitos infectivos, devido à grande quantidade de indivíduos presentes em seu trato digestivo. Uma vez na circulação, essas formas serão fagocitadas por células fagocitárias, inclusive macrófagos (ANTOINE *et al.*, 1998). Os parasitos invadem macrófagos por receptores mediadores de endocitose, como por exemplo, via receptores de complemento, que são clivados por proteases do parasito; eles se multiplicam em pH baixo em fagolisossomos ricos em aminoácidos e tem seu metabolismo adaptado a este microambiente (STUART *et al.*, 2008). Dentro do hospedeiro mamífero, espécies de *Leishmania* se apresentam sob a forma amastigota, se multiplicando por divisão binária dentro do fagolisossoma dos macrófagos infectados; estes macrófagos se rompem, liberando os amastigotas que infectam outros macrófagos. Durante um novo repasto sanguíneo do vetor, estas formas amastigotas são sugadas e se transformam em promastigotas procíclicos, que se multiplicam por divisão binária no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, sendo encontrados nas regiões de proventrículo e esôfago, onde sofrem a metaciclogênese, que consiste na transformação de promastigotas procíclicos fracamente infectivos em promastigotas metacíclicos, altamente infectivos (SACKS & KAMHAWI, 2001).

Essa transformação é acompanhada pelo aumento da habilidade para infectar e sobreviver no hospedeiro vertebrado, quando o parasito é atacado pelo sistema imune daquele que o hospeda (SACKS, 1989).

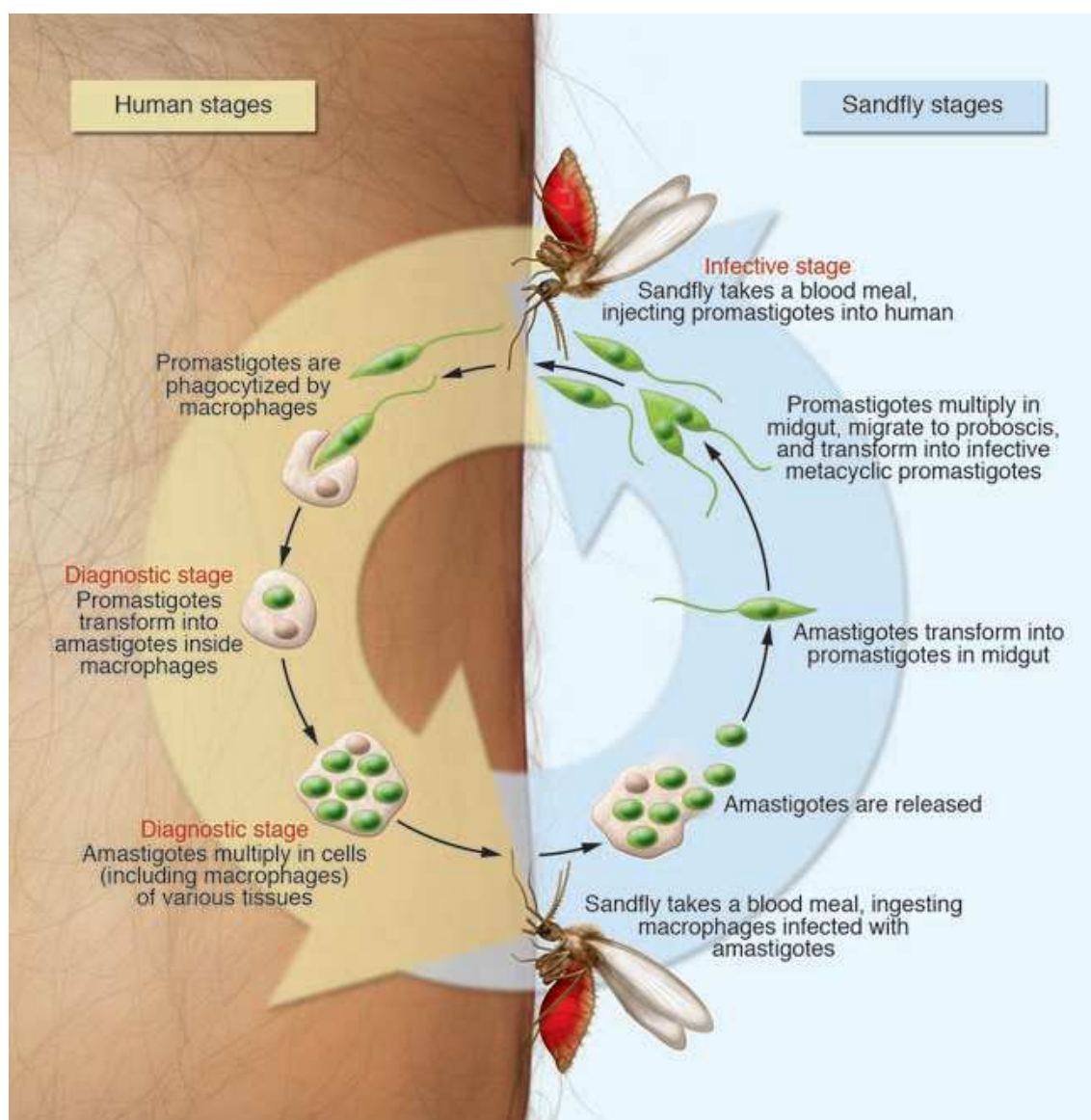


Figura 2. Ciclo de vida *Leishmania* spp. (STUART *et al.*, 2008).

### 1.3 - Fatores de virulência e evasão do sistema imune

As espécies do gênero *Leishmania* expressam moléculas que as habilitam a invadir e estabelecer infecção no hospedeiro mamífero, e dentre as principais podemos citar a lipofosfoglicana, uma molécula de superfície de promastigotas, um polímero de dissacarídeos fosfatados, ancorado a superfície da célula por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e quando ocorre à diferenciação em amastigotas seus



níveis são reduzidos e sua estrutura química é significativamente alterada. Sua expressão está relacionada com a virulência no que diz respeito à sobrevivência em macrófagos, além de mostrar sinais de inibição na atividade da enzima proteína cinase C (PKC) que medeia transdução de sinal em macrófagos e ter um papel importante na ligação de promastigotas ao epitélio intestinal do inseto (MATLASHEWSKI, 2001). Estudos indicam que a lipofosfoglicana protege os promastigotas de espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose e diminui a ativação de respostas microbicidas como a produção de citocinas pró-inflamatórias (NADERER & McCONVILLE, 2008).

Os glicosilinosilfosfolipídeos formam um glicocálice em formas amastigotas, juntamente com glicoesfingolipídeos derivados do hospedeiro e este serve como escudo para hidrolases lisossomais minimizando a possibilidade de que peptídeos liberados pelo parasito sejam apresentados ao sistema imune por proteínas MHC de classe II (NADERER *et al.*, 2004). Estudos mostram que GIPLs estão distribuídos preferencialmente em microdomínios de membrana e podem estar associados com a transdução de sinais e mecanismos de reconhecimento/adesão parasito-célula hospedeira (YONEYAMA *et al.*, 2006).

As proteases produzidas por tripanossomatídeos que podem ser intracelulares ou extracelulares possuem diferentes especificidades (McKERROW *et al.*, 2006) e também tem implicações em uma gama de mecanismos adaptativos, incluindo modulação do sistema imune do hospedeiro, invasão e destruição de tecidos, disseminação dos parasitos e aquisição de nutrientes (SADJI & McKERROW, 2002).

As cisteína proteases parecem ter um papel importante na sobrevivência e no crescimento de amastigotas no interior de macrófagos sendo consideradas fatores de virulência e moduladoras da resposta imune do hospedeiro (TRAUB-CSEKO *et al.*, 1993; MATLASHEWSKI, 2001). Estudos mostram as cisteína proteases de *Leishmania*

organizadas em três grupos, designados CPA, CPB e CPC e informações sobre a função e a importância destas proteínas na relação parasito-hospedeiro vêm sendo obtidas através de estudos com mutantes deficientes em genes que codificam estas proteases (MOTTRAM *et al.*, 2004). Mutantes de *Leishmania mexicana* deficientes de CPB tiveram sua virulência atenuada no que diz respeito à capacidade de induzir lesões em animais suscetíveis (ALEXANDER *et al.*, 1998). Khoshgoo e colaboradores (2008) mostraram que cisteína protease tipo III (CPC) foi capaz de proteger camundongos BalbC contra infecção por *L. infantum*, sugerindo que estas enzimas possam ser boas candidatas a antígenos vacinais.

A metaloprotease gp63, também conhecida como leishmanolisina e protease maior de superfície (MSP), é descrita como um importante fator de virulência por conferir resistência à lise mediada por complemento clivando e convertendo C3b para sua forma inativa iC3b e mediando a fagocitose pelos macrófagos, ainda é descrita como um ligante receptores dos macrófagos como CR1 e de proteínas de superfície do hospedeiro como o receptor para fibronectina. Ela é sintetizada no retículo endoplasmático e ancorada na superfície por uma âncora de GPI, podendo ser liberada por promastigotas no meio extracelular (McKERROW *et al.*, 2006). No caso de algumas espécies como *L. chagasi*, *L. major* e *L. mexicana* foram identificadas classes distintas de gp63 que diferem primariamente em suas regiões C-terminal e em alguns casos possuem expressão diferencial durante o ciclo de vida do parasito (YAO *et al.*, 2003).

Estudos indicam que a gp63 é uma endopeptidase que pode hidrolisar uma vasta gama de substratos incluindo hemoglobina, fibronectina, caseína, gelatina e albumina, sendo codificada por uma família de genes altamente conservados (YAO *et al.*, 2007). Homólogos da gp63 têm sido descritos em outros tripanossomatídeos incluindo

parasitos monoxênicos de insetos, *Phytomonas* (SANTOS *et al.*, 2006), *Trypanosoma brucei* (GRANDEGENETT *et al.*, 2007) e *Trypanosoma cruzi* (CUEVAS *et al.*, 2003)

Silva-Lopez e colaboradores caracterizaram em 2005 uma serina protease secretada por *L. amazonensis* e sugeriram que esta enzima estaria envolvida na sobrevivência do parasito no interior da célula hospedeira, já que ela era capaz de hidrolisar fibrinogênio, colágeno e hemoglobina, indicando que ela estaria implicada na aquisição de hemina pelo parasito. Morgado-Díaz e colaboradores (2005) mostraram a localização de uma serina protease de 68kDa em promastigotas de *L. amazonensis* sugerindo que esta esteja associada à membrana de compartimentos intracelulares.

Choudhury e colaboradores (2009) identificaram e purificaram uma serina protease de 115 kDa em promastigotas de *L. donovani* e este mesmo grupo mostrou por imunocitoquímica a localização na bolsa flagelar desta serina protease secretada, além de demonstrar que a expressão desta enzima era diminuída quando os parasitos tinham sua virulência atenuada, sugerindo que esta protease exerça um papel na patogênese da leishmaniose visceral (CHOUDHURY *et al.*, 2010).

A atividade de algumas proteases é controlada por inibidores de protease, que podem ser encontrados no ambiente natural do organismo, por exemplo, o genoma humano contém genes que codificam inibidores de serina e cisteína proteases (RAWLINGS *et al.*, 2004).

Silva-Lopez e colaboradores (2007) mostraram que inibidores de serina proteases em *L. amazonensis* afetaram a viabilidade celular e causaram mudanças ultraestruturais nos parasitos. Mutantes de *L. mexicana* superexpressando um inibidor de cisteína protease próprio do parasito tiveram sua virulência diminuída em testes com camundongos, induziram uma resposta Th1 e os animais foram capazes de debelar a infecção, diferentemente de camundongos infectados com promastigotas selvagens cuja

resposta induzida foi Th2, (BRYSON *et al.*, 2009) o que confirma a atuação destas proteases como importantes fatores de virulência e sobrevivência no hospedeiro vertebrado. Contudo, estudos com estes mutantes em *Lutzomyia longipalpis* mostraram que este inibidor não está relacionado com a sobrevivência do parasito no hospedeiro invertebrado e não é capaz de inibir a atividade das proteases do intestino do vetor (JECNA *et al.*, 2009).

Savoia e colaboradores (2005) demonstraram que indinavir e saquinavir, inibidores de proteases do vírus da imunodeficiência humana (HIV) inibiram o crescimento de *L. major* e *L. infantum* de maneira dose dependente. Santos e colaboradores (2009) mostraram que nelfinavir e lopinavir, inibidores de aspártico proteases do HIV inibiram o crescimento de *L. amazonensis* e causaram mudanças ultra estruturais em estruturas vitais para célula como membrana plasmática e retículo endoplasmático e estudos epidemiológicos realizados na região do Mediterrâneo mostraram a diminuição da incidência de leishmaniose visceral em pacientes em terapia antiretroviral combinada (HAART) além de mudanças significativas no quadro clínico da doença (POZIO, 2004). De fato, Alves e colaboradores (2005) em um estudo “in vitro”, detectaram a presença de atividade de aspartil protease durante o processo de diferenciação de formas promastigotas a amastigotas em *L. amazonensis*. E, mais recentemente, Valdivieso e colaboradores (2007) caracterizaram, pela primeira vez, uma atividade de aspartil protease com ação fibrinogenolítica em *L. mexicana*.

A arginase é uma metaloenzima dependente de manganês que catalisa a hidrólise de L-arginina em L-ornitina e uréia e sua atividade tem sido relacionada à regulação da síntese de óxido nítrico (NO), modulação e disponibilidade de L-arginina e consequentemente relacionada no processo citotóxico dos mecanismos imunológicos (KANYO *et al.*, 1996; DA SILVA *et al.*, 2002).

A atividade da arginase em membros da família Trypanosomatidae tem se mostrado específica em alguns gêneros e tem sido usada para identificação e classificação. O gênero *Leishmania* possui atividade de arginase detectável e considera-se que tenha um papel na produção de ornitina. (DA SILVA, *et al.*, 2002). A L-ornitina favorece o crescimento do parasito é precursora da síntese de L-glutamina, L-prolina e poliaminas pela via da ornitina descarboxilase (ODC) (VINCENDEAU *et al.*, 2003).

Estudos mostram que a arginase tem se mostrado essencial para o crescimento do parasito, já que protozoários arginase deficientes são incapazes de gerar poliaminas, embora estas também possam ser obtidas do meio extracelular (ROBERTS *et al.*, 2004). Iniesta e colaboradores (2005) mostraram que a indução da arginase I favorece a replicação de *Leishmania* em macrófagos e a inibição da arginase reduz o número de parasitos em modelo de infecção murino. Um inibidor fisiológico da arginase controla a infecção celular e inibe a atividade da arginase de *L. major* e *L. infantum*, além de aumentar a produção de NO pelos macrófagos, sugerindo que a enzima do parasito tem um papel importante na subversão da função macrofágica diminuindo os níveis de NO por competir pelo mesmo substrato que a óxido nítrico sintase (NOS) (BOUCHER *et al.*, 1999; INIESTA *et al.*, 2001).

#### **1.4 - Leishmaniose**

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias causadas por mais de vinte espécies de tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, cujo parasito dixênico é transmitido por insetos vetores dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), podem afetar animais silvestres e domésticos e ao homem. Está amplamente difundida no mundo ocorrendo em 88 países tropicais e subtropicais e pode dividir-se em dois grupos: as leishmanioses

dermotrópicas/mucotrópicas (tegumentares) e as leishmanioses viscerotrópicas ASHFORD, 2000; DAVID & CRAFT, 2009).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade existindo relatos e descrições desde o séc. I d.C. Nas Américas foram encontradas cerâmicas pré-colombianas feitas por índios peruanos que apresentavam mutilações de lábios e narizes características da leishmaniose cutâneo-mucosa (BASANO & CAMARGO, 2004); que se caracteriza como uma parasitose de ciclo heteroxênico não contagiosa de evolução crônica que acomete principalmente pele e/ou mucosas e distingue-se pelo aparecimento de lesões ulcerosas. A LTA é endêmica e com alta incidência em regiões tropicais africanas, americanas, indianas, do Mediterrâneo e do Sudeste Asiático. No Brasil estima-se o aparecimento de aproximadamente 35000 casos clínicos por ano em todas as regiões do país (HEPBURN, 2000; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

A LTA apresenta um espectro de manifestações clínicas e imunológicas que variam de um pólo anérgico (leishmaniose cutâneo-difusa) (REY, 1991; FAUCI, 1996; SILVA & CAMARGO-NEVES, 2004), na qual os parasitos migram por vasos linfáticos causando o aparecimento de lesões por toda a pele (HANDMAN, 2001; GONTIJO & CARVALHO, 2003) a outro hiperérgico (leishmaniose cutâneo-mucosa) (FAUCI, 1996; SILVA & CAMARGO-NEVES, 2004), onde ocorre o comprometimento e destruição das mucosas e estruturas teciduais relacionadas, além de estar freqüentemente associado com edema e infecções bacterianas secundárias produzindo mutilação facial (MURRAY *et al*, 2004). A doença constitui um problema de saúde pública, pois além da alta incidência e ampla distribuição geográfica a possibilidade da patologia assumir formas que podem determinar lesões destrutivas,

desfigurantes e incapacitantes constitui uma forte repercussão no campo psicossocial do indivíduo (SILVA & CAMARGO-NEVES, 2004).

O diagnóstico pode ser definido por várias técnicas, baseado em parâmetros clínicos e epidemiológicos (BASANO & CAMARGO, 2004). A demonstração do parasito pode ser feita por biópsia ou esfregaço das lesões, corados por Giemsa, Wright, Leishman ou Feulgen; pode-se utilizar também a intradermoreação de Montenegro (IDRM) (FURTADO, 1980) que consiste na observação de reação intradérmica suscitada por antígenos preparados com formas de cultura de *Leishmania* sp. A IDRM detecta a presença de hipersensibilidade tardia, uma vez que a LTA se caracteriza imunologicamente pelo aparecimento de uma resposta celular durante a doença ou após a cura da infecção, porém o teste é usualmente negativo nos casos de leishmaniose cutânea difusa e em pacientes imunodeprimidos; dentre os métodos sorológicos pode-se utilizar a reação de imunofluorescência indireta. A reação em cadeia da polimerase (PCR) também pode ser utilizada para diagnóstico, porém seu uso é limitado devido às exigências técnicas e o custo (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

## **1.5 – Tratamento**

O tratamento utiliza como drogas de primeira escolha antimoniais pentavalentes como antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam ®) que tem como prováveis mecanismos de ação a inibição da formação de ATP através da inibição do ciclo do ácido cítrico e glicólise, com ativação e conversão do antimonial para forma trivalente. Como medicamentos de segunda escolha têm a Pentamidina que se liga ao DNA do cinetoplasto inibindo sua função, porém o mecanismo de ação primária é desconhecido, e a Anfotericina B que interage com o

ergosterol da membrana celular do parasito alterando a permeabilidade celular (LIMA *et al.*, 2007; SING & SIVAKUMAR, 2004).

Outros fármacos podem ter ações sinérgicas quando associadas aos antimoniais como Alopurinol que atua incorporando-se ao ácido nucléico do parasito e inibindo o anabolismo de purinas (SAMPAIO & MARSDEN, 1997; BERMAN, 1997); Paramomicina, um antibiótico aminoglicosídeo que afeta a atividade mitocondrial em *Leishmania* (MAAROUF *et al.*, 1997), o Miltefosine, um derivado alquil-lisofosfolípídeo, tem ação antiproliferativa sendo originalmente empregado para o tratamento de câncer. Acredita-se que sua forma de atuação antileishmania seja a interferência na homeostase do cálcio e o aumento da citotoxicidade dos macrófagos pelo estímulo da produção do estresse oxidativo e o consumo da glicose (AZZOUZ *et al.*, 2005).

Além dos citados acima temos os antifúngicos (imidazólicos) que tem atividade contra a síntese de ergosterol (LIMA *et al.*, 2007; SING & SIVAKUMAR, 2004), e atuam inibindo a demetilação do carbono 14 alfa do lanosterol pela ligação com enzimas do citocromo P450 (PALLASCH, 2002). Entretanto as desvantagens de todos esses agentes terapêuticos consistem nos modos de administração, longa duração do tratamento, e a resistência do parasito (HERWALDT, 1999) além dos diversos efeitos colaterais assim como náusea, vômito, trombocitopenia, insuficiência renal aguda, alterações cardíacas e isquêmicas dentre outros (LIMA *et al.*, 2007).

Os mecanismos de resistência às drogas envolvem uma série de fatores que incluem a pressão seletiva exercida pelos medicamentos, o estado imunológico do paciente, que afeta a eficácia do fármaco e as propriedades farmacocinéticas das drogas, pois seus atributos também podem determinar sua eficácia em diferentes locais de infecção na leishmaniose como vísceras, pele ou mucosa nasal (CROFT *et al.*, 2006).



Estudos mostram que a resistência aos antimoniais pentavalentes que necessitam serem convertidos para sua forma trivalente para atuar contra o parasito, pode ocorrer pela redução ou perda da ativação da droga (OUELLETTE *et al.*, 2004). Pesquisas recentes têm mostrado a expressão de análogos aos transportadores ABC na superfície de promastigotas de cepas antimônio resistentes sugerindo o efluxo da droga (LEGARÉ, *et al.*, 2001; OUELLETTE *et al.*, 1998).

Apesar de a Pentamidina ser um componente alternativo no tratamento de pacientes com leishmaniose antimônio-resistente, foi identificado um locus que é capaz de conferir resistência ao medicamento (COELHO *et al.*, 2004). Esta resistência está associada a mudanças nas concentrações intracelulares de arginina e poliaminas, pois se acredita que seu mecanismo de entrada na célula seja mediado por transportadores de arginina ou poliamina, além de uma bomba de efluxo do tipo transportador ABC (OUELLETTE *et al.*, 2004). A resistência a Anfotericina B emerge com a modificação da fluidez da membrana que envolve a substituição do ergosterol e seus isômeros por outro esterol de membrana levando a uma baixa afinidade do medicamento por esta membrana modificada (MBONGO *et al.*, 1998).

A vacinação tem sido utilizada com fins profiláticos e terapêuticos associadas às drogas normalmente utilizadas (MAYRINK *et al.*, 2006). Tem sido descrita também a ocorrência de LTA em indivíduos portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA); o HIV modifica a apresentação clínica da patologia em todas as formas de leishmaniose, já que imunidade destes pacientes está comprometida. A possibilidade de visceralização da doença em casos de infecção por espécies essencialmente dermatóricas surge como uma complicação das condições de imunossupressão e a diversidade clínica da doença nesses pacientes dificultam ainda mais a terapêutica (SAMPAIO *et al.*, 2002; PAREDES *et al.*, 2003).

## 1.6 - Substâncias ativas a partir de poríferos

Produtos naturais terrestres e marinhos representam uma fonte inexaurível de componentes com potencial antimicrobiano e antiviral (ABAD *et al.*, 2000). A exploração do ambiente marinho é uma estratégia promissora na busca de novos medicamentos já que o surgimento de resistência em bactérias, fungos, protozoários e vírus vêm inviabilizando o emprego de drogas utilizadas atualmente (DONIA & HAMMAN, 2003).

A fauna marinha no Brasil ainda é pouco explorada na pesquisa por produtos com atividade biológica e novas estruturas químicas que podem ter relevâncias taxonômicas e filogenéticas, embora o litoral brasileiro seja o segundo em extensão perdendo somente para Austrália (BERLINCK *et al.*, 2004).

As esponjas, incluídas no filo Porífera, são animais multicelulares sem órgãos, porém com tecido conjuntivo bem desenvolvido no qual as células executam várias funções. Poríferos são animais sésseis, filtradores que utilizam células flageladas, conhecidas como coanócitos para circular água por um sistema de canais característicos do filo e, embora existam 150 espécies de água doce descritas, elas são animais marinhos com a maioria das espécies descritas restritas a ambientes bentônicos ocorrendo em todas as profundidades (RUPPERT & BARNES, 1996; BRUSCA & BRUSCA, 2007).

Os Poríferos têm tamanhos variáveis, principalmente devido à estrutura interna destes organismos. Algumas esponjas exibem simetria radial, porém a grande maioria mostra-se irregular ostentando diversos padrões de crescimento (ARAÚJO & BOSSOLAN, 2006). Sua arquitetura é única, sendo construída ao redor de canais de água e seu esqueleto relativamente complexo fornece sustentação para as células do

animal e consiste em espículas que podem ser calcárias, silicosas ou de espongina (RUPPERT & BARNES, 1996). Usam defesas químicas contra predadores e são uma fonte rica de metabólitos secundários para o estudo de produtos naturais marinhos e novos compostos (FAULKNER, 2001).

A classe Demospongiae contém 90% das espécies distribuídas de águas rasas a profundas, e ambientes marinhos, dulcícolas ou regiões de estuário e possuem espículas de sílica e espongina ou ambos (BRUSCA & BRUSCA, 2007). *Stoeba latex*, originária e endêmica do arquipélago São Pedro & São Paulo, Brasil, pertence à ordem Astrophorida e família Pachastrellidae (MORAES & MURICY, 2007). Todas as espécies conhecidas desta família são incrustantes, preenchendo usualmente cavidades em substratos calcáreos (MALDONADO, 2002).

Estudos realizados com algumas espécies mostram resultados promissores, como por exemplo, a Agelasina F isolada de *Agelas* sp. exibiu atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (MANGALINDAM *et al.*, 2000). Extratos de *Petromica citrina* e *Agelas* sp. mostraram potencial antiviral quando testadas em Herpes vírus simples e Adenovírus (DA SILVA *et al.*, 2006). Compostos isolados de *Haliclona* spp. mostraram atividade contra *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e dermatófitos sendo mais ativo contra *Microsporum canis* (WATTANADILOK *et al.*, 2007) e um composto isolado de *Paragrantia* cf. *waguensis* inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (TIANERO *et al.*, 2009).

No que diz respeito à *Leishmania* spp., as pesquisas trazem resultados estimuladores para novos estudos. Uma substância alcalóide isolada de *Amphimedon viridis* mostrou atividade sobre a proliferação de promastigotas de *L. mexicana*, além de mudanças ultra estruturais no parasito (MARCHÁN *et al.*, 2000); uma lectina isolada de

*Cliona varians* promoveu aglutinação em promastigotas de *L. chagasi* além de possuir um forte efeito em bactérias Gram positivas patogênicas como *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (MOURA *et al.*, 2006). Extratos metanólicos e n-butanólicos de *Haliclona exigua* demonstraram eficácia frente a *L. donovani* (DUBE *et al.*, 2007) e substâncias derivadas de *Plakortis angulospiculatus* manifestaram atividade em promastigotas de *L. chagasi* e tripomastigotas de *Trypanossoma cruzi* além de potencial antineuroinflamatório (KOSSUGA *et al.*, 2008).

## **2 – JUSTIFICATIVA**

Mediante a problemática da resistência ao tratamento e os efeitos colaterais provocados pelos poucos medicamentos regularmente utilizados no combate as leishmanioses, além da co-infecção *Leishmania*-HIV, faz-se necessária à busca de novos compostos químicos, que possam ser protótipos para confecção de fármacos eficazes contra a doença.

### 3 - OBJETIVOS

#### 3.1 – OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o emprego de compostos oriundos de esponjas marinhas na quimioterapia experimental, com testes *in vitro*, cultura axênica e em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos.

#### 3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito leishmanicida de diferentes espécies de esponjas;  
Analisar a atividade leishmanicida do extrato aquoso de *Stoeba latex* ;
- Analisar o efeito do extrato aquoso de *S. latex* nos seguintes aspectos da biologia celular de *L. amazonensis*:
  - expressão e atividade de proteases associadas à célula;
  - atividade da enzima arginase;
  - ultra estrutura celular;
  - interação parasito-macrófago, utilizando macrófagos peritoneais de camundongos;
- Analisar o efeito do extrato aquoso de *S. latex* na interação parasito-hospedeiro, utilizando macrófagos peritoneais de camundongos;
- Analisar o efeito do extrato aquoso de *S. latex* sobre amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos infectados;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato aquoso de *S. latex* frente a macrófagos de camundongos.

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 - Microorganismo

Foi empregada a cepa MHOM/Br/75/Josefa de *Leishmania amazonensis*. Em todos os experimentos foram utilizados promastigotas obtidos a partir de cultivo axênico em meio Schneider insecta (S9895 SIGMA) suplementado com 10% de soro bovino fetal e gentamicina (80 µg/ml).

### 4.2 - Extratos de esponja testados em *Leishmania amazonensis*

Os extratos foram cedidos pelo laboratório de Bioquímica de microbiana do Professor Antônio Pereira do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes/UFRJ e pelo Professor Guilherme Muricy, Museu Nacional/UFRJ.

<u>Eponja</u>	<u>Extrato</u>	<u>Locais de ocorrência</u>
<i>Petromica citrina</i> (1)	Etanólico	Litoral sul e sudeste do Brasil (MURICY & HADJU, 2006).
<i>Petromica citrina</i> (2)	Etanólico	Litoral sul e sudeste do Brasil (MURICY & HADJU, 2006).
<i>Polymastia janeirensis</i> (1)	Etanólico	Litoral BA, SP e RJ, Brasil. (MURICY & HADJU, 2006).
<i>Polymastia janeirensis</i> (2)	Etanólico	Litoral BA, SP e RJ, Brasil. (MURICY & HADJU, 2006).
<i>Geodia corticostilyfera</i>	Etanólico	Trinidad e Tobago, Venezuela e Brasil (RN, CE, PE, AL, BA, ES, RJ, SP) (MURICY & HADJU, 2006).
<i>Stoeba látex</i>	Aquoso	Arquipélago de São Pedro e São Paulo, Brasil (MORAES & MURICY, 2007).
<i>Agelas sventres</i>	Etanólico	Jamaica e Brasil (RN) (MURICY & HADJU, 2006).
<i>Agelas díspar</i>	Etanólico	Caribe (Bahamas, Jamaica, República Dominicana, Porto Rico, Ilhas Virgens, St. Martin, Guadalupe, Bonaire, Colômbia) e Brasil (PA, CE, RN, Atol das Rocas, Fernando de Noronha, AL, BA, ES, Ilha da Trindade e RJ) (MURICY & HADJU, 2006).
<i>Holoxea</i> sp.	Etanólico	
<i>Hymeniacion heliophila</i>	Aquoso	Atlântico tropical ocidental (Carolina do Norte – EUA até São Paulo – Brasil)

OBS: (1) e (2) – Extratos obtidos de coletas diferentes

### **4.3 - Teste de atividade leishmanicida e determinação da concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>)**

Foram utilizados  $2 \times 10^5$  promastigotas de fase exponencial, que foram incubados em placas de 96 poços, 26°C por 120 horas com meio de cultura e diluições seriadas dos extratos partindo da concentração de 1mg/ml em duplicatas, utilizando 200µl de meio de forma que fosse estabelecida a concentração mínima inibitória (CMI). A droga de referência foi a Anfotericina B (80µg/mL).

A viabilidade dos promastigotas foi observada através do método de exclusão do corante vital azul de Trypan e contagem em câmara de Neubauer. A concentração inibitória de 50% foi calculada pela equação  $y = - 225,98x + 84,085$  obtida por análise de dispersão em Microsoft Excel®.

### **4.4 – Efeito do extrato aquoso de *Stoebea latex* sobre a ultraestrutura de promastigotas de *L. amazonensis***

Parasitas controle e tratados com o IC<sub>50</sub> do extrato foram fixados em 4% de formaldeído, 2,5% de glutaraldeído 0,1M de tampão cacodilato pH 7,2. As células foram pós-fixadas, desidratadas e impregnadas como descrito em Bissagio e colaboradores (2006). Cortes ultrafinos foram obtidos com um ultramicrotomo Reichert UltraCut S, contrastados com acetato de uranila e analisados e fotografados em microscópio FEI Morgagni F268.

### **4.5 - Efeito do extrato aquoso de *Stoebea latex* sobre macrófagos peritoneais de camundongos**

A viabilidade dos macrófagos foi determinada através do método colorimétrico de redução do sal tetrazolium (3-(4,5-dimetilazol-2yl)-2,5-difeniltetrazoliumbromide)



(SIGMA) cujo anel é clivado em mitocôndrias ativas mostrando viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Macrófagos peritoneais de camundongo foram incubados em placas de 96 poços com diferentes concentrações do extrato aquoso de *S. latex* (0, 40, 150 e 372  $\mu\text{g/ml}$ ) em estufa a 37°C de atmosfera 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Após esse tempo foi adicionado MTT (5mg/mL) por 3 h, em estufa a 37°C e atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>, depois foi adicionado 100  $\mu\text{l}$  DMSO por 1 h a temperatura ambiente. A leitura foi realizada em 540 nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle e os valores foram plotados em gráfico de análise de dispersão do Microsoft Excel® a fim de obter valores de MIC e IC<sub>50</sub>.

#### **4.6 – Efeito do extrato aquoso de *Stoeba latex* sobre a atividade da enzima arginase de promastigotas de *L. amazonensis***

A dosagem de atividade de arginase foi realizada segundo Kropf e colaboradores (2005) com algumas modificações.

Os parasitos foram cultivados na ausência e na presença do IC<sub>50</sub> do extrato por 72 horas. 10<sup>8</sup> células foram lisadas com 100 $\mu\text{l}$  de Triton-X100 0,1% e submetidas a 5 ciclos de 3 min no vortex e 1 min no gelo. Após a lise foi adicionado 100 $\mu\text{l}$  de Tris-HCl 25mM pH 8,3. Para a dosagem, primeiramente a enzima foi ativada, adicionando-se 10  $\mu\text{l}$  de MnCl<sub>2</sub> 10mM a 100  $\mu\text{l}$  do lisado e em seguida a mistura reacional foi aquecida por 10 min a 56°C.

A hidrólise da arginina (substrato) foi mensurada incubando o lisado com 100  $\mu\text{l}$  de L-arginina 0,5M pH 9,7, 37°C por 20 min. A reação foi parada com 800  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%) e H<sub>2</sub>O (1/3/7, v/v/v). A concentração de uréia foi mensurada pela adição de 40  $\mu\text{l}$  de  $\alpha$ -isonitrosopropiophenone 4% (dissolvido em 100% de etanol), seguida de aquecimento a 95°C por 30 min. A leitura foi feita em 540 nm .

## **4.7 - Efeito do extrato aquoso de *Stoebea latex* sobre proteases e proteínas de promastigotas de *L. amazonensis***

### **4.7.1 - Obtenção de extratos celulares totais**

Os parasitos ( $1 \times 10^8$ ) crescidos na ausência ou na presença do IC<sub>50</sub> do extrato foram coletados, na fase logarítmica de crescimento (120 horas de cultivo), através de centrifugação a 4500 rpm a 4°C por 3 min. O sedimento foi lavado 3 vezes em PBS pH 7,2 gelado. Para análise eletroforética, essas células foram ressuspensas em 100 µL de água destilada e adicionadas de 200 µL de 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e submetidas a 3 ciclos de 2 min no gelo e 1 min no vortex: desta maneira, os parasitos foram lisados, possibilitando a obtenção dos extratos protéicos totais.

A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Lowry (1951), usando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

### **4.7.2 – Dosagem química da atividade proteolítica**

Para quantificar a atividade proteolítica 10µg de proteína dos extratos celulares provenientes de células tratadas e não tratadas com o extrato da esponja foram adicionados a 20 µL de uma solução de BSA a 0,1% e o volume da reação foi completado para um volume final de 100µL com tampões fosfato 50mM pH 5,5 2mM DTT , fosfato 50mM pH 5,5, PBS pH 7,2 e glicina pH 10,0. Em seguida, as misturas de reação foram incubadas por 6h a 37°C e foram adicionados 50 µL de solução de Comassie Brilliant Blue (Comassie Blue-G a 0,025%, etanol 11,75% e ácido fosfórico a 21,25%) e 50 µL de água. A leitura foi realizada após 10 min de contato das misturas de

reação com o corante, em espectrofotômetro 595 nm. Nos sistemas controle, os extratos celulares foram incubados a 37°C por 6 h apenas na presença dos tampões. Após esse tempo, adiciona-se simultaneamente o substrato (BSA) e o reagente (Comassie Brilliant Blue). Para determinação da atividade total enzimática, a absorbância do controle foi subtraída da absorbância do poço teste. Todas as misturas de reações e os controles foram preparados em triplicatas (BUROKER-KILGORE & WANG, 1993). A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar um aumento de 0,001 unidades na absorbância. Alternativamente este ensaio foi realizado com extrato de células sem nenhum tratamento com droga na presença de inibidores proteolíticos (1-10 fenantrolina, E64 e PMSF) e do extrato aquoso de *S. latex*. Neste caso, as amostras foram inicialmente incubadas individualmente com cada um dos inibidores por 5 min à temperatura ambiente e, em seguida se adicionou o substrato.

#### **4.7.3 – Efeito do extrato aquoso de *Stoeba latex* sobre na expressão de gp63 e cisteína protease B por citometria de fluxo**

Promastigotas de *L. amazonensis* incubados na presença ou na ausência do IC<sub>50</sub> do extrato aquoso de *S. latex* por 72 horas foram lavados e fixados durante 30 min a temperatura ambiente em paraformaldeído 4% diluído em PBS. Após fixação as células foram lavadas três vezes em PBS gelado. Os parasitos fixados foram analisados por microscopia ótica para observação da integridade morfológica. Os promastigotas foram então incubados por 1 h com os anticorpos primários policlonais anti-cpb de *L. mexicana* (reativo contra cisteína protease b de *L. mexicana*) e anti-gp-63 (reativo contra gp-63 recombinante de *L. mexicana*), (cedidos pelo Professor André Santos, IMPPG/UFRJ) diluídos 1:500. Após este período, as células foram lavadas extensivamente em PBS e incubadas com o anticorpo secundário (IgG) conjugado a isotiocianato de fluoresceína

(FITC) na diluição de 1:100. Finalmente as células foram lavadas e examinadas por citometria de fluxo, onde foram lidos 10000 eventos. Células não tratadas e tratadas somente com o anticorpo secundário foram utilizadas como controles negativos (MARINHO, 2009).

#### **4.8 – Efeito do extrato aquoso de *Stoeba latex* sobre perfil de proteínas totais**

Os protozoários foram crescidos na presença ou na ausência do IC<sub>50</sub> do extrato aquoso de *S. latex* por 72 horas e lisados conforme descrito no item 4.8.1.

Para a análise do perfil de proteínas totais foi realizado um gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), contendo gel de empacotamento a 3%, de acordo com o sistema descrito por LAEMMLI (1970). As amostras foram adicionadas de 5% de 2-β-mercaptoetanol e aquecidas, em banho-maria, por aproximadamente 1 min, a 100°C. Os géis foram carregados com 30 µg de proteína referentes à amostra e a eletroforese processada a 100 V, a 4°C. As proteínas foram reveladas através da coloração dos géis com 0,2% de Coomassie Brilliant Blue R-250 em metanol:ácido acético:água (50:10:40 v/v/v) ou com solução de nitrato de prata (GONÇALVES *et al.*, 1984).

##### **4.8.1- Massa molecular aparente de proteínas e proteases**

As massas moleculares aparentes das proteínas e proteases foram determinadas por comparação com proteínas padrões de massas moleculares conhecidas (Fermentas) aplicadas ao gel de poliacrilamida.

#### **4.9 – Efeito do extrato aquoso de *Stoeba latex* na interação *Leishmania*- macrófago**

Foram utilizados camundongos da linhagem Balb C, fêmeas com 3 meses de idade. Os animais foram estimulados por 4 dias com 2 mL de Tioglicolato (HIMEDIA - M010) 3% estéril injetado no peritônio. Após este período foram anestesiados com éter e colocados em frasco com álcool 70% para desinfecção da pele e sacrifício.

Para retirada dos macrófagos a pele superficial foi cortada e injetado PBS pH 7,2 gelado e imediatamente recolhido com seringa, sendo posteriormente centrifugado a 1300 rpm a 4°C por 8 minutos e ressuspensos em meio DMEM (GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foram plaqueados  $5 \times 10^5$  macrófagos em placas de 24 poços em duplicatas, contendo lamínulas redondas e mantidas em estufa 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 30 minutos para adesão. Após este tempo os macrófagos foram lavados em PBS pH 7,2 estéril a 37°C para retirada de células não aderidas e mantidas em 300µl de meio DMEM (GIBCO) em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 12 horas.

Para observação da interferência do extrato aquoso de *S. latex* na interação parasito – célula hospedeira, foi utilizada a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>). Os parasitos foram tratados por uma hora com o extrato, centrifugados a 4500 rpm, 4°C por 3 minutos, lavados duas vezes em PBS pH 7,2 gelado e ressuspensos em DMEM (GIBCO) para ajuste do inóculo que foi de  $5 \times 10^6$  células por poço.

Os macrófagos foram lavados em PBS pH 7,2 a 37°C para retirada do meio de cultura e incubados com os parasitos em 300 µl de meio DMEM (GIBCO) suplementado com 2% de soro fetal bovino em estufa 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por uma hora.

Após interação o material foi fixado em metanol por 5 minutos, lavado, desidratado em acetona:xilol nas concentrações 90: 10, 70:30, 30:70 e 0:100

respectivamente, corado com Giemsa 36% por 40 minutos em temperatura ambiente e aderido à lâmina 26 x 76 com resina Permout.

#### **4.10 – Análise do efeito do extrato aquoso de *Stoeba latex* sobre amastigotas intracelulares (Pós-tratamento)**

Para observação do efeito do extrato em amastigotas intracelulares, foi utilizada a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>). Os parasitos foram cultivados por 72 h, centrifugados a 4500 rpm, 4°C por 3 minutos, lavados duas vezes em PBS pH 7,2 estéril gelado e ressuspensos em DMEM (GIBCO) para ajuste do inóculo que foi de  $5 \times 10^6$  parasitos.

Os macrófagos foram lavados em PBS pH 7,2 estéril a 37°C para retirada do meio de cultura e incubados com os parasitos em 300 µl de meio DMEM (GIBCO) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) em estufa 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por uma hora.

Após interação, as células foram lavadas em PBS pH 7,2 a 37°C para retirada de parasitos não internalizados e foi adicionado 300µL de meio DMEM 10 % SFB com sistemas na presença ou ausência do extrato aquoso de *S. latex*.

Após 24 e 48 h, o material foi lavado, fixado em metanol por 5 minutos, lavado novamente, desidratado em acetona:xilol nas concentrações 90: 10, 70:30, 30:70 e 0:100 respectivamente, corado com Giemsa 36% por 40 minutos e aderido à lâmina 26 x 76 com resina Permout.

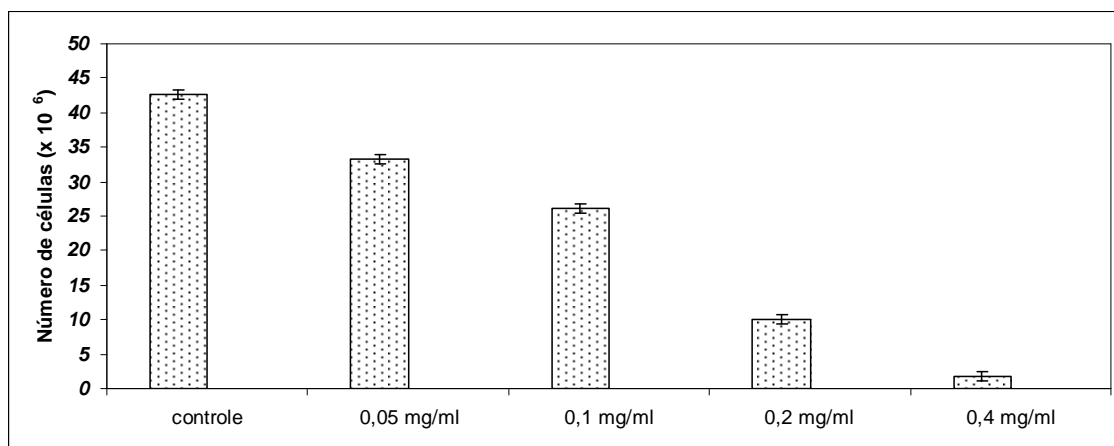
## 5. RESULTADOS

### 5.1 – Teste de atividade leishmanicida

Foram testados 10 extratos de 8 espécies de esponjas sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* (Tabela 2). Como podemos observar, os valores de MIC variam de 372 µg/ml a 5mg/ml. Foi então selecionada a esponja *Stoeba latex*, extrato aquoso, com os resultados mais promissores de MIC e IC<sub>50</sub> de 372 e 150 µg/ml, respectivamente (Gráfico 1).

<u>Esponja</u>	<u>Extrato</u>	<u>MIC</u>
<i>Petromica citrina</i> (1)	Etanólico	625 µg/ml
<i>Petromica citrina</i> (2)	Etanólico	> 1 mg/ml
<i>Polymastia janeirensis</i> (1)	Etanólico	625 µg/ml
<i>Polymastia janeirensis</i> (2)	Etanólico	> 1 mg/ml
<i>Geodia corticostilyfera</i>	Etanólico	> 1 mg/ml
<i>Stoeba latex</i>	Aquoso	372 µg/ml
<i>Agelas sventres</i>	Etanólico	5 mg/ml
<i>Agelas dispar</i>	Etanólico	625 µg/ml
<i>Holoxea</i> sp.	Etanólico	625 µg/ml
<i>Hymeniacidon heliophila</i>	Aquoso	1,25 mg/ml
OBS: (1) e (2) - Extratos obtidos de coletas distintas.		

**Tabela 2.** Avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) dos extratos testados em formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os protozoários foram crescidos em meio Schneider à 26<sup>o</sup>C por 120 horas na presença de diluições seriadas dos extratos das diferentes esponjas como descrito em materiais e métodos. Foi utilizada a anfotericina B como droga referência. Os resultados refletem a média de três experimentos. *P* < 0,001.



**Gráfico 1.** Efeito do extrato aquoso de *S. latex* sobre promastigotas de *L. amazonensis*. Os protozoários foram crescidos em meio Schneider à 26<sup>o</sup>C por 120 horas na presença de concentrações crescentes do extrato como descrito em materiais e métodos. Como controle utilizamos o crescimento das células sem adição do extrato. Os resultados refletem a média de três experimentos  $\pm$  erro padrão.

## 5.2 – Citotoxicidade

Foi determinado o MIC e o IC<sub>50</sub> para macrófagos peritoneais de camundongo com o objetivo de avaliarmos a citotoxicidade do extrato aquoso de *S. latex*. A Tabela 3 mostra os valores obtidos em comparação com os valores para o parasito. Como podemos observar o MIC e IC<sub>50</sub> para a forma promastigota de *L. amazonensis* é 31% e 13%, respectivamente, menores que as doses empregadas para os macrófagos.

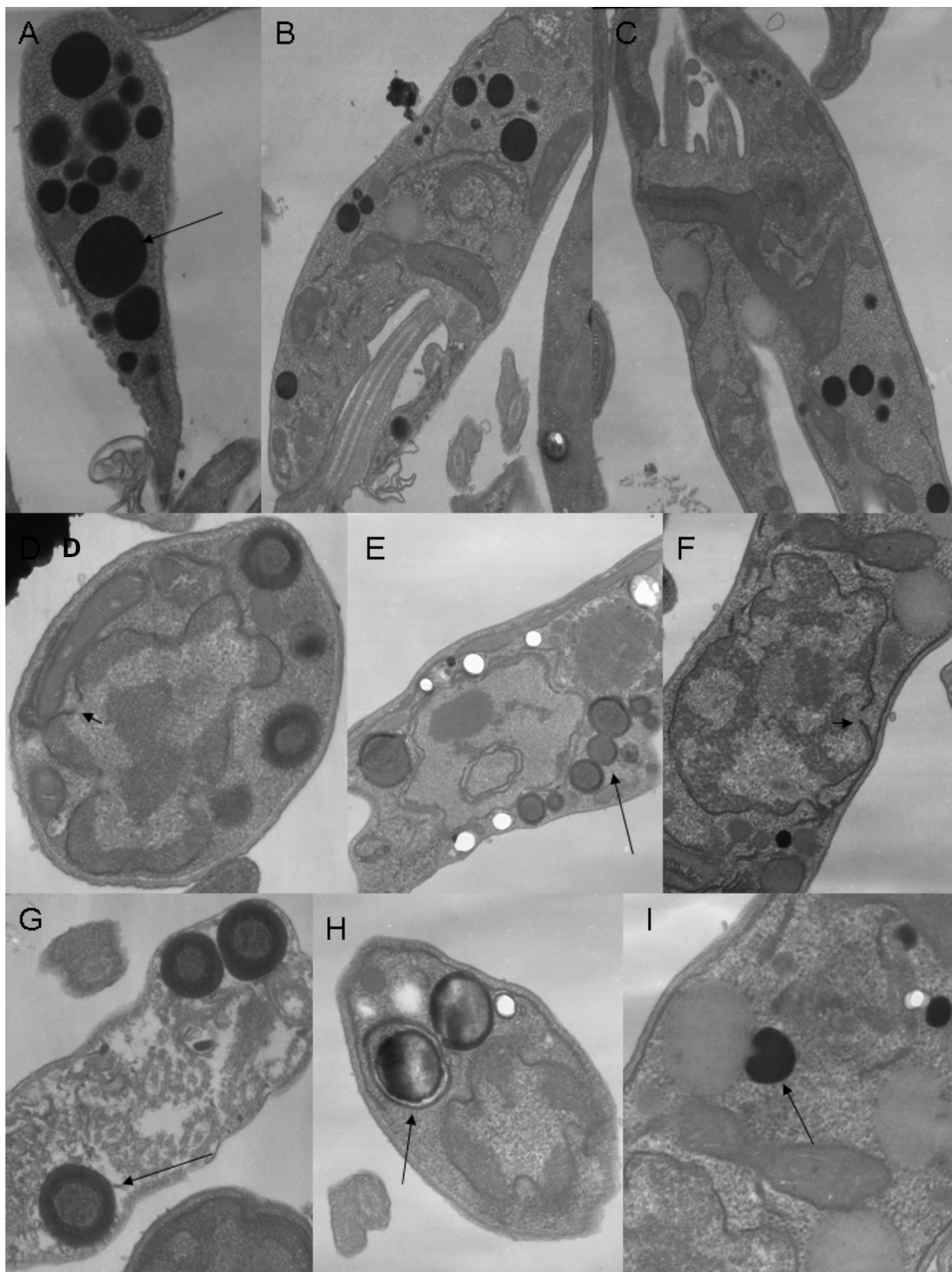


	<i>Leishmania amazonensis</i>	Macrófagos
MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	$372 \pm 0,65$	$540 \pm 0,06$
IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	$150 \pm 0,65$	$174 \pm 0,06$

**Tabela 3.** Avaliação da atividade antileishmania e efeito citotóxico do extrato aquoso de *S. latex*. Para avaliar a capacidade do extrato em inibir o crescimento de *L. amazonensis* e citotoxicidade em macrófagos foi realizado teste como descrito em material e métodos. Os resultados refletem a média de três experimentos  $\pm$  erro padrão.

### 5.3 – Efeito do extrato aquoso de *Stoeba latex* sobre a ultraestrutura de promastigotas de *L. amazonensis*

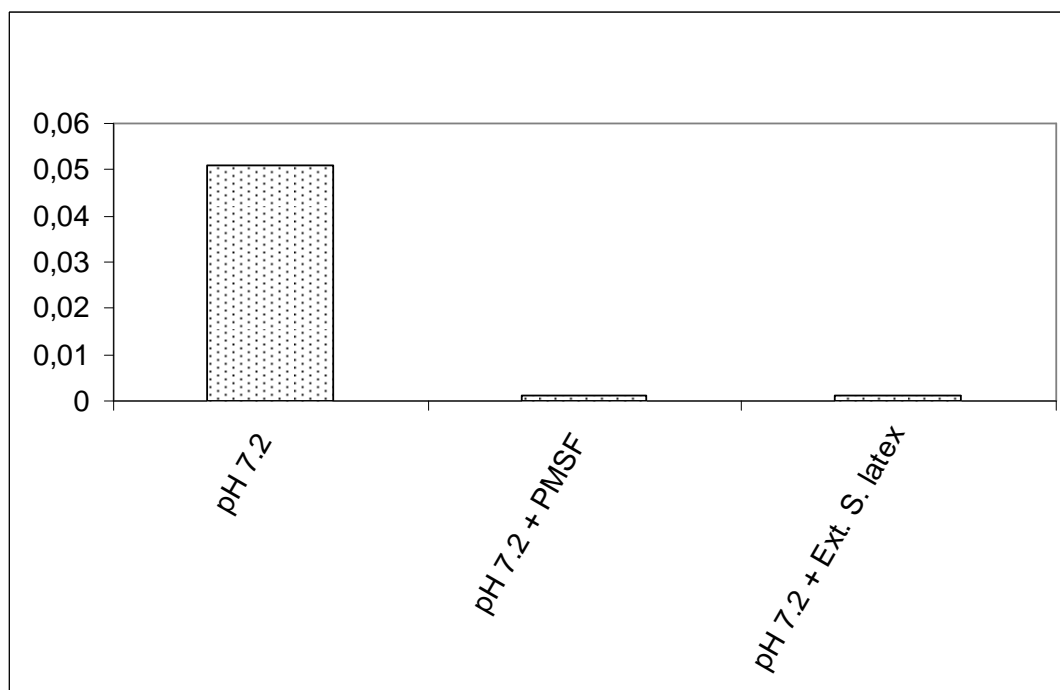
Dentre os diferentes extratos de esponjas testados, o extrato aquoso de *S. latex* foi o que apresentou efeito relevante sobre a inibição da viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis*. A partir desses resultados, realizamos a análise ultraestrutural através de microscopia eletrônica de transmissão, com a finalidade de evidenciar possíveis alterações causadas por este extrato, quando utilizado na concentração de 150  $\mu\text{g/ml}$  (IC<sub>50</sub>). Os resultados obtidos mostraram perturbações na morfologia celular, tais como: a descontinuidade da membrana nuclear (Figura 3 D e F) e o condensamento da cromatina (Figura 3 D), além de mudanças na elétron densidade dos acidocalcissomas (Figura 3 E, G, H e I). Os resultados são mostrados na Figura 3.



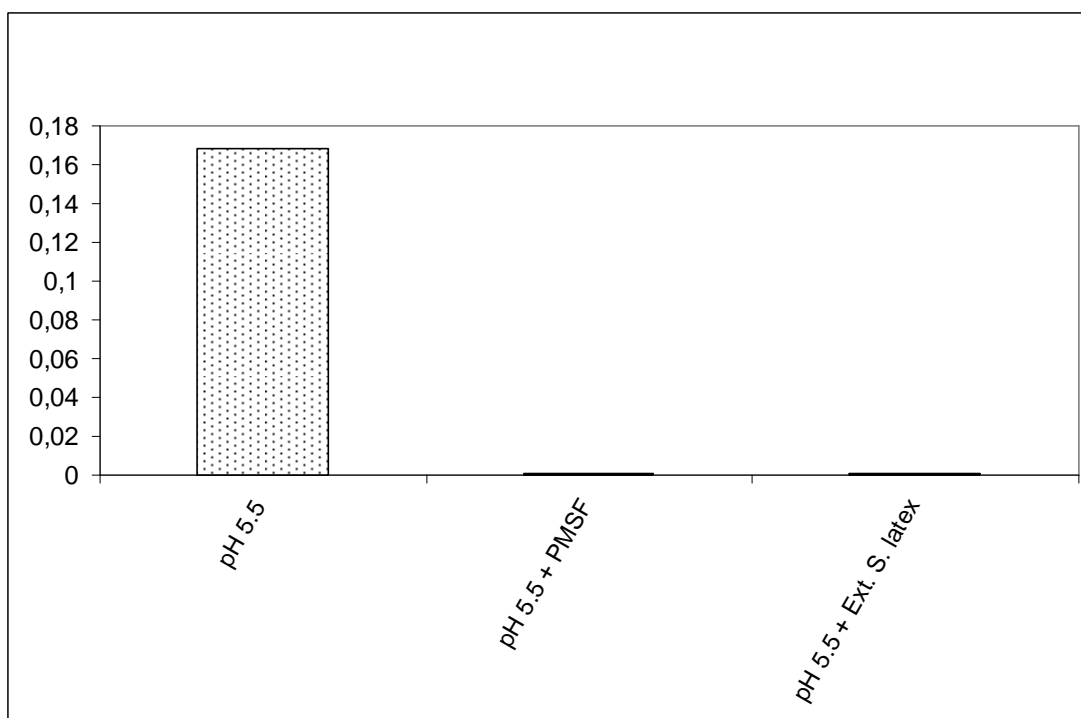
**Figura 3.** Análise por microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. amazonensis* tratados ou não com extrato aquoso de *S. latex*. As células controle (A-C) foram cultivadas por 120 h a 26 °C sem adição do extrato. Nas células tratadas, os promastigotas foram cultivados por 120 h à 26°C na presença de 150 µg/ml do extrato aquoso de *S. latex* (D-I), e então processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Note: setas menores: descontinuidade da membrana nuclear; setas maiores: acidocalcissomas (controle) e perda de elétron densidade nos acidocalcissomas (tratado).

#### 5.4 – Efeito do extrato aquoso de *S. latex* sobre proteases de *L. amazonensis*

A análise do efeito do extrato sobre as proteases celulares mostrou que quando 10 µg de proteína do extrato celular foi incubado em tampão fosfato pH 5,5 observamos inibição em torno de 100%, semelhante ao sistema com PMSF, inibidor de serina protease. Resultado semelhante foi obtido em pH 7,2. Os resultados são mostrados nos Gráficos 4 e 5.



**Gráfico 4.** Efeito extrato aquoso de *Stoeba latex* sobre proteases celulares de *L. amazonensis*. O extrato celular foi obtido como descrito em materiais e métodos. O extrato celular foi incubado com BSA em PBS pH 7,2 por 6 h a 37°C na ausência ou presença de PMSF 1 mM, e extrato aquoso de *S. latex*. Os valores da atividade proteolítica, expressos em unidades arbitrárias (UA),  $p < 0,05$ .



**Gráfico 5.** Efeito extrato aquoso de *Stoebea latex* sobre proteases celulares de *L. amazonensis*. O extrato celular foi obtido como descrito em materiais e métodos. O extrato celular foi incubado com BSA em tampão fosfato pH 5,5 por 6 h a 37°C na ausência ou presença de PMSF 1 mM, e extrato aquoso de *S. latex*. Os valores da atividade proteolítica, expressos em unidades arbitrárias (UA),  $p < 0.05$ .

A análise do perfil protéico dos lisados de promastigotas controle e tratado mostrou diferenças em proteínas de médio e baixa massa molecular. Proteínas na faixa de 40 kDa, 21 kDa e 10 kDa tiveram sua expressão diminuída. Os resultados são mostrados na Figura 4.

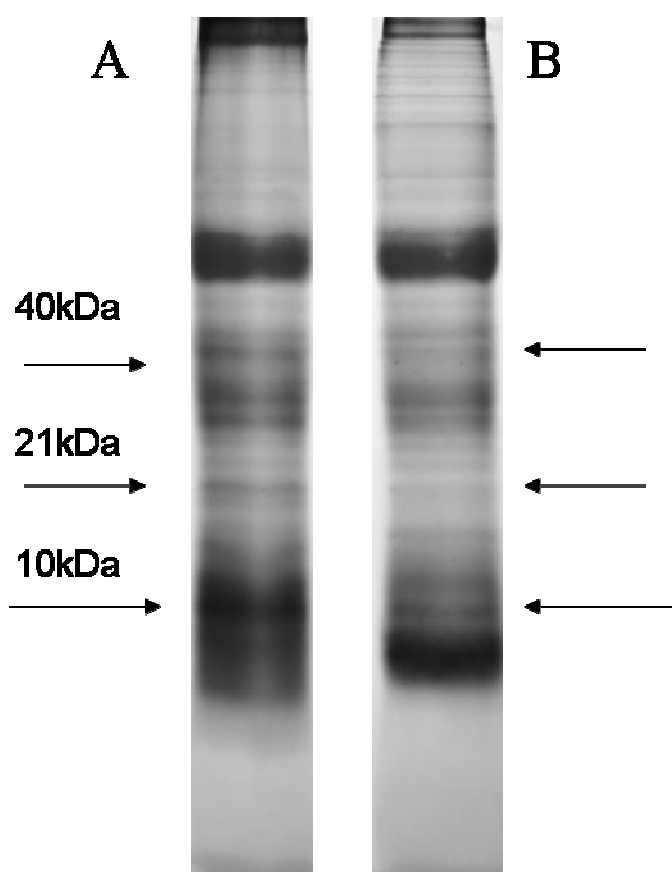
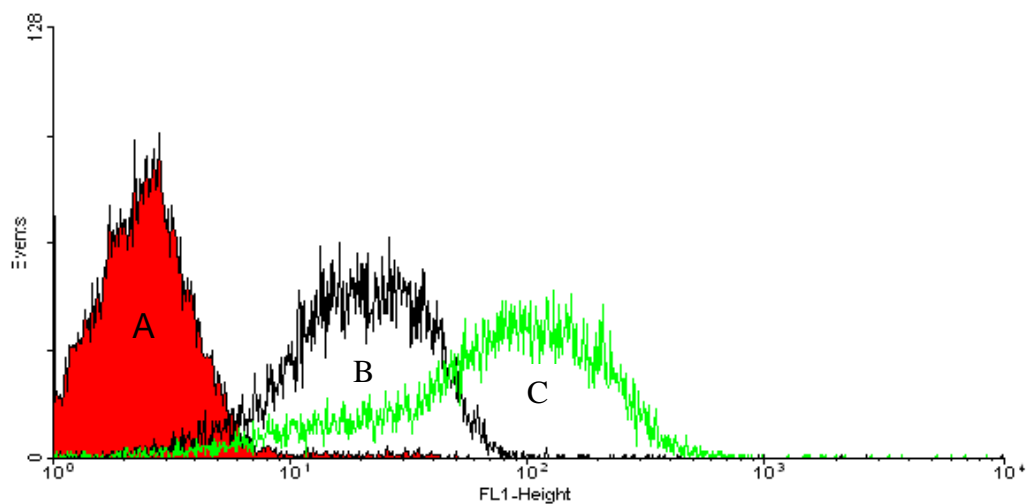


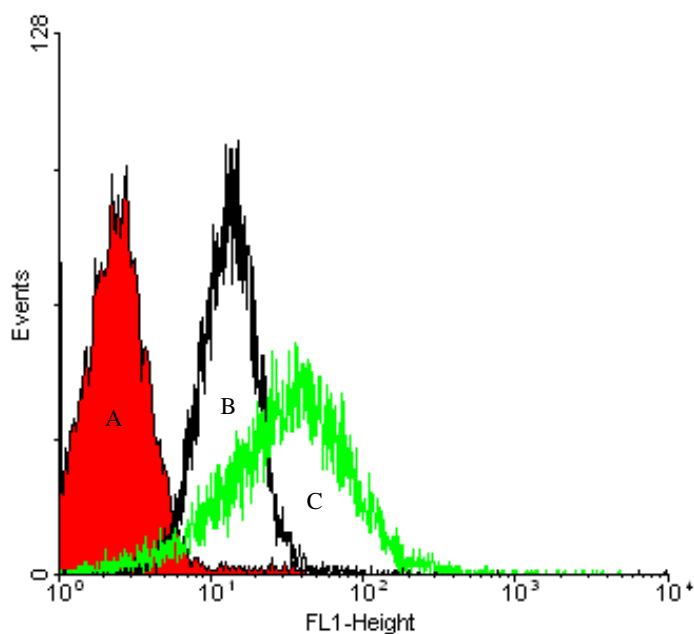
Figura 4: SDS-PAGE mostrando o perfil protéico total de parasitos crescidos por 72 h na ausência ou na presença de 150µg/ml do extrato aquoso de *S. latex*. Utilizou-se 30µg de proteína referente ao extrato celular obtido como descrito em materiais e métodos e os géis foram corados com solução de nitrato de prata. A – controle, B – tratado.

A citometria de fluxo revelou o aumento da expressão de gp63 (Figura 5C) e cisteína protease b (Figura 6C), quando comparamos parasitos controle com parasitos

crecidos na presença de 150  $\mu\text{g/ml}$  do extrato aquoso de *S. latex*. Os resultados são mostrados nas Figuras 5 e 6.



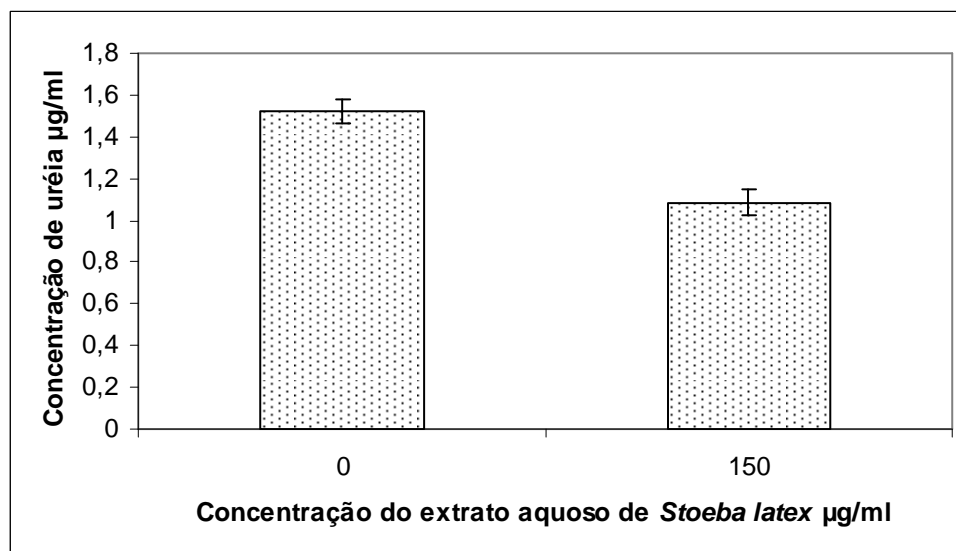
**Figura 5.** Análise de citometria de fluxo mostrando a ligação de anti- GP63 à superfície celular de *L. amazonensis*. (A) Autofluorescência. (B) Células cultivadas na ausência do extrato. (C) Células cultivadas na presença do extrato. Os protozoários foram crescidos em meio Schneider à  $26^{\circ}\text{C}$  por 72 horas na presença de 150  $\mu\text{g/ml}$  do extrato como descrito em materiais e métodos. O eixo vertical representa o número de células analisadas enquanto o horizontal a intensidade de fluorescência.



**Figura 6.** Análise de citometria de fluxo mostrando a ligação de anti-cpb à superfície celular de *L. amazonensis*. (A) Autofluorescência. (B) Células cultivadas na ausência do extrato. (C) Células cultivadas na presença do extrato. Os protozoários foram crescidos em meio Schneider à  $26^{\circ}\text{C}$  por 72 horas na presença de 150  $\mu\text{g/ml}$  do extrato como descrito em materiais e métodos. O eixo vertical representa o número de células analisadas enquanto o horizontal a intensidade de fluorescência.

### 5.5. – Análise do efeito do extrato sobre atividade da enzima arginase

Foi analisada a atividade da enzima arginase em parasitos crescidos na ausência e na presença do IC<sub>50</sub> do extrato. Observamos que o tratamento foi capaz de reduzir em 28,66% a atividade da enzima. Os resultados são mostrados no Gráfico 8 e mostram a quantidade de uréia em µg/mL após 30 minutos de hidrólise de L-arginina pelos extratos celulares correspondentes a 10<sup>8</sup> parasitos controle e tratado.



**Gráfico 8.** Efeito do extrato aquoso de *S. latex* na atividade da enzima arginase em promastigotas de *L. amazonensis*. Os protozoários foram crescidos em meio Schneider à 26<sup>o</sup>C por 72 horas na presença de 150 µg/ml do extrato como descrito em materiais e métodos. Depois desse tempo, os protozoários foram lavados, lisados e foi realizada a dosagem da atividade da enzima arginase como descrito no item 4.7. Os valores representam as médias +/- erros padrão de três experimentos diferentes, realizados em triplicata.

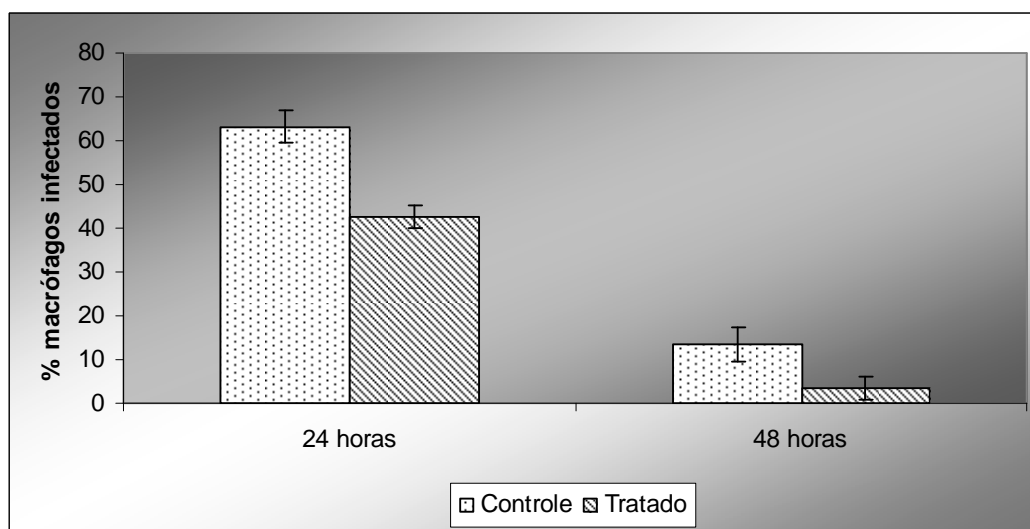
### 5.6 – Análise do efeito do extrato aquoso de *S. latex* na interação *Leishmania*- macrófago

Buscando observar o efeito do extrato aquoso de *Stoebea latex* na interação parasito-célula hospedeira, foi realizado um ensaio utilizando promastigotas pré-tratados com o IC<sub>50</sub> do extrato (150 µg/ml) por 1 hora antes e colocados posteriormente

em contato com macrófagos peritoneais de camundongo Balb-C. Não foram observadas alterações significativas no percentual de macrófagos infectados, índice endocítico e no percentual de parasitos por macrófago, mostrando que o extrato testado não exerce influência na interação *Leishmania*-macrófago.

### 5.7 – Análise do efeito do extrato aquoso de *S. latex* sobre amastigotas intracelulares (Pós-tratamento)

Objetivando a análise do efeito do extrato sobre amastigotas intracelulares, foi realizado experimento de pós-tratamento de macrófagos infectados. Os macrófagos infectados foram tratados por 24 e 48 h com o extrato aquoso de *S. latex* e observa-se a redução de 32,6% do percentual de infecção em 24 horas. A incubação por 48 horas não ocasionou alterações significativas. Os resultados são mostrados no gráfico 7.



**Gráfico 7.** Efeito do extrato aquoso de *S. latex* sobre amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongo. Os percentuais de macrófagos infectados em 24 e 48 de tratamento com o extrato da esponja foram calculados como descrito nos materiais e métodos. Os valores representam as médias +/- erros padrão de três experimentos diferentes, realizados em triplicata.



## 6. Discussão

Aproximadamente 350 milhões de indivíduos residem em áreas com risco de contrair leishmaniose, anualmente é estimado que 1,5 a 2 milhões de adultos e crianças desenvolvem a doença sintomática e ocorram 70000 mortes por ano. É uma doença negligenciada e um problema de saúde pública nos países pobres (DAVID & CRAFT, 2009). A co-infecção *Leishmania*-HIV surge como fator preocupante, já que a diversidade quanto ao comportamento clínico e imunológico e a recidiva da doença destes pacientes influi de maneira decisiva na terapia (SAMPAIO *et al.*, 2002).

Ao longo dos anos, produtos naturais têm um papel importante no processo de descoberta de novas drogas. Extratos de plantas e moléculas quimicamente definidas de origem vegetal têm mostrado atividade leishmanicida (ROCHA *et al.*, 2005) e embora grande parte das pesquisas de novos compostos contra agentes infecciosos derivem de produtos naturais de plantas (ALVIANO & ALVIANO, 2009) a possibilidade da utilização de produtos naturais marinhos são bastante promissores e corroboram com estudos prévios de outros autores (LAPORT *et al.*, 2009).

Alterações na membrana nuclear e cromatina, além de significativas modificações nos acidocalcissomos foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão, quando os parasitos foram tratados com 150 $\mu$ g/mL do extrato aquoso de *Stoebe latex*. Cabe ressaltar que as concentrações obtidas para valores de MIC (372  $\mu$ g/ml) e IC<sub>50</sub> (150  $\mu$ g/ml) estimulam os esforços para purificação do extrato e testes com os componentes isolados.

Muitas funções tem sido atribuídas aos acidocalcissomos como estocagem de compostos de alta energia, cálcio e outros cátions, além de regulação do pH e osmolaridade celular (MORENO & DOCAMPO, 2003). A descoberta de novas

enzimas nesta organela que estão ausentes em células de mamíferos abre espaço para exploração de função e estrutura dos acidocalcissomos e sugere um novo alvo potencial para ação de drogas no combate a doenças parasitárias (DOCAMPO & MORENO, 2008). Vannier-Santos e colaboradores (1999) demonstraram que inibidores da síntese do ergosterol tinham efeito direto sobre a estrutura desta organela como aumento de volume, ligação com retículo endoplasmático e mudanças na elétron densidade. Rodrigues e colaboradores (2002) mostraram aumento no número destas organelas quando promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* eram tratados com 22-26 azasterol, inibidor de uma enzima da via sintética do ergosterol.

Os acidocalcissomos pertencem a uma classe de organelas relacionadas aos lisossomos e interferências na aquisição ou modelagem de esfingolípídios causam mudanças na biogênese destas organelas em formas amastigotas e podem intervir na sobrevivência destas formas na célula hospedeira (ZHANG *et al.*, 2005).

Estudos ultraestruturais com promastigotas *L. donovani* tratados com drogas complexadas a Ródio ( $Rh^{+3}$ ) mostraram alterações no núcleo do parasito como condensação da cromatina e estudos “in vivo” com estas mesmas drogas diminuíram a carga parasitária esplênica em ratos Wistar parasitados (RODRIGUEZ-CABEZAS *et al.*, 2001). Um estudo empregando formas tripomastigotas de *Trypanossoma cruzi* tratados com L-leucina-metilester mostrou um efeito de encolhimento da membrana nuclear e danos mitocondriais (ADADE *et al.*, 2007). O tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* com o óleo essencial de *Croton cajucara* mostrou alterações na organização nuclear e na cromatina do cinetoplasto (ROSA *et al.*, 2003). De uma forma geral o núcleo de protozoários se apresenta com uma membrana nuclear típica. No entanto, são relatadas peculiaridades como a manutenção da integridade desta membrana durante o processo de divisão, diferentemente do que ocorre com células de

mamíferos. Essas particularidades refletem em diferenças bioquímicas e moleculares em relação ao núcleo típico de células de mamíferos, constituindo dessa forma, um alvo potencial para drogas antiparasitárias (DE SOUZA, 2008).

No presente estudo foram observadas alterações na membrana nuclear sugerindo a descontinuidade da mesma, além de condensação da cromatina em regiões do núcleo, corroborando com o estudo de Kossuga e colaboradores (2008) que observaram o mesmo tipo de alteração quando *L. chagasi* foi tratada com compostos derivados da esponja marinha *Plakortis angulospiculatus* além da alteração da elétron densidade dos acidocalcissomos, o que poderia justificar, pelo menos em parte, a perda da viabilidade celular.

Proteases de micróbios patogênicos têm atraído a atenção de muitos laboratórios a respeito do seu papel na patogênese. Análises do efeito de drogas sobre as enzimas proteolíticas destes organismos podem suscitar o desenvolvimento de poderosos agentes quimioterápicos contra estes patógenos (MOTTRAN *et al.*, 2004; GRANDGENETT *et al.*, 2007).

A abundância de leishmaniolisina, uma metaloprotease expressa em ambas as formas, promastigotas e amastigotas de espécies do gênero *Leishmania* tem sido relacionada com importantes funções no curso da leishmaniose. Ela atua como mediadora da ligação de promastigotas com macrófagos, ligante de receptores de macrófagos e receptores para fibronectina (YAO, 2010).

Outro fator de virulência inclui as cisteína proteases que tem atraído atenção pela sua relevância em atividades vitais para o parasito como a destruição de proteínas do hospedeiro, nutrição e neutralização da resposta imune (MOTTRAM *et al.*, 2004). Amastigotas promovem um aumento da expressão de cisteína proteases lisossomais e a endocitose de proteínas do lúmen ou da membrana limitante do fagolisossomo do

hospedeiro, tendo desta forma uma fonte alternativa de aminoácidos. Parasitos mutantes para cisteína proteases lisossomais tiveram sua virulência atenuada sustentando, desta forma o papel destas proteínas na aquisição de nutrientes (NADERER & MCCONVILLE, 2008).

No presente estudo, observamos o aumento da expressão de gp63 e cisteína protease b em promastigotas crescidos na presença de 150 µg/ml do extrato aquoso de *S. latex*. O aumento da expressão de ambas as enzimas, apesar dos danos causados nas células, pode funcionar como um processo compensatório, mantendo os níveis de interação com os macrófagos, no entanto sendo incapaz de manter a sobrevivência intracelular.

Outros trabalhos demonstram que o tratamento com drogas pode afetar organelas, enzimas ou pontos chave do metabolismo celular com o aumento da expressão de outras moléculas como um sistema de equilíbrio (AYRES *et al.*, 2007; BRENZAN *et al.*, 2007).

Silva-Lopez e colaboradores caracterizaram em 2005 uma serina protease secretada por *L. amazonensis* e sugeriram que esta enzima estaria envolvida na sobrevivência do parasito no interior da célula hospedeira, já que ela era capaz de hidrolisar fibrinogênio, colágeno e hemoglobina, indicando que ela estaria implicada na aquisição de hemina pelo parasito. Este mesmo grupo mostrou, que um inibidor de serina protease obtido de uma anêmona do mar foi capaz de afetar a viabilidade dos promastigotas de *L. amazonensis* (SILVA-LOPEZ *et al.*, 2007).

Choudhury e colaboradores (2009) identificaram, purificaram e caracterizaram uma serina protease de 115 kDa em promastigotas de *L. donovani*, com pH ótimo 7,5 porém tendo atividade numa faixa de pH que variava entre 5,0 e 9,0. Este mesmo grupo mostrou a localização desta protease na bolsa flagelar, além de demonstrar que a

expressão desta enzima era diminuída quando os parasitos tinham sua virulência atenuada, sugerindo que esta protease exerça um papel na patogênese da leishmaniose visceral (CHOUDHURY *et al.*, 2010).

Quando se analisou a capacidade do extrato aquoso de *S. latex* modular a expressão de serina proteases, observou-se a inibição da atividade proteolítica do extrato celular de promastigotas em pH 5,5 e pH 7,2, com resultado semelhante ao da inibição causada por 10mM PMSF, um inibidor de serina proteases, o que sugere que o extrato tenha efeito direto sobre esta classe de protease. Entretanto, quando analisamos a possível modulação de ectoenzimas, como a gp63 e cisteína proteases, em promastigotas crescidas também na presença de IC<sub>50</sub> do extrato, observamos um aumento da expressão da metaloprotease e da “cpb-like”, enzimas sabidamente importantes para o estabelecimento da infecção e manutenção do parasito no interior da célula hospedeira.

A habilidade de sobreviver e se multiplicar nos macrófagos é característica de diversos agentes infecciosos incluindo *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*. Na tentativa de sustentar a infecção crônica, os parasitos subvertem a atividade de células de defesa e impedem o desenvolvimento de uma imunidade protetora (ALEXANDER *et al.*, 2002). O mecanismo mais importante de eliminação de *Leishmania* e controle da infecção é a produção de NO pelos macrófagos (HOLZMULLER *et al.*, 2006). É postulado que em *Leishmania* a atividade da arginase pode modular a atividade da enzima óxido nítrico sintase, já que a L-arginina é um substrato comum a atividade das duas enzimas (BOUCHER *et al.*, 1999; WANASEN & SOONG, 2008).

Como resultado observamos a inibição parcial da atividade da enzima arginase, um alvo potencial para o desenvolvimento de drogas para o controle da leishmaniose, uma vez que Iniesta e colaboradores (2001) mostraram que a inibição desta atividade

enzimática foi capaz de controlar a infecção celular em macrófagos infectados com *L. major* e *L. infantum*.

Existem algumas possíveis explicações para o efeito do extrato aquoso sobre formas amastigotas intracelulares, já que observamos alterações em importantes fatores que permitem a sobrevivência do parasito no interior do macrófago. A atividade de arginase, como demonstrado por Kropf e colaboradores (2005), atividade de serina proteases, bem como alterações nos acidocalcissomos, organelas importantes para homeostase do parasito (ZHANG *et al*, 2005).

Foi demonstrada a presença de terpenos, mais especificamente um furanosesterterpenóide em *Stoebea extensa*, outra espécie do gênero (LIU *et al.*, 2007). Mikus e colaboradores (2000) demonstraram que terpineno-4-ol foi mil vezes mais tóxico para *Trypanossoma brucei* do que para células humanas da linhagem HL-60, além de estudos com nerolidol, um sesquiterpeno que foi capaz de inibir o crescimento “in vitro” de promastigotas *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* e amastigotas de *L. amazonensis* e inibir a biossíntese de isoprenóides (ARRUDA, 2005).

Desta forma, nossos resultados se somam a outros trabalhos que buscam em produtos naturais originados de plantas e animais marinhos novas fontes de compostos com atividade antimicrobiana (BRAGA *et al.*, 2007; DUBE *et al.*, 2007; PASSERO *et al.*, 2007; ROSA *et al.*, 2003). Todavia mais estudos são requeridos a fim de investigar o efeito dos componentes isolados do extrato e a sua possível aplicação como terapia alternativa, isoladamente ou em conjunto com fármacos já empregados na clínica.

## 7. Conclusão

De acordo com os resultados, podemos concluir que:

1 – O extrato aquoso de *Stoeba latex*, quando comparado com o extrato aquoso de *Hymeniacion heliophila* e com os extratos etanólicos de *Petromica citrina*, *Polymastia janeirensis*, *Geodia corticostilyfera*, *Agelas sventres*, *Agelas díspar*, *Holoxea* sp. foi eficaz em inibir o crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis*;

2 – O extrato aquoso de *Stoeba latex* alterou a ultraestrutura do parasito, causando diminuição da elétron-densidade do acidocalcissomo;

3 - O extrato aquoso de *Stoeba latex* inibiu o crescimento de amastigotas intracelulares, não tendo, contudo efeito na interação parasito-macrófago;

4 - O extrato aquoso de *Stoeba latex* inibiu a atividade de serina proteases;

5 - A expressão da gp63 e cpb-like por promastigotas de *L. amazonensis* tratados com extrato aquoso de *S. latex* foi maior quando comparada com os parasitos sem tratamento;

6 - O extrato aquoso de *Stoeba latex* foi capaz de inibir a atividade da enzima arginase.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M.J.; GUERRA, J.A.; BERMEJO, P.; IRURZUN, A.; CARRASCO, L. Search for antiviral activity in higher plant extracts. **Phytotherapy Research**, vol. 14, n. 8, p. 604-607, 2000.

ADADE, C.M.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; DE CASTRO, S.L.; SOARES, M.J. Effect of L-leucine methylester on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**. Vol.101, n. 1, p. 69-79, 2007.

ALEXANDER, J. COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a T Helper 1 (Th1) response. **Journal of Immunology**. Vol. 161, p. 6794-6801, 1998.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSEL, D.G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**. Vol.112, p. 2993-3002, 2002.

ALVES, C.R.; CORTE-REAL, S.; BOURGUIGNON, S.C.; CHAVES, C.S.; SARAIVA, E.M.B. *Leishmania amazonensis*: early proteinases activities during promastigote-amastigote differentiation in vitro. **Experimental Parasitology**. Vol. 109, n. 1, p. 38-48, 2005.



ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S. Plants extracts search for new alternatives to treat microbial diseases. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. Vol. 10, p. 106-121, 2009.

ANTOINE, J.C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends Microbiology**. Vol. 6, n. 10, p. 392-401, 1998.

ARAÚJO, A.P.U.; BOSSOLAN, N.R.S. Noções de taxonomia e classificação: Introdução a zoologia. Instituto de Física de São Carlos. **Universidade de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.ifsc.usp.br>> Acesso em 04 mar 2008.

ARRUDA, D.C.; D'ALEXANDRI, F.LATZIN, A.M.; ULIANA, S.R.B. Antileishmanial activity of the terpene Nerolidol. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**. Vol. 49, n.5, p. 1679-1687, 2005.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**. Vol. 30, p. 1262-1281, 2000.

AYRES, D.C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Vol. 102, n.2, p. 215-220, 2007.

AZZOUZ, S.; MAACHE, M.; GARCIA, R.G.; OSUNA, A. Leishmanicidal activity of Edelfosine, Mitelfosine and Ilmofosine. **Pharmacology & Toxicology**. Vol.96, n. 1, p. 60-65, 2005.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. Vol.7, n.3, p.328-337, 2004.

BERLINCK, R.G.S.; HAJDU, E.; ROCHA, R.M.; OLIVEIRA, J.H.H.; HERNADEZ, I.L.C.; SELEGHIM, M.H.R.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; CAVALCANTO, B.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; THIEMANN, O.; SILVA, M.; SOUZA, A.O.; SILVA, C.L.; MINARINI, P.R.R. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, vol.67, p. 510-522, 2004.

BERMAN, J.D.; Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**. Vol. 24, p. 684-703, 1997.

BISAGGIO, D.F.R.; ADADE, C.M.; SOUTO-PADRÓN, T. In vitro effects of suramin on *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Vol. 31, p. 282-286, 2008.

BOUCHER, J.L., MOALI,C. AND TENU, J.P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. **Cell Mol Life Sci.** Vol. 55, n. 8-9, p. 1015-1028, 1999.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology.** Vol. 11, p. 396-402, 2007.

BRENZAN, M.A.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; UEDA-NAKAMURA, T; YOUNG, M.C.M.; CORTEZ, D.A.G.; Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research.** Vol. 101, p. 715-722, 2007.

BRUSCA, R.C; BRUSCA, G.J. **Invertebrados.** 2.ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

BRYSON, K.; BESTEIRO, S.; MCGACHY, H.A.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.; ALEXANDER, J. Overexpression of natural inhibitor of cysteine peptidases in *Leishmania mexicana* leads to reduce virulence and a Th1 response. **Infection and Immunity.** Vol. 77, n. 7, p. 2971-2978, 2009.

BUROKER-KILGORE, M; WANG, K.K. A Comassie brilliant blue G-250 based colorimetric assay for measuring activity of calpain and other proteases. **Analytical Biochemistry**. Vol. 208, n.2, p. 387-392, 1993.

CHOU DHURY, R.; BHAUMIK, S. K.; DE, T.; CHAKRABORTI, T. Identification, purification and characterization of a secretory serine protease in an Indian strain of *Leishmania donovani*. **Molecular and Cellular Biochemistry**. Vol. 320, p. 1-4, 2009.

CHOU DHURY, R; DAS, P.; BHAUMIK, S.K.; DE, T. CHAKRABORTI, T. *Leishmania donovani*: In situ immunolocalization and stage dependent expression of a secretory serine protease and its role as vaccine candidate. **Clinical and vaccine immunology**, Vol. 27, 2010.

COELHO, A.C.; TOSI, L.R.O. COTRIM, P.C. Mapping of a *Leishmania* major gene/locus that confers Pentamidine resistance by deletion and insertion of transposable element. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. Vol.46, n. 2, p. 109-112, 2004.

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

CUEVAS, I.C.; CASULO, J.J.; SANCHEZ, D.O. gp 63 Homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a

possible role in host cell infection. **Infection and Immunity**. Vol. 71, n. 10, p. 5739-5749, 2003.

DA SILVA, A.C.; KRATZ, J.M.; FARIAS, F.M.; HENRIQUES, A.T.; SANTOS, J.; LEONEL, R.M.; LERNER, C.; MOTHE, B.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. In vitro antiviral activity of marine sponges collected off Brazilian coast. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. Vol.29, n. 1, p. 135-140, 2006.

DA SILVA, E.R.; CASTILHO, T.M.; PIOKER, F.C.; TOMICH DE PAULA SILVA, C.H.; FLOETER-WINTER, L.M. Genomic organization and transcription characterization of the gene encoding *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction. **International Journal of Parasitology**. Vol. 32, n.6, p. 727-737, 2002.

DAVID, C.V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatology therapy**, Vol. 22, p. 491-502, 2009.

DE SOUZA, W. A introduction to the structural organization of parasitic protozoa. **Current Pharmaceutical Design**, Vol. 14, p. 822-838, 2008.

DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. **Current Pharmaceutical Design**. Vol. 14, p. 882-888, 2008.

DONIA, M.; HAMMAN, M.T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **Lancet Infectious diseases**. Vol. 3, n. 6, p. 338-348, 2003.

DUBE, A.; SINGH, N.; SAXENA, A.; LAKSHMI, V. Antileishmanial potential of a marine sponge *Haliclona exigua* (Kirkpatrick) against experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**. Vol. 101, p. 317-324, 2007.

FAUCI, A.S. Host factors and the pathogenesis of HIV – induced disease. **Nature**. Vol.384, p. 529-534, 1996.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Product Report**. Vol.17, p. 7-55, 2001.

FURTADO, T. Critérios para o diagnóstico de Leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Vol. 55, n. 2, p. 81-86, 1980.

GONÇALVES, A.M.; NEHME, N.S.; MOREL, C.M. **Genes, antigens and parasites**. Carlos Morel (ed.), Rio de Janeiro, p. 106-107, 1984.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Vol.36, n.1, p.71-80, 2003.

GRANDGENETT, P.M.; OTSU, K.; WILSON, H.R.; WILSON, M.E.; DONELSON, J.E. A function for a specific zinc metalloprotease of African Trypanosomes. **PLOS Pathogens**. Vol. 3, n. 10, p. 150, 2007.

GRIMALDI, G. J.; TESH, R.B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Vol.41, n.6, p. 687-725, 1989.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**. Vol.14, p. 229-234, 2001.

HEPBURN, N.C. Cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**. Vol.25. p. 363-370, 2000.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**. Vol.354, p. 1191-1199, 1999.

HOLZMULLER, P.; BRAZ-GONÇALVES, R.; LEMESRE, J.L.; Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**. Vol. 132, p. S19-S32, 2006.

INIESTA, V.; CARCELÉN, J.; MOLANO, I.; PEIXOTO, P.M.V.; REDONDO, E.; PARRA, P.; MANGAS, M.; MONROY, I.; CAMPO,M.L.; NIETO,C.G.; CORRALIZA, I. Arginase I induction during *Leishmania major* infection

mediates the development of disease. **Infection and Immunity**. Vol. 73, n. 9, p. 6085-6090, 2005.

INIESTA, V., GOMEZ-NIETO, L.C. AND. CORRALIZA, I The inhibition of arginase by N (omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. **J Exp Med**. Vol.193, n. 6, p. 777-84, 2001.

JECNA, L.; SVAROSKA, A.; BESTEIRO, S.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H.; VOLF, P. Inhibition of cysteine peptidase does not influence the development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomia longipalpis*. **Journal of Medical Entomology**. Vol. 46, n. 3, p. 605-609, 2009.

KANYO, Z.F.; SCOLNICK, L.R.; ASH, D.E.; CHRISTIANSON, D.W.; Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. **Nature**. vol. 383, p. 554-557, 1996.

KHOSHGOO, N.; ZAHEDIFARD, F.; AZIZI, H.; TASLIMI, Y.; ALONSO, M.J.; RAFATI, S. Cysteine proteinase type III is protective against *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice and highly antigenic in visceral leishmaniasis individuals. **Vaccine**. Vol. 26, p. 5822-5829, 2008.

KOSSUGA, M.H.; NASCIMENTO, A. M.; REIMÃO, J.Q.; TEMPONE, A.G.; TANIWAKI, N.N.; VELOSO, K.; FERREIRA, A.G.; CAVALCANTI, B.C.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; MAYER, A.M.S.; HAJDU, E.; BERLINCK, R.G.S. Antiparasitic, antineuroinflammatory, and cytotoxic polyketides from the



marine sponge *Plakortis angulospiculatus* collected in Brazil. **Journal of Natural Products**. Vol.71, n. 3, p. 334-339, 2008.

KROPF, P.; FUENTES, J.M.; FÄHNRIK, E.; ARPA, L.; HERATH,S.; WEBER,V.; SOLER, G.; SELADA, A.; MODOLELL,M.; MÜLLER, I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **The Faseb Journal**. Vol. 19, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**. Vol. 227, p. 680-685, 1970.

LAPORT, M.; SANTOS, O.C.S.; MURICY, G. Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. Vol. 10, p. 86-105, 2009.

LEGARÉ, D. RICHARD, D.; MUKHOPADHAY, R.; STIERHOF, Y.D.; ROSEN, B.P.; HAIMER, A.; PAPADOUPOLOU, B.; OUELLETTE, M. The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular Metal-thiol transporter ATPase. **The Journal of Biological chemistry**. Vol 276, n.28, p. 26301-26307, 2001

LIMA, E.B.; PORTO, C.; MOTTA, J.O.C.; SAMPAIO, R.N. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Vol.82, n.2, p. 111-124, 2007.

LIU, Y.; ZHANG, S.; ; HUNG, J.H.; XU, T. Bioactive funosesterterpenoids from marine sponges. **Topics in heterocyclic chemistry**. Vol. 11, p. 231-258, 2007.

LOWRY, O.H.; ROZEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. Vol. 193, p. 265-275, 1951.

MAAROU, M.; LAWRENCE, F.; BROWN, S.; ROBERT-GERO, M. Biochemical alterations in paramomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes. **Parasitology Research**. Vol. 83, p. 198-202, 1997.

MALDONADO, M. Family Pachastrellidae Carter, 1875. In **Systema Porifera, a guide to classification of sponges** (ed. HOOPER, J.N.A.; VAN SOEST, R.W.M.). New York: Kluwer Academic Plenum Publishers, p. 141-162, 2002.

MANGALINDAN, G.C.; TALAUE, M.L.; CRUZ, L.J.; FRANZBLAU, S.G.; ADAMS, L.B.; RICHARDSON, A.D.; IRELAND, C.M.; CONCEPCIÓN, G.P. Agelasine F from a Philippine *Agelas* sp. Sponge exhibits *in vitro* antituberculosis activity. **Planta Medica**. Vol.66, p. 364-365, 2000.

MARCHÁN, E.M.; ARRIECHE, D.; HENRÍQUEZ, W.; CRESCENTE, O. Efecto *in vitro* de una sustancia alcaloidea aislada de *Amphimedon viridis* (Porifera) sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*. **Revista de Biología Tropical**. Vol.48, supl.1, p. 31-38, 2000.

MARINHO, F.A. **Indução de morte celular e inibição da interação de *Leishmania amazonensis* com macrófagos pelo inibidor de calpaínas MDL28170.** Rio de Janeiro: UFRJ, 2009. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2009.

MATLASHEWSKI, G. Leishmania infection and virulence. **Medical Microbiology and Immunology.** Vol.190, p. 37-42, 2001.

MAYRINK, W.; BOTELHO, A.C.C.; MAGALHÃES, P.A.; BATISTA, S.M.; LIMA, A.O.; GENARO, O.; COSTA, C. A.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; CAIAFFA, W.T.; NASCIMENTO, E.; MACHADO-COLEHO, G.L.L. Immunotherapy, immunochemoterapy and chemoterapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** Vol.39, n.1, p. 14-21, 2006.

MBONGO, N.; LOISEAU, P.M.; BILLION, M.A.; ROBERT-GERO, M. Mechanism os Amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy.** Vol. 42, n.2, p. 352-357, 1998.

McKERROW, J.H.; CAFFREY, C.; KELLY, B.; LOKE, P.; SAJID, M. Proteases in Parasitic Diseases. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of disease .vol.1,** p. 497-536, 2006.

MIKUS, J.; HARKENTHAL, M.; STEVERDING, D.; REICHLING, J. In vitro effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. **Planta Medica**, vol. 66, p. 366-368, 2000.

MORENO, S.N.; DOCAMPO, R. Calcium regulation in protozoan parasites. **Current Opinion in Microbiology**. Vol.6, p.4; 359-364, 2003.

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

MORAES, F.; MURICY, G. A new species of *Stoeba* (Demospongiae: Astrophorida) from oceanic islands off north-eastern Brasil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. Vol. 87, 9. 1387-1393, 2007.

MORGADO-DÍAZ, J.A.; SILVA-LOPEZ, R.E.; ALVES, C.R.; SOARES, M.J.; CORTE-REAL, S.; DE SIMONE, S.G. Subcellular localization of an intracellular serine protease of 68kDa in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Vol. 100, n. 4, p. 377-383, 2005.

MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology**. Vol. 7, p. 375-381, 2004.

MOURA, R.M.; QUEIROZ, A.F.S.; FOOK, J.M.S.L.L.; DIAS, A.S.F.; MONTEIRO, N.K.V.; RIBEIRO, J.K.C.; MOURA, G.E.D.D.; MACEDO, L.L.P.; SANTOS, E.A.; SALES, M.P. CvL, a lectin from marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology**. vol. 145, parte A, p. 517-523, 2006.

MURICY G, HAJDU E. **Porifera Brasilis**: guia de identificação das esponjas mais comuns do Sudeste do Brasil. Série Livros17, Museu Nacional, Rio de Janeiro, 2006.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

NADERER, T.; McCONVILLE, M.J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular Microbiology**. Vol. 10, n.2, p. 301-308, 2008

NADERER, T.; VINCE, J.E.; McCONVILLE, M.J. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. **Current Molecular Medicine**. Vol. 4, p. 649-665, 2004.

NEVES, D.P. Leishmaniose tegumentar americana . In. **Parasitologia humana**. 9.ed , São Paulo: Atheneu. p. 41-50, 1998.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**. Vol. 7, p. 257-266, 2004.

OUELLETTE, M.; LEGARÉ, D.; HAIMEUR, A.; GRONDIM, K.; ROY, G.; BROCHU, C. PAPADOPOULOU, B. ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. **Drug Resistance Updates**. Vol. 1, n.1, p. 43-48, 1998.

PALLASCH, T.J. Antifungal and antiviral chemotherapy. **Periodontology**. Vol.28, p. 240-255, 2002.

PAREDES, R.; MUÑOZ, J. DIAZ, I.; DOMINGO, P.; GURGUI, M. CLOTET, B. Leishmaniasis in HIV infection. **Journal of Postgraduate Medicine**, vol.49, p. 39-49, 2003.

PASSERO, L.F.D.; CASTRO, A.A.; TOMOKANE, T.Y.; KATO, M.J.; PAULINETTI, T.F.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D. Anti-leishmania activity of semi-purified fraction of *Jacaranda puberula* leaves. **Parasitology Research**. Vol. 101, p. 677-680, 2007.

POZIO, E. La highly active antiretroviral therapy e le infezioni protozoarie opportuniste. **Parassitologia**. Vol. 46, p. 89-93, 2004.

RAWLINGS, N.D.; TOLLE, D.P.; BARRETT, A.J. Evolutionary families of peptidases inhibitors. **Biochemical Journal**, vol. 378, n. 3, p. 705-716, 2004

REY, L. **Parasitologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

ROBERTS, S.C.; TANCER, M.J.; POLINSKY, M.R.; GIBSON, K.M.; HEBY, O.; ULLMAN, B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 279, n. 22, p. 23668-23678, 2004.

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S; MACÊDO, R.O.; BARBOSA-FILHO, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**.(2005), 12, 514-535.

RODRIGUEZ-CABEZAS, M.N.; MESA-VALLES, C.M.; AZZOUB, S.; MORALEDA-LINDEZ, V.; CRACIUNESCU, D.; GUTIERREZ-RIOS, M.T.; DE FRUTOS, M.I.; OSUN, A. In vitro and in vivo activity of new rhodium (III) complexes against *Leishmania donovani*. **Pharmacology**, Vol. 63, p. 112-119, 2001.

RODRIGUES, J.C.F. ATTIAS, M.; RODRIGUES, C.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a  $\Delta^{24-25}$ -sterol methyltransferase inhibitor on promastigote and

amastigote forms on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. Vol. 46, n. 2, p. 487-499, 2002.

ROSA, M.S.S.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; BIZZO, H.R.; RODRIGUES, I.A.; SOARES, R.M.A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.H.C.S. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, vol. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.

RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. 6.ed. São Paulo: Roca, 1996.

SACKS, D.L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental Parasitology**, vol.69, p.100-103, 1989.

SACKS, D.L.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**. Vol. 55, p. 453-483, 2001.

SADJI, M.; McKERROW, J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular Biochemistry Parasitology**. Vol.120, p. 1-21, 2002

SAMPAIO, R.N.R.; MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis unresponsive to pentavalent antimonial therapy successfully treated with ambisome. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. Vol. 91, p. 77-87, 1997.



SAMPAIO, R.N.R.; SALARO, C.P.; RESENDE, P.; PAULA, C.D.R. Leishmaniose tegumentar americana associada a AIDS: relato de quatro casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Vol. 35, n.6, p. 651-654, 2002.

SANTOS, A.L.S.; BRANQUINHA, M.H. D'ÁVILA-LEVI, C. The ubiquitous gp-63 like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Vol 78, n. 4, p. 687-714, 2006.

SANTOS, L.O.; MARINHO, F.A.; ALTOÉ, E.F.; VITORIO, B.S.; ALVES, C. R.; BRITTO, C.; MOTTA, M.C.M.; BRANQUINHA, M.H.; SANTOS, A.L.S.; D'ÁVILA-LEVI, C. HIV aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis* **PLOS One**. Vol.4, n. 3, p. 4918, 2009.

SAVOIA, D.; ALLICE, T.; TOVO, P.A. Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Vol. 26, p. 92-94, 2005.

SILVA-LOPEZ, R.E.; PINTO-COELHO, M.G.; DE SIMONE, G. Characterization of an extracellular serine protease of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**. Vol. 131, p. 85-96, 2005.

SILVA-LOPEZ, R.E.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; CHÁVEZ, M.A.; GIOVANNI-DE-SIMONE, S. Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. **Parasitological Research**. Vol. 101, p. 1627-1635, 2007.

SILVA, L.J.; CAMARGO-NEVES, V.L.F. As leishmanioses: uma visão para o clínico. **Prática hospitalar**. n. 36,p. 2010-2036, 2004.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**. Vol. 10, p.307-315, 2004.

STUART, K; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GURTLER, R.E; McKERROW, J; REED, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of the Clinical Investigation**. Vol.118, n.4, p. 1301-1310, 2008.

TRAUB-CSEKO, Y.M.; ALMEIDA, R.W.; BOUKAI, L.K.; COSTA-PINTO, D.; DUBOISE, S.M.; McMAHON-PRATT, D. Cysteine proteinases of *Leishmania*. **Ciência e Cultura**. Vol.45, n. 5, p. 339-342, 1993.

TIANEIRO, M.D.B.; HANIF, N.; VOODG, N.J.; VAN SOEST, R.W.M.; TANAKA, J. A new antimicrobial fatty acid from the calcareous sponge

*Paragrantia cf. waguensis*. **Chemistry and Biodiversity**. Vol. 6, p. 1374-1377, 2009.

VALDIVIESO, E.; DAGGER, F. RASCÓN, A. *Leishmania mexicana*: Identification and characterization of an aspartyl proteinase activity. **Experimental Parasitology**. Vol .116, n. 1, p. 77-82, 2007.

VANNIER-SANTOS, M.A.; MARTINY, A.; LINS, U.; URBINA, J.A.; BORGES, V.M.; DE SOUZA, W. Impairment of sterol biosynthesis leads to phosphorus and calcium accumulation in *Leishmania* acidocalcissomes. **Microbiology**, vol. 145, p. 3213-3220, 1999.

VANNIER-SANTOS, M.A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**. Vol 8, n.4, p. 297-318, 2002.

VINCENDEAU, P.; GOBERT, A.P.; DALOUEDE,S.; MOYNET, D.; MOSSALAYI, M.D. Arginases in parasitic diseases. **Trends in Parasitology**. Vol. 19, p. 9-12, 2003.

WANASEN, N.; SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. **Immunology Research**. Vol. 41, n. 1, p. 15-25, 2008.

WATTANADILOK, R.; SAWANGWONG, P.; RODRIGUES, C.; CIDADE, H.; PINTO, M.; PINTO, E.; SILVA, A.; KIJJOA, A. Antifungal activity evaluation of the constituents of *Haliclona baeri* and *Haliclona cymaeformis* , collected from the gulf of Thailand. **Marine Drugs**. vol. 5, p. 40-51, 2007.

YAO, C.; DONELSON, J.E.; WILSON, M.E. The major surface protease (MSP or gp63) of *Leishmania* sp. biosynthesis, regulation of expression and function. **Molecular and Biochemical Parasitology**. Vol. 132, p. 1-16, 2003.

YAO, C.; DONELSON, J.E.; WILSON, M.E. Internal and surface-localized major surface proteases of *Leishmania* spp. And their differential release from promastigotes. **Eukariotic Cell**. Vol.6, n.10. p.1905-1912, 2007.

YAO, C. Major surface protease of trypanosomatides: one size fits all? **Infection and Immunity**. Vol. 78, n.1, p. 22-31, 2010

YONEYAMA, K.A.G.; TANAKA, A.K.; SILVEIRA, T.G.V.; TAKAHASHI, H.K.; STRAUS, A.H. Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* membrane microdamains , and their role in macrophage infectivity. **Journal of Lipid Research**. Vol. 47, n. 10, p. 2171, 2006.

ZHANG, K.; HSU, F.F.; SCOTT D.A.; DOCAMPO, R.; TURK, J.; BEVERLEY, S.M. *Leishmania* salvage and remodeling of host sphingolipids in amastigote survival and acidocalcisome biogenesis. **Molecular Microbiology**. Vol. 55, n.5, p. 1566-1578, 2005.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)