



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

**AÇÃO DO 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL-GAMA-PIRONA, UM
METABÓLITO SECUNDÁRIO ISOLADO DE FUNGOS DO GÊNERO
ASPERGILLUS, SOBRE A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* E A
CÉLULA HOSPEDEIRA**

ANA PAULA DRUMMOND RODRIGUES

Biomédica

BELÉM – PARÁ - BRASIL

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**AÇÃO DO 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL-GAMA-PIRONA, UM
METABÓLITO SECUNDÁRIO ISOLADO DE FUNGOS DO GÊNERO
ASPERGILLUS, SOBRE A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* E A
CÉLULA HOSPEDEIRA**

ANA PAULA DRUMMOND RODRIGUES

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Curso de Mestrado, no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

Prof^a. Dr. Edilene Oliveira da Silva - Orientadora

BELÉM – PARÁ - BRASIL

2010

**AÇÃO DO 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL-GAMA-PIRONA, UM
METABÓLITO SECUNDÁRIO ISOLADO DE FUNGOS DO GÊNERO
ASPERGILLUS, SOBRE A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* E A CÉ-
LULA HOSPEDEIRA**

Por

ANA PAULA DRUMMOND RODRIGUES

Orientadora: **Prof.^a. Dr. Edilene Oliveira da Silva**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Curso de Mestrado, no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, sob avaliação da seguinte banca:

Membro: **Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma**,

Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Membro: **Prof. Dr. Cláudio Nahum Alves**,

Instituto de Ciências Exatas e Naturais, UFPA

Suplente: **Prof. Dr. Sanny Helena Valente De Oliveira Alberio**,

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UEPA

Belém – PARÁ, 23 de Fevereiro de 2010.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia e de Biologia Estrutural (LBE) do Instituto de Ciências Biológicas, em colaboração com o Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos do Instituto de Ciências Exatas e Naturais, ambos na Universidade Federal do Pará, com suporte financeiro das seguintes agências: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para financiamento da bolsa de mestrado e do Projeto de Cooperação Interinstitucional em Neurociências e Biologia Celular em Modelos Experimentais de Interesse na Região Amazônica e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem – Instituto do Milênio (INCTBEB de Biologia), sendo gerados um depósito de patente nacional (Nº protocolo: 000185/08), um depósito de patente internacional - EUA (Nº protocolo: PCT/BR2009/000254) e submissão de um manuscrito na *Cell Biology International* (Submissão em 28/01/2010).

"A alegria que se tem em pensar e aprender faz-nos
pensar e aprender ainda mais."

(Aristóteles)

A Deus por sempre iluminar meu caminho...
Aos meus pais e irmãos pela confiança, carinho e atenção...
Ao Luis, namorado, amigo e cúmplice.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Inês, por sua força e superação, exemplo em minha vida. Ao meu pai, José de Fátima, por sempre acreditar nos meus sonhos. Aos meus irmãos, Alexandre e Rodolfo, pelo apoio.

Ao meu namorado, Luis, um especial agradecimento, pelo carinho, atenção e dedicação durante todo o desenvolvimento deste trabalho. O seu apoio foi fundamental durante todos esses anos!

À Prof^a. Edilene, pela orientação e dedicação dispensada durante todos os anos de trabalho, por ter acreditado no meu potencial e, principalmente pela amizade cultivada.

Ao Prof^o. José Luiz do Nascimento, por permitir a utilização de equipamentos do Laboratório de Neuroquímica, pela atenção dispensada nos momentos de dúvidas e pelas conversas informais, mas de grande valia, no decorrer do trabalho.

Ao Dr. Alberdan Silva Santos, Cláudio Nahum e Antonio Sérgio, do Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos, por fornecer a droga utilizada no presente trabalho.

Ao Dr. Fernando Tobias Silveira, do Instituto Evandro Chagas pelo fornecimento das cepas de *Leishmania* utilizadas no trabalho.

Ao Heyder pela paciência e atenção dedicada durante a análise de todo o material processado no Laboratório de Biologia Estrutural e à Fernanda pela ajuda no processamento das amostras no LBE.

Ao Fábio, do laboratório de Citogenética, pelo auxílio para obtenção das imagens no microscópio de fluorescência.

Às estagiárias Raquel e Amanda pelos momentos alegres e descontraídos que passamos no laboratório, por me apoiarem e por contribuírem no desenvolvimento do trabalho.

Aos meus colegas de turma Nath, Camila e Guga companheiros da pós graduação, sempre presentes para trocar uma idéia.

Finalmente, a todos, que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 AS LEISHMANIOSES	2
1.1.1 Classificação.....	2
1.1.2 Morfologia.....	2
1.1.3 Ciclo	3
1.1.4 Aspectos Epidemiológicos.....	4
1.1.4 Aspectos Clínicos e Imunológicos da infecção por <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	5
1.2 A CÉLULA HOSPEDEIRA.....	6
1.3 A INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO.....	7
1.4 TRATAMENTOS.....	8
1.5 O ÁCIDO KÓJICO.....	10
2 JUSTIFICATIVA	13
3 OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO.....	15
4.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DA CÉLULA HOSPEDEIRA.....	15
4.3 OBTENÇÃO e diluição DO METABÓLITO HMP (5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona).....	15
4.4 ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	16
4.4.1 Atividade antipromastigota.....	16
4.4.2 Atividade antiamastigota	16
4.5 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM HMP PELO MÉTODO DO <i>THIAZOLYL BLUE</i> (MTT).....	17
4.6 DETECÇÃO DE APOPTOSE EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM HMP.....	18
4.7 ANÁLISE DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM HMP	18
4.7.1 Microscopia Óptica.....	18
4.7.2 Microscopia Óptica de Fluorescência - detecção de filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários (vimentina).....	18

4.8 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM HMP	19
4.8.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	19
4.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	20
4.9 RESPOSTA MICROBICIDA DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM HMP... 20	
4.9.1 Detecção de radicais superóxido em macrófagos tratados com HMP	20
4.9.2 Detecção de radicais superóxido em macrófagos infectados com <i>Leishmania</i> e tratados com HMP	20
4.9.3 Produção de óxido nítrico pela célula hospedeira tratada com HMP.....	21
4.9.4 Dosagem da atividade da enzima fosfatase ácida (AcP) em macrófagos tratados com HMP	21
4.9.5 Detecção da enzima fosfatase ácida (AcP) em macrófagos tratados com HMP através da MET.....	21
4.10 INTERAÇÃO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COM MACRÓFAGOS TRATADOS COM HMP	22
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
5 RESULTADOS	23
5.1 AÇÃO LEISHMANICIDA DO 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL- γ -PIRONA	23
5.1.1 Atividade antipromastigota.....	23
5.1.2 Atividade anti-amastigota	23
5.2 ANÁLISE DA CÉLULA HOSPEDEIRA	25
5.2.1 Viabilidade celular.....	25
5.2.2 Microscopia Óptica.....	27
5.2.3 Microscopia Óptica de Fluorescência.....	30
5.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	33
5.2.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	36
5.3 EFEITO DO HMP NO ÍNDICE ENDOCÍTICO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
5.4 ATIVIDADE MICROBICIDA DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM HMP. 40	
5.4.1 Produção de superóxidos por macrófagos tratados com HMP	40
5.4.2 Produção de superóxidos por macrófagos infectados e tratados com HMP	43
5.4.3 Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos tratados com HMP	46
5.4.4 Atividade da enzima fosfatase ácida (AcP) por macrófagos tratados com HMP.....	47
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES.....	53
8 PRODUÇÃO TÉCNICA	55
9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA	55
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	67

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Forma promastigota: A- desenho esquemático. B- Ultraestrutura de promastigotas de <i>L. braziliensis</i> . Forma amastigota: C- desenho esquemático. D- Ultraestrutura de amastigota <i>Leishmania</i> sp.	3
Figura 2. Desenho esquemático da ação da enzima iNOS.....	7
Figura 3. Estrutura química do ácido kójico, 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona.....	10
Figura 4. Atividade antipromastigota do HMP sobre <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> tratadas por 5 dias.	23
Figura 5. Índice endocítico de macrófagos infectados com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> e tratados com HMP por uma hora durante 3 dias consecutivos.	24
Figura 6. Análise da viabilidade celular.....	26
Figura 7. Análise morfológica de macrófagos tratados com HMP por 1 hora e corados com Giemsa.....	28
Figura 8. Detecção de componentes do citoesqueleto em macrófagos tratados com 50 μ g/mL de HMP.	31
Figura 9. Alterações ultraestruturais em macrófagos tratados com HMP observados através de MEV.....	34
Figura 10. Análise ultraestrutural em MET de macrófagos tratados com 50 μ g/mL de HMP.....	37
Figura 11. Índice endocítico de macrófagos tratados com 50 μ g/mL de HMP por 1 h, seguido da interação por 2h com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
Figura 12. Detecção da produção de superóxido através da reação citoquímica com NBT em macrófagos tratados com HMP por 1 h.	41
Figura 13. Detecção da produção de superóxido através da reação citoquímica com NBT em macrófagos infectados e tratados por 1 hora com HMP.....	44
Figura 14. Produção de NO por células tratadas com HMP.	46
Figura 15. Gráfico da atividade enzimática da AcP em células tratadas com HMP.	47
Figura 16. Citoquímica para detecção da atividade da enzima AcP em macrófagos tratados com HMP e analisados através de MET.	48

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- °C – Graus Celsius
- µg/mL – Microgramas por mililitros
- µL – Microlitros
- µm – Micrometros
- AK – Ácido kójico
- AP-1 – Fator de transcrição nuclear
- BSA – Bovina serum albumin
- C1 – Proteína do complemento 1
- C3 – Proteína do complemento 3
- C5 – Proteína do complemento 5
- DAPI – Diamino fenilindole
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DMSO – Dimetilsufóxido
- GP63 – Glicoproteína 63
- HMP – 5-hidroxi-2-hidroximetil-γ-pirona
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- IG – Imunoglobulina
- IgG –Imunoglobulina G
- IgM –Imunoglobulina M
- IL – Interleucina
- INF-γ – Interferon –γ
- iNOS – Óxido nítrico sintase induzida
- IRF-1 – Fator de transcrição nuclear
- LC – Leishmaniose cutânea
- LCD – Leishmaniose cutânea difusa
- LDH – Desidrogenase láctica
- LPG – Lipofosfoglicano
- LTA – Leishmaniose tegumentar americana
- LVA – Leishmaniose visceral americana
- M – Molar
- MBL – Lectina de ligação à manose
- MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
mg/mL – Miligramas por mililitros
MTT – Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase hidrogenase
NBT – Nitroblue tetrazolium
NF-kB – Fator de transcrição nuclear
NH₄Cl – Cloreto de amônio
nm – Nanômetros
NNN – Neal, Novy e Nicolle
NO – Óxido nítrico
O₂ – Íon superóxido
OH⁻ – Radical hidroxila
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Sigla inglesa para tampão fosfato salino
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PS – Fosfatidilserina
ROS – Radicais de oxigênio
RPMI – Roswell Park Memorial Institute
SBF – Soro bovino fetal
SOD – Superóxido dismutase
STAT-1 – Fator de transcrição nuclear
TGF-β – Sigla inglesa para fator modulador de crescimento
TNF-α – Sigla inglesa para fator de necrose tumoral

RESUMO

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por parasitas do gênero *Leishmania* que são protozoários intracelulares obrigatórios, infectam células do sistema fagocítico mononuclear e são transmitidos por flebotomíneos. A quimioterapia é o tratamento mais eficaz da doença. Apesar de uma variedade de drogas antileishmania estarem disponíveis, estas drogas são geralmente tóxicas, caras e requerem um longo período de tratamento. Novas drogas isoladas de plantas e microorganismos têm demonstrado ação leishmanicida. Assim, consideramos interessante analisar o metabólito secundário (HMP) produzido por algumas espécies de fungos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acetobacter* contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e o seu efeito sobre a célula hospedeira. Este metabólito tem atividade bacteriostática e é eficaz na inibição da formação de L-DOPA (3,4-dihidróxi-L-fenilalanina) pela tirosina no processo de biossíntese de melanina. Entretanto, a atividade antileishmania e os efeitos sobre a célula hospedeira não são conhecidos. Sendo assim, o HMP diminuiu o crescimento de promastigotas em 62% na concentração de 50µg/mL (IC₅₀ 30.6µg/mL). Além disso, ocorreu uma diminuição do crescimento de 79% (IC₅₀ 13.3µg/mL) de amastigotas em macrófagos infectados e tratados com a mesma concentração. Além da ação sobre o parasito, vários efeitos foram observados em macrófagos tratados, como o aumento do citoplasma e da habilidade de espraiamento, alterações no citoesqueleto, aumento da fagocitose, do número de projeções citoplasmáticas e vacúolos. A análise da atividade microbicida da célula hospedeira tratada mostrou que ocorreu a produção de radicais superóxidos, detectado pelo teste com Nitro Blue Tetrazolium (NBT), mas não foi observada a produção de NO e alteração na atividade da enzima fosfatase ácida. Nenhum efeito citotóxico e aumento de morte celular foi observado na célula hospedeira. Estes resultados demonstraram que o metabólito foi eficaz na inibição do crescimento do protozoário sem causar danos à célula hospedeira. Assim, a partir dos resultados obtidos conclui-se que o HMP pode ser utilizado como agente leishmanicida, sendo promissor para utilização tópica no combate à Leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania amazonensis*, uma vez que já é utilizado em cosméticos para tratamento de melasma.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea; *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, Macrófagos, Citoesqueleto, Ácido kójico.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex of disease caused by *Leishmania* genus parasites that are intracellular obligatory protozoa, infects cells of mononuclear phagocytic system and are transmitted by phlebotomine sandflies. Chemotherapy is one of the most effective treatments for this disease. Although a number of antileishmanial drugs are available, these drugs generally are toxic, expensive and require long-term treatment. New drugs isolated from plants and microorganisms have shown leishmanicidal action. Thus, we consider interesting to analyze a secondary metabolite (HMP) produced by some species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Acetobacter* fungi against promastigote and amastigote of *L. amazonensis* and its effects on host cell. This metabolite has bacteriostatic activity and effectively inhibits the formation of L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine) from tyrosine on melanin biosynthesis process. However, antileishmanial activity and effects on host cells are not known. Therefore, HMP acted decreasing 62% of the growth of *L. amazonensis* promastigotes at 50µg/mL concentration (IC₅₀ 30.6µg/mL). Moreover, was observed a growth inhibition of 79% (IC₅₀ 13.3µg/mL) in amastigotes in infected macrophages at the same concentration. Beyond the action upon parasite, many effects were observed on treated macrophages as the increase of cytoplasm and spreading ability, cytoskeleton alterations, phagocytosis enhancement, high number of cytoplasmatic projections and vacuoles. Treated host cell microbicide activity analysis demonstrated that occurred superoxide production, detected by Nitro Blue Tetrazolium (NBT) assay, however it wasn't observed NO production and alteration in acid phosphatase activity. No cytotoxic effect and cell death were observed on host cell. These results showed that secondary metabolite effectively inhibits the parasites growth, without host cell injury. Thereby, from results obtained it's possible to conclude that HMP can be used as leishmanicidal agent, being a promising for topic using against tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*, once that is already used on cosmetics for melasma treatment.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, macrophages, Cytoskeleton, Kojic acid.

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são um complexo de doenças que acometem milhões de pessoas em todo o mundo. É causada por vinte espécies (WHO, 2009) de protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania* (LIBUSOVÁ *et al.*, 2004). A patologia se manifesta sobre diversas formas clínicas: visceral, mucocutânea e cutânea (PARIS *et al.*, 2003). A transmissão ocorre através da picada de insetos hematófagos, conhecidos como flebotomíneo, pertencentes a 30 espécies diferentes, dependendo da sua localização geográfica.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as Leishmanioses afetam 88 países, dentre os quais 72 são classificados como países em desenvolvimento. Cerca de 2 milhões de pessoas no mundo são afetadas pela leishmaniose, sendo uma das seis doenças tropicais de maior relevância no mundo (WHO, 2009).

Desde a década de 40 a terapia mais aceita para todas as formas de Leishmaniose é a utilização de antimoniais pentavalentes (DI GIORGIO, 2000). Entretanto, a presença de variadas formas clínicas da doença unida ao surgimento de cepas resistentes aos antimoniatos pentavalentes, principalmente aquelas pertencentes ao gênero *Viannia* têm dificultado o tratamento (ASHUTOSH *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2007). As drogas de segunda linha como anfotericina B e pentamidina estão demonstrando pouca eficácia no tratamento devido ao desenvolvimento de cepas resistentes, por serem tratamentos invasivos e tóxicos causando reações adversas (MUKHERJEE *et al.*, 2006; CROFT *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2008). Novos medicamentos como miltefosina, paromomicina e sitamaquina estão sendo utilizados amplamente como tratamento para LV na Índia e também como tratamento opcional em pacientes infectados por cepas resistentes (NEUBER, 2008). Além disso, a busca por produtos naturais está sendo foco da maioria das pesquisas devido, principalmente, aos baixos custos na obtenção dessas substâncias. Mais recentemente, alguns estudos demonstraram, que extratos naturais como alcalóides e flavonóides possuem excelente atividade contra tripanossomatídeos (TEMPONE *et al.*, 2005; SÜLSEN *et al.*, 2007; MISHRA *et al.*, 2009).

Atualmente, estão sendo desenvolvidos estudos sobre o uso de nonopartículas e lipossomas como meio de transporte de drogas já utilizadas no tratamento da Leishmaniose, devido ao seu pequeno tamanho e estabilidade quando em contato com a célula hospedeira (LALLA *et al.*, 2004; 2006; SANTOS *et al.*, 2008).

1.1 AS LEISHMANIOSES

1.1.1 Classificação

Nas Américas são conhecidas, atualmente, 11 espécies dermatóricas de *Leishmania* causadora de doença humana e oito espécies descritas em animais. No Brasil, já foram identificadas sete espécies, sendo que seis pertencem ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*. As espécies mais conhecidas são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. As outras quatro espécies foram descritas recentemente nas regiões Norte e Nordeste, sendo elas: *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* (BRASIL, 2007).

1.1.2 Morfologia

A *Leishmania* é um protozoário intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear e apresenta duas formas evolutivas: a forma promastigota (Figura 1A-B), com corpo celular e flagelo alongados, presença do cinetoplasto, característico de sua ordem *Kinetoplastida* sendo encontrada no tubo digestivo do vetor; e a forma amastigota (Figura 1 C-D), com corpo celular arredondado, flagelo internalizado e cinetoplasto (SOUZA, 1997).

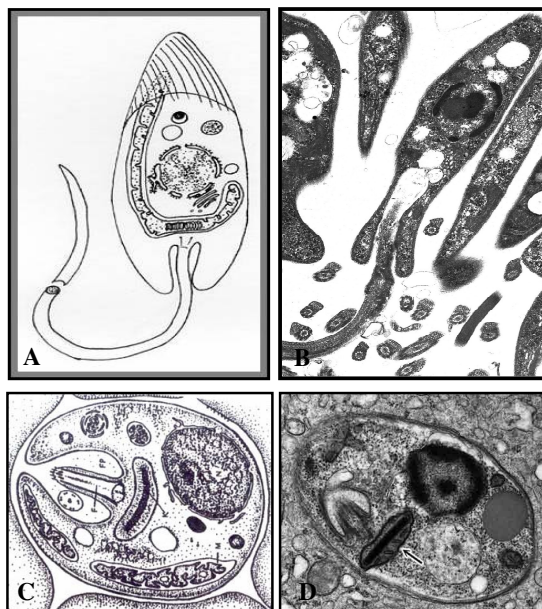


Figura 1. Forma promastigota: A- desenho esquemático. B- Ultraestrutura de promastigotas de *L. braziliensis*. Forma amastigota: C- desenho esquemático. D- Ultraestrutura de amastigota *Leishmania* sp.

Fonte: B- Laboratório de Biologia Estrutural, UFPA, 2007 e A, C e D - The Medical Journal of Australia, 2004. F-flagelo, FP-bolsa flagelar, K-cinetoplasto, M-mitocôndria, N-núcleo.

1.1.3 Ciclo

O parasito é transmitido por flebotomíneos para o hospedeiro vertebrado, principalmente em regiões com áreas florestais. No intestino do vetor, as formas promastigotas passam por um processo de metaciclogênese, onde não se reproduzem e passam a ser infectante devido a alterações nos seus constituintes de membrana, como o alongamento da molécula do lipofosfoglicano (LPG), principal fator de virulência (PINTO-DA-SILVA *et al.*, 2002; PINHEIRO *et al.*, 2004; GUEIRARD *et al.*, 2008).

Após o repasto sanguíneo realizado pelo vetor, as formas promastigotas são reconhecidas na pele por células do sistema imune. As promastigotas passam então para o meio intracelular formando o vacúolo parasitóforo, onde por influência de enzimas e alterações do pH e temperatura sofrerão modificações morfológicas adquirindo a forma de amastigota (SERENO *et al.*, 2007). Essa forma passa a se multiplicar no interior das células fagocíticas até a ruptura, passando a infectar novos macrófagos e também novos vetores se estiverem presentes no mesmo habitat do homem infectado (BAILEY e LOCKWOOD, 2007).

1.1.4 Aspectos Epidemiológicos

As Leishmanioses apresentam variadas manifestações clínicas (Tabela 1), que se encaixam dentro de duas categorias amplas: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

A Leishmaniose tegumentar é um problema de saúde pública que atinge 88 países em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), sendo registrado por volta de 1,5 milhões de casos. É considerada pela OMS, como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, devido ao alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (BRASIL, 2007).

No Brasil o perfil da leishmaniose está mudando devido, principalmente, à expansão humana para áreas endêmicas florestais, de uma zoonose transmitida acidentalmente ao homem para uma doença de caráter rural-urbana. Devido à expansão de cidades e áreas de exploração de madeira e minério houve um aumento nos registros de casos de LTA nos últimos anos (CHAGAS *et al.*, 2006). Foram registrados 28.233 novos casos no período de 1996 a 2007, sendo que a maior parte dos casos ocorreram nas regiões Nordeste e Norte. No Estado do Pará houve um aumento de casos passando de 3074 em 2007 para 4754 novos casos em 2008 (BRASIL, 2007, 2008).

Tabela 1: Espécies de Leishmania e forma clínica relacionada. Fonte: REINTHINGER *et al.*, 2007 (modificado).

	Forma Clínica	Distribuição Geográfica
<i>Leishmania</i> spp. do Novo Mundo		
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	LCL, LMC	Américas do Sul e Central, México
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	LCL, LMC	Américas do Sul e Central
<i>L. (Viannia) peruviana</i>	LCL	Peru
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Viannia) lainsoni</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Viannia) colombiensis</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	LCL, LCD	América do Sul
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	LCL, LCD	América Central, México e EUA
<i>L. (Leishmania) pifanoi</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Leishmania) venezuelensis</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Leishmania) garnhami</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Leishmania) chagasi</i>	Visceral	Américas do Norte, Central e Sul

LCL = Leishmaniose Cutânea Localizada; LCD = Leishmaniose Cutânea Difusa; LMC = Leishmaniose Mucocutânea

1.1.4 Aspectos Clínicos e Imunológicos da infecção por *Leishmania (L.) amazonensis*

A infecção por *L. amazonensis* tem como principal forma clínica a Leishmaniose cutânea difusa (LCD) caracterizada pela formação de lesões difusas não ulceradas por toda a pele, contendo elevado número de amastigotas (SILVEIRA *et al.*, 2005, SILVEIRA, 2009).

Há evidências de que *L. amazonensis* tem uma capacidade particular de interferir negativamente em vários mecanismos imunológicos necessários para a produção de uma resposta imune efetiva. A ausência de uma resposta imune efetiva torna o hospedeiro mais suscetível à multiplicação dos parasitos (PINHEIRO *et al.*, 2004).

Pacientes que desenvolvem aspectos clínicos da LCD têm uma resposta predominantemente do tipo Th-2, ou seja, produção de anticorpos, com baixas concentrações de IL-12 e INF- γ e concentrações séricas elevadas de IL-10, IL-4, IL-5 (REITHINGER *et al.*, 2007). Essas últimas citocinas favorecem o desenvolvimento do parasito, enquanto a diminuição de IL-12 e INF- γ reduzem o recrutamento das células de defesa (GOMES-SILVA *et al.*, 2007,

SILVEIRA, 2009). As espécies causadoras de LC apresentam uma resposta do tipo Th-1, com produção de INF- γ , IL-12 (REITHINGER *et al.*, 2007; TRIPATHI *et al.*, 2007). A produção de IL-10 em macrófagos infectados por *Leishmania*, geralmente está envolvida com a suscetibilidade e progressão da doença (TRIPATHI *et al.*, 2007).

1.2 A CÉLULA HOSPEDEIRA

Os macrófagos, juntamente com os neutrófilos, são as principais “células fagocíticas profissionais” no organismo. A fagocitose é uma forma de endocitose por meio da qual o microorganismo e células mortas são ingeridos através das grandes vesículas endocíticas, os fagossomos (MOSSER E EDWARDS, 2008).

O macrófago possui uma variedade de receptores expressos na superfície que têm como função o reconhecimento de antígenos de microorganismos (GRUENHEID & FINLAY, 2003). Devido ao processo de sinalização desencadeado na superfície da célula hospedeira, ocorrerão alterações morfológicas características da ativação celular. Inicialmente ocorre um rearranjo no citoesqueleto que promoverá uma variedade de funções como a motilidade, a migração celular, o reconhecimento do parasito através da porção Fc γ , a formação de prolongamentos citoplasmáticos, a fagocitose e a fusão de lisossomos com o vacúolo parasitóforo. O fagolisossomo então formado passa a ser um compartimento rico em hidrolases capazes de degradar o parasito fagocitado (GRUENHEID & FINLAY, 2003; LOPES *et al.*, 2006; DAMIANI & COLOMBO, 2003; CALLE *et al.*, 2006; HEHNLY & STAMNE, 2007; LÁZARO-DIÉGUEZ *et al.*, 2008; PATEL *et al.*, 2009).

Além das hidrolases, outro mecanismo utilizado como defesa é o chamado o “burst oxidativo”, que envolve a produção de ROS como íons superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^-), que auxiliará a célula hospedeira na destruição do parasito (ROBINSON, 2004; DUNAND, 2007). A NADPH oxidase é uma enzima com subunidades distribuídas pela membrana fagossomal e pelo citosol. Após a estimulação as subunidades irão se unir formando um complexo capaz de reduzir o O_2 em ânions superóxidos (O_2^-) (ROBINSON *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Posteriormente, os O_2^- são convertidos em H_2O_2 espontaneamente ou por meio da enzima superóxido dismutase (SOD) (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Além destes ROS, os macrófagos também produzem alguns radicais intermediários, principalmente óxido nítrico (NO), através da ativação enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Esta permanece ausente em macrófagos inativados, sendo ativada, principalmente, por meio do LPS e INF- γ (HORTELANO, 2003).

A iNOS é uma enzima que promove a conversão da arginina em NO e L-citrulina quando a célula hospedeira é ativada (Figura 2). O NO é uma molécula altamente reativa com potente capacidade microbicida (WINBERG *et al.*, 2007). Além disso, esta molécula é sinalizadora para reações moleculares no interior da célula, como ativação da guanilato ciclase e posterior liberação de Ca^{++} intracelular (LO *et al.*, 2002; WINBERG *et al.*, 2007).

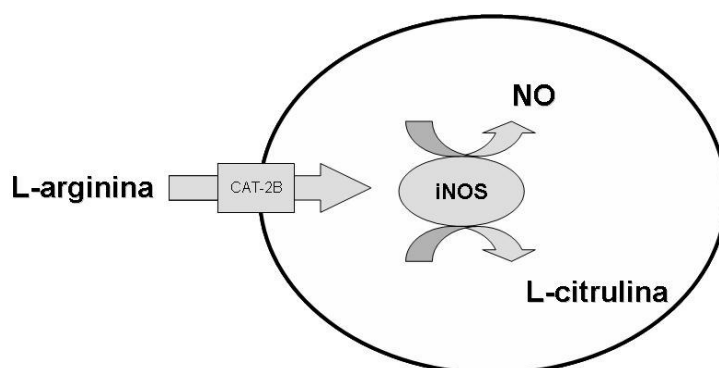


Figura 2. Desenho esquemático da ação da enzima iNOS.

A L-arginina é transportada por uma proteína de membrana para o interior da célula, sendo convertida em NO e L-citrulina pela enzima iNOS.

Juntamente à ativação dos macrófagos ocorrerá a produção de citocinas como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α , estimulando respostas imunes e inflamatórias, podendo ser mais severas ou não, dependendo da resposta imune do hospedeiro e da espécie de *Leishmania*.

1.3 A INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório. O processo de fagocitose requer uma interação entre receptores especializados na superfície de células fagocíticas e ligantes complementares na membrana da célula alvo.

A fagocitose das promastigotas de *Leishmania* ocorre através da ligação do parasito a receptores presentes na superfície dos macrófagos, iniciando com isso a formação prolongamentos citoplasmáticos que auxiliarão a internalização do parasito, formando, assim, um fagossomo (GRUENHEID & FINLAY, 2003). Após a internalização e constituição do fagossomo ocorrerão alterações no citoesqueleto, principalmente nos microtúbulos e filamentos de actina, para iniciar a fusão lisossomal para desenvolvimento do fagolisossomo (DIAKONOVA *et al.*, 2002).

Como mecanismo de ataque e também de defesa das promastigotas, tanto em relação

ao sistema de defesa do inseto vetor quanto aos macrófagos, existem na superfície do parasito, moléculas de fundamental importância para o sucesso da infecção, como o LPG, a GP63, açúcares (manose, galactose) e a fosfatidilserina. Além disso, após a fagocitose a forma do parasito é alterada, transformando-se em amastigota e algumas das moléculas envolvidas na adesão das formas promastigotas também estão presentes na forma intracelular, envolvidas, principalmente no mecanismo de evasão do parasito (CUNNINGHAM, 2002, LANG *et al.*, 2009).

Diversos estudos foram realizados a fim de desvendar maiores detalhes acerca dos fatores de virulência envolvidos na interação do parasito com sua célula hospedeira (CUNNINGHAM, 2002; DIAS *et al.*, 2007; GUEIRARD *et al.*, 2008). Acredita-se que este seja um dos caminhos para o desenvolvimento de novas drogas e vacinas contra as Leishmanioses.

1.4 TRATAMENTOS

O tratamento da leishmaniose é realizado utilizando-se uma variedade de medicamentos. De acordo com a OMS existem tratamentos e doses medicamentosas que diferem entre espécies do Novo e Velho Mundo, aqueles que são espécie-específico e ainda entre lesões complexas e simples (BAILEY *et al.*, 2007).

O principal tratamento recomendado pela OMS ainda é o antimonial pentavalente, que pode ser administrado por via parenteral ou oral. Entretanto, algumas espécies de *Leishmania* estão apresentando resistência aos antimoniais pentavalentes devido ao tratamento em doses elevadas com este medicamento (ASHUTOSH *et al.*, 2007). Muitos estudos realizados para demonstrar a dose correta para administração dos antimoniais apresentaram resultados inconclusivos e insatisfatórios, uma vez que a dose administrada e a via de administração escolhida variam de acordo com a espécie, forma clínica e resposta do paciente (AMEEN, 2007). Reinthinger *et al.*, (2007) observaram que os antimoniais administrados via parenteral são eficientes contra LCL causada por *L. braziliensis*, *L. major* e *L. tropica*. Porém, tal administração não demonstrou eficácia contra LMC causada por *L. braziliensis* (BAILEY *et al.*, 2007). Além da resistência dos parasitos, os antimoniais apresentam variados efeitos adversos como: elevação dos níveis de transaminases séricas, reações dérmicas locais, anorexia, náuseas e vômitos, tendo ainda seu uso contra-indicado durante a gravidez e em pacientes diabéticos (PINHEIRO, 2004).

As drogas de segunda escolha são as anfotericinas e pentamidinas, geralmente administradas em pacientes que não respondem ao tratamento com antimoniais ou que possuem

alguma restrição ao seu uso (WHO, 2009). A anfotericina é um antibiótico que possui atividade seletiva tanto sobre *Leishmania* quanto em *Trypanosoma* devido à sua alta afinidade ao ergosterol, esterol predominante nesses parasitos, ao contrário das células hospedeiras que apresentam maior quantidade de colesterol em sua composição. Devido ao seu uso por 30 anos no tratamento de micoses, a resistência causada pela anfotericina também torna o tratamento inadequado, principalmente em pacientes co-infectados com HIV (CROFT *et al.*, 2006). Por outro lado, as pentamidinas têm apresentado eficiência contra algumas espécies de Leishmanias do Novo Mundo como *L. panamensis* e *L. guyanensis* (BAILEY *et al.*, 2007), além da eficácia no tratamento de LV. Sua ação parece estar relacionada com a inibição da biossíntese de poliaminas e alterações na membrana mitocondrial (CROFT *et al.*, 2006).

Atualmente, análogos de lipofosfolípídios, como a miltefosina, edelfosina e ilmofosina estão sendo usadas como tratamento oral contra Leishmaniose, demonstrando bastante eficácia e tolerabilidade (AMEEN, 2007). A miltefosina foi desenvolvida para o combate ao câncer (ENGEL & ZENTARIS, 2002) por atuar induzindo apoptose em células tumorais (PARIS *et al.*, 2004). Essas substâncias demonstraram eficácia *in vitro* contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. donovani*, causadora de LV (GANGULY, 2002; SANTA-RITA *et al.*, 2004; PARIS *et al.*, 2004). Na Índia, os tratamentos com miltefosina já estão na fase quatro de testes que envolvem seres humanos (CROFT *et al.*, 2006; PALUMBO, 2008).

Além dos tratamentos sintéticos, muitos óleos e extratos de plantas utilizadas popularmente têm sido objeto de estudos, principalmente da região Amazônica devido à grande biodiversidade natural (BRAGA *et al.*, 2007). O óleo essencial, proveniente da raiz da planta *Croton cajucara* e o óleo de capaíba apresentaram ação leishmanicida, com atividade contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, além de estimular a produção de NO e ROS e não apresentar efeito citotóxico à célula hospedeira (ROSA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2008). Além desses óleos, extratos naturais contendo flavonóides e alcalóides são eficazes contra espécies de *Leishmania*. Os flavonóides provenientes da planta *Vernonia polyanthes* e os alcalóides provenientes da planta *Galipea longifolia*, demonstraram inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* (KAYSER *et al.*, 2003; BRAGA *et al.*, 2007). Outra substância natural que apresentou ter efeito sobre infecção *in vitro* e *in vivo* causada pelas espécies *L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* foi o limoneno, um monoterpene presente em cascas de frutas (ARRUDA *et al.*, 2009). Além disso, extratos de própolis também demonstraram atividade leishmanicida sobre espécies do Novo Mundo (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*) e do Velho Mundo (*L. tropica* e *L. major*) (MACHADO *et al.*, 2007; AYRES *et al.*, 2007; DURAN *et al.*, 2008). Um outro extrato, proveniente do

Allium sativum, induziu a produção *in vitro* e *in vivo* de NO e, conseqüentemente, diminuiu a proliferação de *L. mexicana* (GAMBOA-LEÓN *et al.*, 2007).

Outros compostos descritos na literatura com ação Leishmanicida são metabólitos e substâncias produzidas e/ou provenientes de fungos. Metabólitos isolados de fungos *Nigrospora sphaerica*, *Hypocrella banbusa*, *Merulius incarnates* demonstraram efeito sobre promastigotas e amastigotas de várias espécies de *Leishmania* (KAYSER *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2004; JIN & ZJAWIONY, 2006).

A variedade de tratamentos atualmente disponíveis contra Leishmaniose tegumentar demonstra que não existe uma terapia eficaz e muitos estudos estão sendo realizados para o desenvolvimento de drogas de baixo custo, que sejam menos invasivas, como pomadas emulsões, e que possam ser utilizadas em doses mínimas.

1.5 O ÁCIDO KÓJICO

O ácido kójico (AK), 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona (HMP) (Figura 3), é um metabólito aquoso produzido por vários microorganismos, especialmente fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Acetobacter* e *Penicillium*. É uma substância cristalina altamente solúvel em água, etanol e acetona (GOMES *et al.*, 2001).

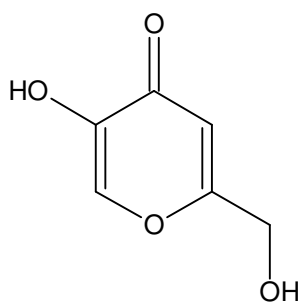


Figura 3. Estrutura química do ácido kójico, 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona.

O AK possui uma variedade de aplicações, sendo utilizado, principalmente, como inibidor de tirosinase (CHANG *et al.*, 2009), agente antioxidante (NIWA & AKAMATSU, 1991; GOMES *et al.*, 2001), como aditivo em alimentos (BURDOCK *et al.*, 2001; BLUMENTHAL *et al.*, 2004; BENTLEY *et al.*, 2006), cosmético (NOHYNEK *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2007) como tratamento de melasma (LIM *et al.*, 1999; MI HA *et al.*, 2007, AZZAM *et al.*,

2009), como antitumoral (BURDOCK *et al.*, 2001; TAMURA *et al.*, 2006; MOTO *et al.*, 2006), e ainda como agente radioprotetor (EMAMI *et al.*, 2007; HOSSEINIMEHR *et al.*, 2009).

Como agente antioxidante foi observado que o AK diminuiu significativamente a quantidade de ROS em sobrenadante de cultivo de neutrófilos, entretanto, houve uma potencialização da produção intrínseca desses radicais, possivelmente através da enzima NADPH oxidase. Além disso, os neutrófilos tratados com AK também demonstraram um aumento da quantidade de Ca^{++} intracelular, íon envolvido na produção de mediadores inflamatórios e ativação celular (NIWA & AKAMATSU, 1991). Gomes *et al.*, (2001) demonstraram a capacidade do AK em capturar ROS (OH^- , O_2^- , O_2) em tampão fosfato. O AK foi ineficaz apenas para o radical H_2O_2 . Seu papel antioxidante também foi detectado no Japão, onde o AK é adicionado em alimentos para preservação de verduras, frutas e legumes por mais tempo (BURDOCK *et al.*, 2001).

Outra aplicação para este metabólito é a utilização do AK como cosmético. Nohynek *et al.*, (2004) demonstraram não haver indícios de genotoxicidade ou toxicidade em consumidores de cosméticos a base de AK. Pomadas e cremes têm sido amplamente utilizados como clareadores para pele (LIN *et al.*, 2007). A ação clareadora do AK também foi vista em peixes escuros que eram alimentados com comidas ricas em AK e tornaram-se marrom após 49 dias de tratamento (BENTLEY *et al.*, 2006). O uso do AK como clareador, deve-se ao fato deste metabólito ser um potente inibidor da tirosinase, enzima fundamental para produção de melanina (MI HA *et al.*, 2007).

A tirosinase é uma enzima que converte a tirosina em L-dopamina, precursor de pigmentos da pele (BENTLEY *et al.*, 2006). A ação inibitória da enzima tirosinase é utilizada com eficácia no tratamento de melasma. O AK demonstrou ser tão eficaz quanto à hidroquinona na redução do pigmento formado pelo melasma (LIM *et al.*, 1999).

Além disso, o AK também vem sendo utilizado no tratamento de tumores. Moto *et al.*, (2006) e Kono *et al.*, (2007) demonstraram atividade proliferativa de hepatócitos em camundongos que sofreram hepatotomia e foram tratados por quatro semanas com alimentos contendo 3% AK. Em camundongos com lesão na tireóide e tratados por 8 semanas com alimentos suplementados com 2% AK não foi observada atividade tumoral (TAMURA *et al.*, 2006). Higa *et al.*, 2008 induziram o aparecimento de lesões na pele e trataram com um creme contendo 3% de AK. Os autores não observaram a formação de nódulos, sugerindo que o AK não possui efeitos promotores do desenvolvimento de carcinogênese na pele (HIGA *et al.*, 2007). Recentemente, Fickova *et al.* (2008) demonstraram que derivados do AK contendo selênio

são eficazes na atividade antiproliferativa em células de carcinoma de pele e mama, não sendo observado efeito citotóxico.

Outra aplicação recente desse metabólito é o seu uso como radioprotetor contra irradiação- γ . Essa ação pode estar relacionada com a formação de complexos com manganês e zinco, que passam a possuir grande estabilidade hidrolítica, tornando-se altamente lipofílicos ou ainda, devido à atividade antioxidante (EMAMI *et al.*, 2007; HOSSEINIMEHR *et al.*, 2009).

Sua ação sobre parasito foi demonstrada recentemente em helminto, onde foi detectada diminuição da produção de ovos de *Schistosoma mansoni* devido a inibição da enzima tirosinase 1 e 2 presentes nos vermes adultos (FITZPATRICK *et al.*, 2007). Entretanto, não existem trabalhos na literatura sobre a ação do AK em protozoários e durante a interação com a célula hospedeira.

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) representa um grave problema de saúde pública, havendo registro de sua ocorrência em todos os Estados brasileiros. Entre o período de 1996 a 2007 o país apresentou uma média de 28.233 casos novos por ano. A região Norte do país apresentou um aumento na incidência dos casos devido ao processo de exploração da Amazônia sendo notificados aproximadamente 46,5% dos casos em 2007, predominando os estados do Pará, Amazonas e Rondônia. No Estado do Pará, a incidência da LTA sofreu um aumento substancial, sendo registrados 3074 casos em 2007 e 4754 casos em 2008 (ALVES, 2008; BRASIL, 2007, 2008).

Devido ao aumento da ocorrência de casos de Leishmaniose, uma diversidade de medicamentos está sendo desenvolvida com a finalidade de ativar a célula hospedeira, sem causar efeitos colaterais e ao mesmo tempo inibir os mecanismos desenvolvidos pelo parasito como mecanismo de evasão à resposta imune das células fagocíticas. Os medicamentos utilizados para tratamento das leishmanioses como os antimoniais, as pentamidinas e a anfotericina, atualmente não têm demonstrado eficácia devido à resistência criada por essas drogas em espécies causadoras de Leishmaniose (SINGH & SIVAKUMAR, 2004; AMEEN, 2007). Além disso, os efeitos colaterais como pancreatite, náusea e dor abdominal, são constantemente relatados em pacientes tratados por longos períodos (LAWN *et al.*, 2006). Portanto, devido à grande diversidade de substâncias utilizadas no combate à leishmaniose, torna-se necessária a busca de medicamentos que estimulem a resposta microbicida da célula hospedeira e que sejam capazes de destruir o parasito. Assim, baseado na ausência de trabalhos na literatura sobre a ação do HMP como agente leishmanicida, buscou-se determinar os efeitos desse metabólito secundário sobre o protozoário *Leishmania* e o seu papel sobre macrófagos e ainda, durante a interação desses parasitos com a célula hospedeira.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito do metabólito 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona (HMP), sobre *L. amazonensis* e sua célula hospedeira.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (1) Analisar a ação do HMP sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*;
- (2) Analisar a ação do HMP sobre a célula hospedeira infectada;
- (3) Analisar a viabilidade da célula hospedeira após o tratamento com HMP;
- (4) Analisar alterações estruturais e ultraestruturais da célula hospedeira tratada com HMP;
- (5) Analisar os componentes do citoesqueleto (actina, microtúbulos e filamentos intermediários-vimentina) da célula hospedeira tratada com HMP;
- (6) Determinar a resposta microbicida da célula hospedeira tratada com HMP.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO

As formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foram obtidas em meio NNN provenientes do Programa de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, e mantidas em meio RPMI 1640, suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF) em estufa B.O.D (*Biological Oxygen Demand*) à 27°C.

4.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DA CÉLULA HOSPEDEIRA

Macrófagos peritoneais foram obtidos a partir de camundongos albinos (*Mus musculus*). Os animais foram anestesiados e sacrificados para a coleta dos macrófagos, feita através de lavagem da cavidade peritoneal com solução de Hanks estéril, utilizando seringa e agulhas estéreis. O material aspirado foi concentrado por centrifugação a 600 G durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C. O sedimento foi ressuscitado em meio de cultura sem soro. A contagem das células foi feita em Câmara de Neubauer e a concentração ajustada de acordo com o número de células utilizadas em cada experimento. Os macrófagos foram então transferidos para placas de cultura de 24 poços ou garrafas de cultura e incubados a 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂, durante uma hora para adesão. Após esse período foi feita uma lavagem com solução salina de fosfato estéril (PBS) pH 7.2, para remoção de células que não aderiram, e em seguida adicionado meio DMEM suplementado com 10% de SBF. As células foram, então, mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Os animais foram sacrificados de acordo com as normas do Comitê de Ética (processo nº BIO001-09 CEPAAE/ICB/UFPA) e foram acondicionados em recipientes plásticos apropriados e despejados em containeres para coleta seletiva de material biológico.

4.3 OBTENÇÃO E DILUIÇÃO DO METABÓLITO HMP (5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona)

O metabólito secundário foi obtido a partir de fungos do gênero *Aspergillus* e fornecido pelo Dr. Alberdan Santos e pelo Dr. Cláudio Nahum do Laboratório de Desenvolvimento e Planejamento de Fármacos da Universidade Federal do Pará.

A solução estoque foi preparada na concentração de 1mg/mL de HMP diluída em meio DMEM ou RPMI. A concentração final utilizada para cada experimento foi obtida a partir dessa solução.

4.4 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

4.4.1 Atividade antipromastigota

Para análise da atividade antipromastigota, parasitos em fase exponencial de crescimento (4º dia de cultivo) foram utilizados para os testes com a droga. Os parasitos foram adicionados aos poços de cultura em uma concentração de 10^6 parasitos por mL. A droga foi adicionada em concentrações de 20 e 50µg/mL obtidas a partir da diluição estoque da droga (1mg/mL) e também foi utilizada na concentração de 1mg/mL, em placas de 24 poços. A cada 24 horas de cultivo, foram retiradas alíquotas para contagem em câmara de Neubauer até o quinto dia de tratamento. A contagem foi feita em microscópio óptico de campo claro (Olympus BX41) considerando como viáveis as promastigotas que apresentaram motilidade. Em todos os experimentos foi utilizado controle sem adição de droga. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.4.2 Atividade antiamastigota

Para análise da atividade antiamastigota, macrófagos foram cultivados como descrito no item 4.2, seguido da interação com promastigostas na fase estacionária de crescimento numa proporção de (1:10) durante 2 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e os macrófagos lavados com PBS, pH 7.2, por três vezes, para retirar as leishmanias não internalizadas. Posteriormente à infecção, os macrófagos foram tratados por 1 hora durante 3 dias. Após o tratamento, o sobrenadante foi retirado e as lamínulas lavadas com PBS. Em seguida, as células foram fixadas com uma solução de Bouin (Solução A: solução aquosa saturada de ácido pícrico 300 ml: formalina 40%-100 ml : solução B: 20 ml da solução A e ácido acético glacial-1ml) durante 30 minutos e lavadas com etanol a 70% e água destilada, para retirar o excesso do fixador. A coloração foi feita com o corante Giemsa, diluído a 10 % em água destilada, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram desidratadas em acetona 100% e passadas em misturas

crescentes de acetona-xilol, até duas passagens finais em xilol puro. As lamínulas foram, então, montadas em lâminas de vidro, tendo *Entellan* como meio de montagem. Foram contados 100 macrófagos por lamínula e o índice endocítico foi obtido calculando-se a porcentagem de células que endocitaram e a média de parasitas por células. As células foram contadas em microscópio óptico Olympus BX41.

A IC_{50} para formas promastigotas e amastigotas intracelulares foi determinada a partir da seguinte fórmula (MARTIN *et al.*, 2001):

$$I = I_{max} \times C / IC_{50} + C$$

I = percentagem de inibição (%); I_{max} = 100% de inibição; C = concentração do inibidor; IC_{50} = concentração necessária para inibir o crescimento

4.5 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM HMP PELO MÉTODO DO *THIAZOLYL BLUE* (MTT)

O MTT, um sal tetrazolium solúvel em água, é convertido pelas desidrogenases mitocondriais em cristais azuis de formazan insolúveis em água. O produto formazan é impermeável às membranas celulares, acumulando-se em células viáveis, sendo posteriormente diluído em DMSO (FOTAKIS *et al.*, 2006).

Macrófagos foram cultivados como descrito no item 4.2 em placas de 24 poços e submetidos ao tratamento com o HMP nas concentrações de 10 a 700 $\mu\text{g/mL}$. As células foram tratadas por 1 hora, depois lavadas 2 vezes com PBS e incubadas novamente em meio DMEM e 10% SBF por 24 horas. O sobrenadante foi retirado e os poços lavados com PBS. Logo após a lavagem, foi adicionado 0,5 mg/mL MTT diluído em PBS sendo, posteriormente, incubados à 37°C em atmosfera contendo 5% de CO_2 por 3 horas. Após o término da incubação, foi retirado o sobrenadante, lavado 1 vez com PBS e adicionado 200 μL DMSO em cada poço para solubilização dos cristais de formazan e incubado em agitação por 10 minutos. Posteriormente, a solução resultante foi transferida para placa de 96 poços e lida em leitor de ELISA (BIORAD Model 450 Microplate Reader) em um comprimento de onda de 570 nm (FOTAKIS *et al.*, 2006). Como controle negativo da reação, células foram mortas com solução de 10% de formol em PBS como controle negativo da reação.

4.6 DETECÇÃO DE APOPTOSE EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM HMP

A detecção da apoptose de macrófagos tratados com 20 e 50 µg/mL foi realizada utilizando a marcação com Iodeto de Propídio. Macrófagos foram cultivados em placas de cultura de 24 poços e submetidos ao tratamento por 1 hora com o HMP e mantidos em cultivo durante 48h. Em seguida, estes macrófagos foram lavados com PBS e corados com iodeto de propídio por 5 minutos. As lamínulas foram montadas com PBS sob lâmina de microscopia e observadas ao Microscópio Confocal LSM 5 Pascal Zeiss. Células marcadas pelo IP foram consideradas mortas. A percentagem de células que estavam em apoptose foi calculada utilizando a média da contagem em 3 experimentos. Em cada experimento foram contadas 200 células.

4.7 ANÁLISE DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM HMP

4.7.1 Microscopia Óptica

Macrófagos foram cultivados como descrito no item 4.2 e tratados por 1 hora com 50 µg/mL de HMP e, posteriormente, processados para microscopia óptica como descrito no item 4.4.2.

4.7.2 Microscopia Óptica de Fluorescência - detecção de filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários (vimentina)

Macrófagos foram cultivados como descrito no item 4.2 e tratados por 24h com a concentração de 50 µg/mL. As células foram fixadas em paraformaldeído 4% em tampão PHEM 0,1 M por 1 hora. Em seguida as células foram permeabilizadas em 0,3% Triton-X, lavadas em PBS e os sítios de ligação foram bloqueados com solução de NH₄Cl 50mM. Foram realizadas lavagens com PBS suplementado com 1 e 3% de BSA. Para detecção de filamentos de actina, as células foram incubadas com fluorocromo Faloidina (Molecular Probes Invitrogen®) diluído 1:200 em PBS com 1% de BSA durante 40 minutos, seguido de lavagem em PBS 3% BSA e PBS 1% BSA. Ou incubadas com anticorpo antitubulina (Molecular Probes Invitrogen®) diluído 1:100 em PBS 1% durante 1 hora, para detecção de microtúbulo. Ou ainda, incubadas com anticorpo antivimentina diluído 1:100, seguido de lavagem e incubação com anticorpo secundário fluorescente (594nm), diluído 1:200 para detecção de filamentos

intermediários. As células foram incubadas com DAPI diluído 1:10 em PBS por 30 minutos para marcação do núcleo, sendo lavadas em PBS e água. As lamínulas foram montadas em lâmina contendo o *ProLong Gold antifade reagent* (Molecular Probes Invitrogen®) e observadas em microscópio óptico de fluorescência. As células marcadas com Faloidina e com anticorpo anti-vimentina foram analisadas em filtro de 594 nm. A marcação com DAPI foi analisada em filtro de 365 nm. A análise das células foi realizada utilizando microscópio óptico Axiophot Zeiss.

4.8 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM HMP

4.8.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Macrófagos foram cultivados em garrafas de cultura como descrito no item 4.2 e tratados por 1 hora na concentração de 50 µg/mL. Posteriormente, foram fixados em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído a 25%, 4% de paraformaldeído, 2,5% de sacarose, em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2. Após a fixação as células foram lavadas 3 vezes em Tampão cacodilato 0.1 M e posteriormente incubadas em solução contendo: 1% tetróxido de ósmio, ferrocianeto de potássio 0,8% por 1 hora à temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,1 M e então desidratadas em série crescente de acetona durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após desidratação as células foram lentamente impregnadas em resina Epon nas seguintes concentrações: 2:1, 1:1 e 1:2 (acetona 100%: Epon - 12 horas em cada etapa). A seguir o material foi colocado em Epon puro por 6 horas e depois no suporte para polimerização a 60° C por 48 horas. Os blocos polimerizados foram cortados em ultramicrótomo (Leica EM UC6) e os cortes obtidos foram contrastados durante 20 minutos com acetato de uranila 5%, e posteriormente durante 5 minutos com citrato de chumbo e observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão LEO 906 E.

4.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Macrófagos foram cultivados, tratados e processados como descrito no item 4.7.1 em lamínulas de vidro. A desidratação foi realizada em uma série de etanol (Merck) em água a 30, 50, 70, 90% (10 minutos cada etapa) e 100% (3 vezes durante 10 minutos). As amostras foram secas pelo método do ponto crítico (Modelo K 850 - Marca EMITECH) usando CO₂. As lamínulas foram fixadas em suporte apropriado (stub) e metalizadas com uma película de ouro de aproximadamente 2nm de espessura, usando o aparelho *Emitech K550-England*. As células foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura LEO 1450VP. Como controles foram utilizados macrófagos sem tratamento.

4.9 RESPOSTA MICROBICIDA DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM HMP

4.9.1 Detecção de radicais superóxido em macrófagos tratados com HMP

Macrófagos (5×10^5 células por poço) foram cultivados em placa de cultura de 24 poços como descrito no item 4.2. As células foram lavadas com PBS e incubadas com meio contendo 0,5 mg/ml de Nitroblue Tetrazolium (NBT) e 50 µg/mL de HMP. Como controle positivo foi utilizado Zymozan A, *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma). Após 1 h a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂, as células foram lavadas com meio e fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, desidratadas e montadas como descrito no item 4.4.2 Após a montagem as células foram analisadas em microscópio óptico Olympus BX41.

4.9.2 Detecção de radicais superóxido em macrófagos infectados com *Leishmania* e tratados com HMP

Macrófagos (5×10^5 células por poço) foram cultivados em placa de cultura como descrito no item 4.2. As células foram lavadas com PBS e incubadas com meio contendo 0,5 mg/ml de Nitroblue Tetrazolium (NBT), 1:10 parasitos e com 50 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado Zymozan A (Sigma). Após 1 h a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂, as células foram lavadas com meio e fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, desidratadas e montadas como descrito no item 4.4.2.

4.9.3 Produção de óxido nítrico pela célula hospedeira tratada com HMP

A determinação da concentração de nitrito no meio de cultura é uma forma indireta de se determinar a concentração NO produzido por macrófagos tratados e não tratados por 1 hora com 10, 20, 50 e 600 µg/mL de HMP em diferentes períodos.

Este procedimento foi realizado utilizando-se o método de Griess, que consiste em adicionar 50 µl do reagente de Griess (sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e Naftilenodiamina a 0,1% em água destilada) a 50 µl do sobrenadante dos macrófagos tratados ou não com HMP, em diferentes períodos. A leitura foi feita por espectrofotometria sobre um comprimento de onda de 570 nm, e a concentração de nitrito é expressa em µM de acordo com a curva padrão estabelecida.

4.9.4 Dosagem da atividade da enzima fosfatase ácida (AcP) em macrófagos tratados com HMP

Células tratadas com 20 e 50 µg/mL foram submetidas a dosagem da enzima AcP utilizando o kit *Sigma Diagnostics Acid Phosphatase* de acordo com as instruções do fabricante.

4.9.5 Detecção da enzima fosfatase ácida (AcP) em macrófagos tratados com HMP através da MET

Macrófagos foram cultivados como descrito no item 4.2 e tratados com 50 µg/mL. A detecção da AcP foi realizada através de reação citoquímica para análise em MET. A técnica foi realizada de acordo com Lopes *et al.*, 2006. Os macrófagos tratados com HMP ou não e macrófagos submetidos à interação com Zimozan, foram pré-fixados com glutaraldeído (1%) e tampão cacodilato. Posteriormente foram lavados em tampão e incubados em meio adequado à enzima AcPase por 1 h à 37°C. O meio de incubação continha β-Glicerofosfato (substrato da enzima) e cloreto de cério (agente de captura). O Cério forma um complexo com o fosfato e é visualizado ao MET como um precipitado eletrondenso. A incubação foi realizada com os seguintes controles: células sem tratamento e células submetidas à interação com Zimozan foram submetidas à incubação em meio descrito anteriormente. Como controle negativo, macrófagos com Zimozan foram incubados em meio sem a presença do substrato da enzima. Após a incubação, as células foram lavadas, fixadas e processadas para MET como des-

crito no item 4.8.1. Os cortes obtidos não foram contrastados.

4.10 INTERAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* COM MACRÓFAGOS TRATADOS COM HMP

As células hospedeiras utilizadas no ensaio foram obtidas como descrito no item 4.2. Para observar o efeito do HMP sobre a capacidade fagocítica dos macrófagos, as células foram tratadas por 24 horas. Em seguida, foi realizada a interação com leveduras numa proporção de (1:10) durante 2 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e os macrófagos lavados com PBS, pH 7.2, por três vezes, para retirar as leveduras não internalizadas, sendo processadas como descrito no item 4.4.2.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando o Biostat 4.0. O teste usado foi a análise de variância, ANOVA, e Teste t de Student, com $p < 0,05$ (AYRES *et al.*, 2006).

5 RESULTADOS

5.1 AÇÃO LEISHMANICIDA DO 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL- γ -PIRONA

5.1.1 Atividade antipromastigota

Para análise da atividade antipromastigota, promastigotas de *L.amazonensis* foram tratadas durante 5 dias com 20 e 50 μ g/mL e também com 1mg/mL de HMP. Foi observada uma diminuição do crescimento de promastigotas a partir do 1º dia de tratamento quando comparado à curva de crescimento padrão para *Leishmania* (Controle) que apresentou uma fase exponencial de crescimento nos primeiros 4 dias de cultivo. Após 5 dias, foi detectada uma diminuição de 62% (IC₅₀ 30,6 μ g/mL) no crescimento de promastigotas, quando tratadas na concentração de 50 μ g/mL (Figura 4).

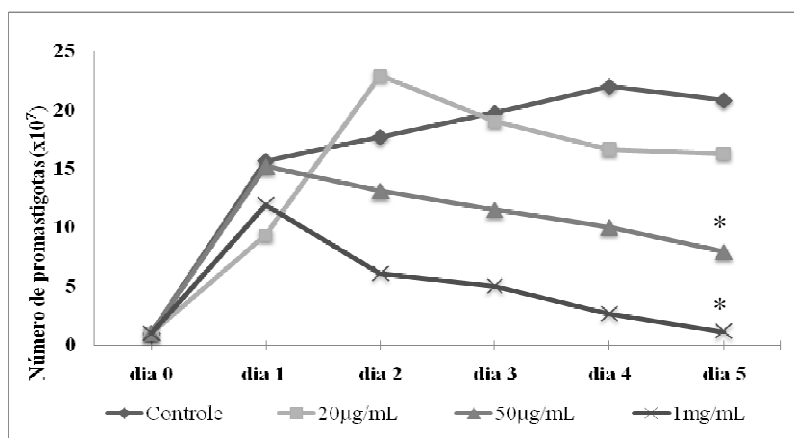


Figura 4. Atividade antipromastigota do HMP sobre *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas por 5 dias.

Foi utilizado ANOVA, Teste de t Student. (*) $p < 0,05$ representa a diferença entre células tratadas e o controle sem tratamento.

5.1.2 Atividade antiamastigota

Para avaliar a atividade antiamastigota do HMP, macrófagos infectados com *L. amazonensis* foram tratados diariamente por 1 h durante 3 dias. Foi observada uma diminuição de 79% (IC₅₀ 3,3 μ g/mL) no número de amastigotas após o tratamento com 50 μ g/mL (Figura 5).

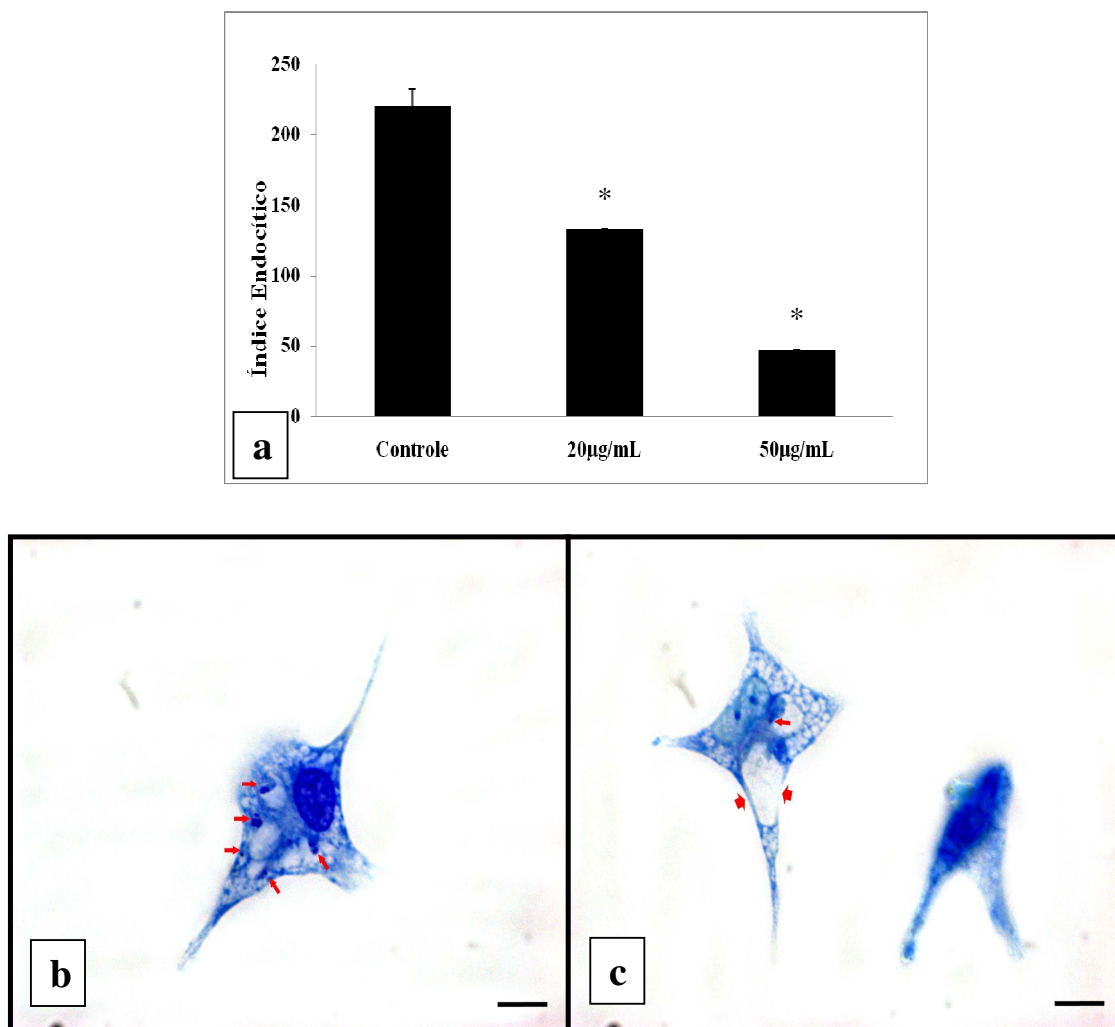


Figura 5. Índice endocítico de macrófagos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* e tratados com HMP por uma hora durante 3 dias consecutivos.

(a) Gráfico do índice endocítico. Foi utilizado ANOVA, t Student. (*) $p < 0,05$ representa a diferença entre células tratadas e o controle sem tratamento. (b) Macrófagos residentes sem tratamento. Observar vacúolos característicos com grande número de formas amastigotas (setas alongadas). (c) Macrófagos infectados e tratados. Notar vacúolo característico da infecção por *L. amazonensis* (setas curtas) com poucas formas amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo (setas alongadas). Barra 10 μm .

5.2 ANÁLISE DA CÉLULA HOSPEDEIRA

5.2.1 Viabilidade celular

Para análise do efeito do HMP sobre a célula hospedeira, macrófagos foram tratados com 10 a 700 $\mu\text{g/mL}$ da droga por 1 hora e mantidos em cultivo por 24 h. Foram utilizados dois testes:

a) MTT

O método do MTT detecta a viabilidade das células tratadas através da análise da atividade das desidrogenases presentes na mitocôndria da célula. No presente estudo não houve uma diminuição significativa de células viáveis (figura 6) após tratamento quando comparados ao controle. Como controle negativo, as células foram mortas com solução de 10% de formol em PBS.

b) Iodeto de Propídio (IP)

Para análise de morte celular foi utilizado o IP, onde apenas as células mortas são capazes de reter o corante. Não foi observado aumento no número de células mortas tratadas com o HMP.

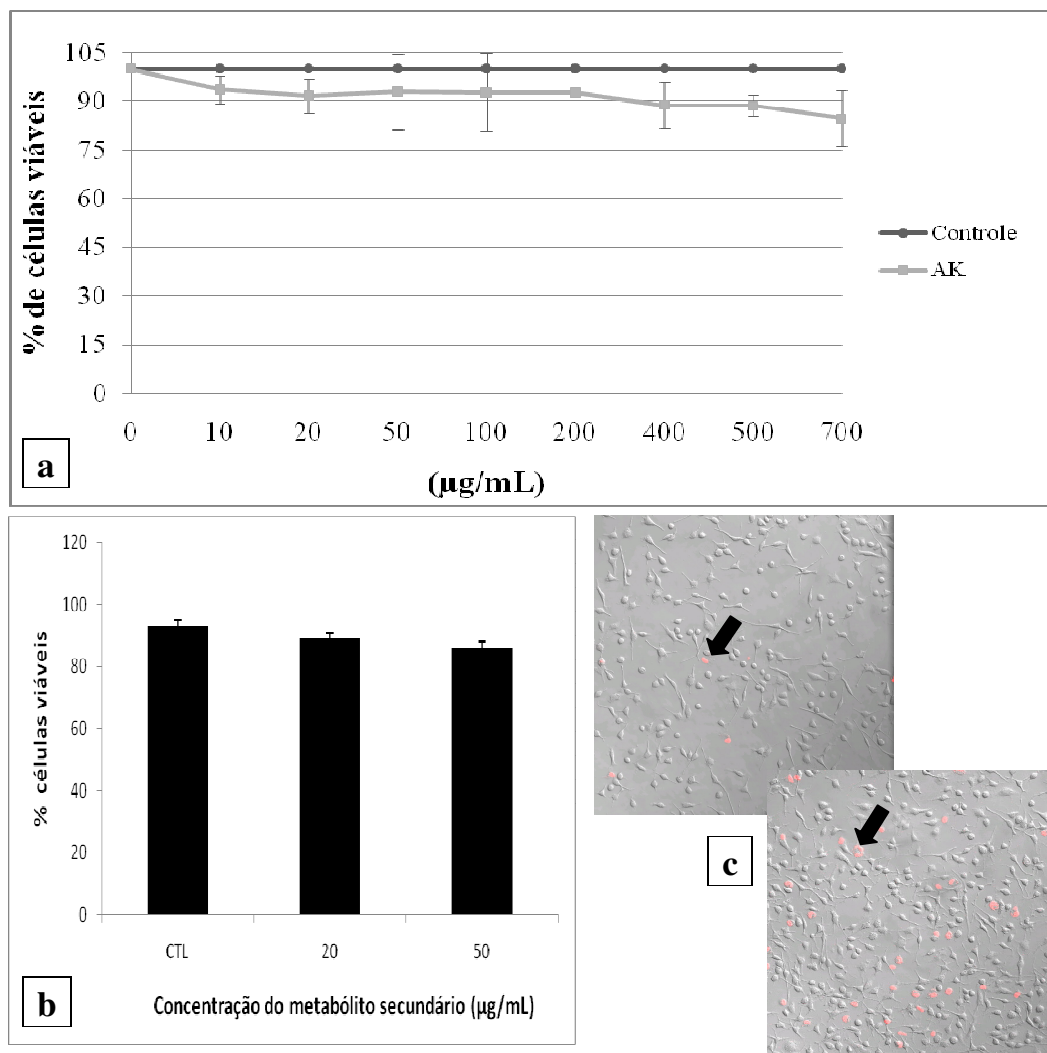


Figura 6. Análise da viabilidade celular.

(a) Viabilidade celular através do método MTT em macrófagos tratados com HMP por 1 hora e mantidos em cultivo por 24 horas. (b) Morte celular detectada através da marcação com iodeto de propídio em macrófagos tratados com 20 e 50 µg/mL HMP. (c) Macrófagos foram observados em microscópio confocal e as imagens foram utilizadas para realizar a contagem de células vivas e mortas. Em vermelho células mortas marcadas com iodeto de propídio (setas).

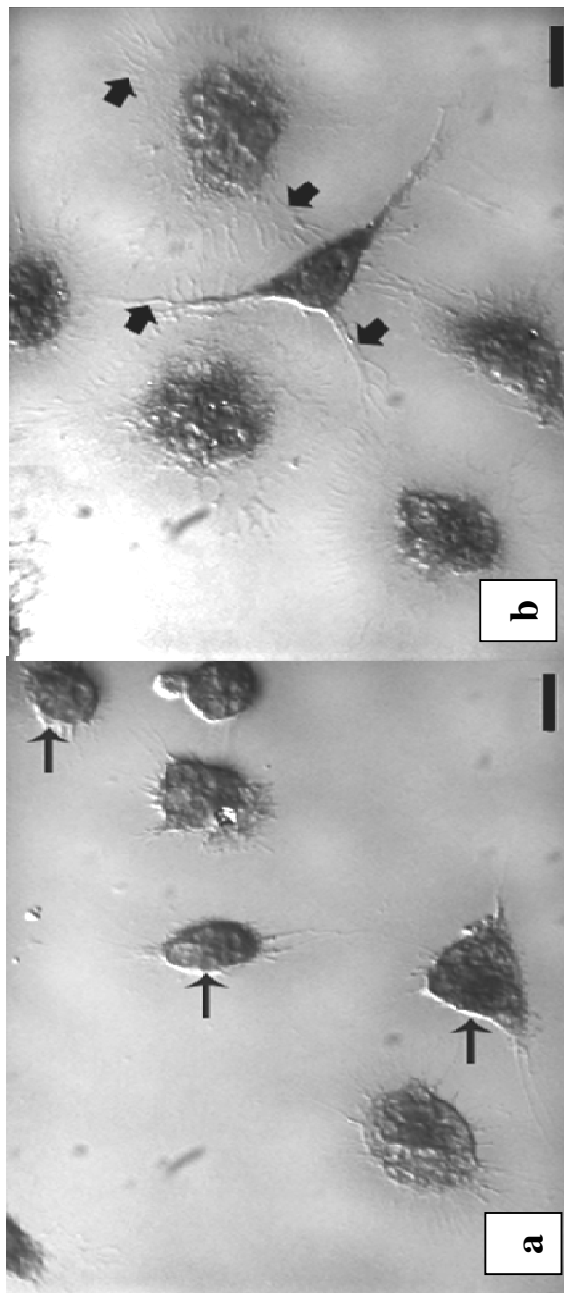
5.2.2 Microscopia Óptica

A análise morfológica da célula hospedeira tratada por 1 hora com 50 $\mu\text{g/mL}$ de HMP foi realizada sob microscopia óptica de campo claro (coloração de Giemsa). Foi observado um aumento na quantidade de vacúolos, filopódios e maior espraiamento e adesão celular em macrófagos tratados (Figura 7).

Figura 7. Análise morfológica de macrófagos tratados com HMP por 1 hora e corados com Giemsa.

(a) Controle sem tratamento. Observar aspecto geral da célula com pequenos filopódios (seta alongada). (b) Macrófagos tratados com 50 $\mu\text{g/mL}$. Observar a presença de longos filopódios (setas curtas), presença de vacuolos e aumento do espriamento celular.

Figura 7



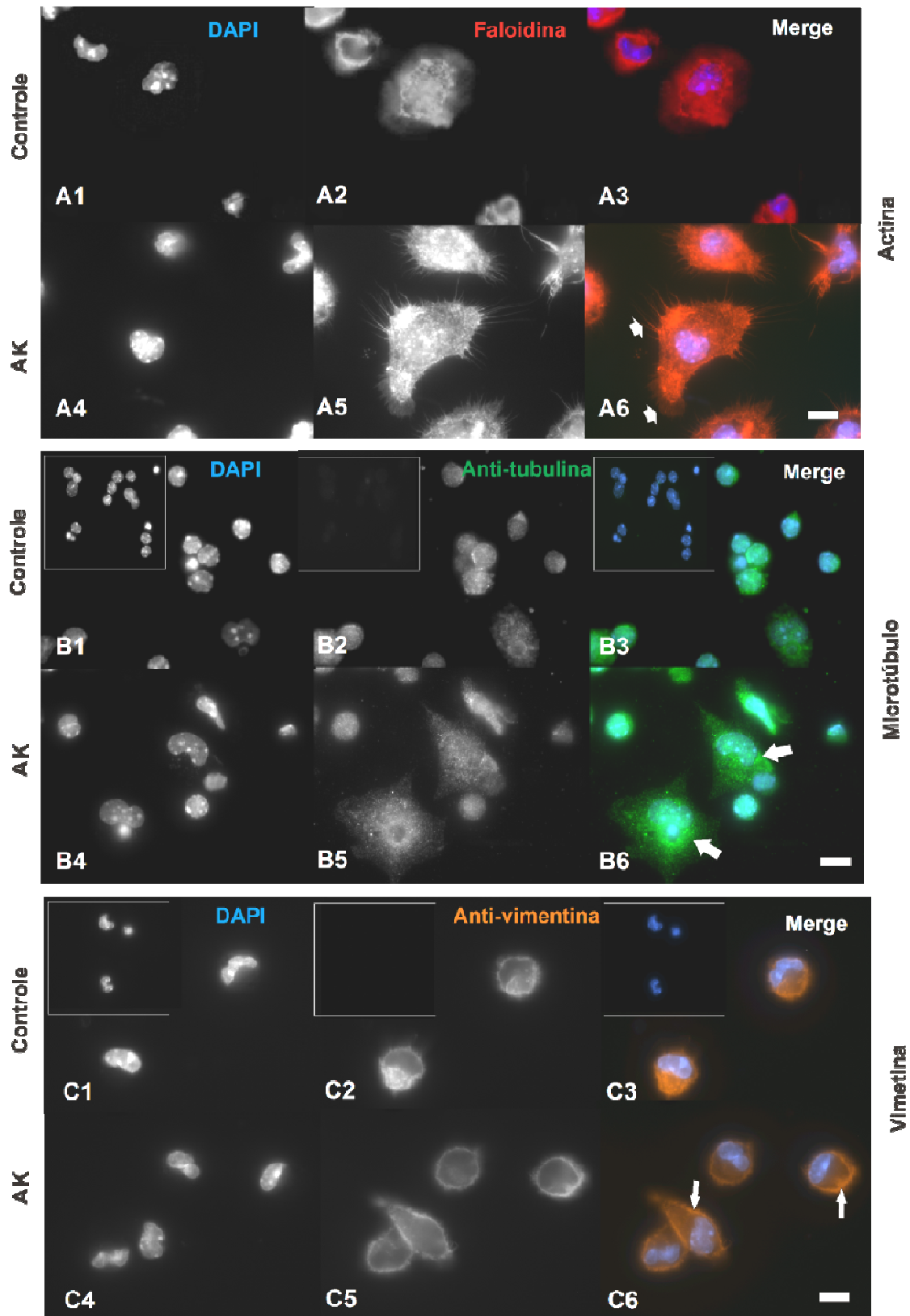
5.2.3 Microscopia Óptica de Fluorescência

Os componentes do citoesqueleto de macrófagos tratados e não tratados foram analisados usando microscopia de fluorescência (Figura 8). Células não tratadas demonstraram características semelhantes a macrófagos residentes para filamentos de actina (Figura 8 a1-a3), microtúbulos (Figura 8 b1-b3) e para vimentina (Figura 8 c1-c3). Macrófagos tratados com 50 µg/mL por 1 h demonstraram alterações expressivas, especialmente para a disposição de filamentos de actina, com formação de filopódios e uma concentração de actina nessas regiões (Figura 8 a4-a6, setas pequenas). A marcação para microtúbulo demonstrou a polimerização deste componente, estendendo-se da membrana nuclear até a membrana celular (Figura 8 b4-b6, setas). Foi observado uma distribuição periférica dos filamentos de vimentina em células tratadas (Figura 8 c4-c6, setas finas). O DAPI foi utilizado para identificação e análise de possíveis alterações nucleares. Não foi detectada nenhuma alteração significativa no núcleo. As células foram analisadas em Microscópio Óptico de Fluorescência Axiophot Zeiss.

Figura 8. Detecção de componentes do citoesqueleto em macrófagos tratados com 50 µg/mL de HMP.

(a1-a6) Detecção de filamentos de actina com Faloidina e DAPI em células não tratadas (a1-a3) e células tratadas com HMP (a4-a6) demonstrando a formação de filopódios (setas pequenas); (b1-b6) Detecção de microtúbulos com anticorpo anti-tubulina e DAPI em células não tratadas (b1-b3) e células tratadas com HMP (b4-b6) demonstrando a polimerização de microtúbulos se estendendo do núcleo até a membrana celular (setas); (c1-c6) Detecção de filamentos intermediários (vimentina) com anticorpo anti-vimentina e DAPI em células não tratadas (c1-c3) e células tratadas com HMP (c4-c6) demonstrando a distribuição de vimentina na superfície celular (setas finas). *Inset*: Controle negativo, macrófagos incubados omitindo o anticorpo primário. Barra: 10µm.

Figura 8



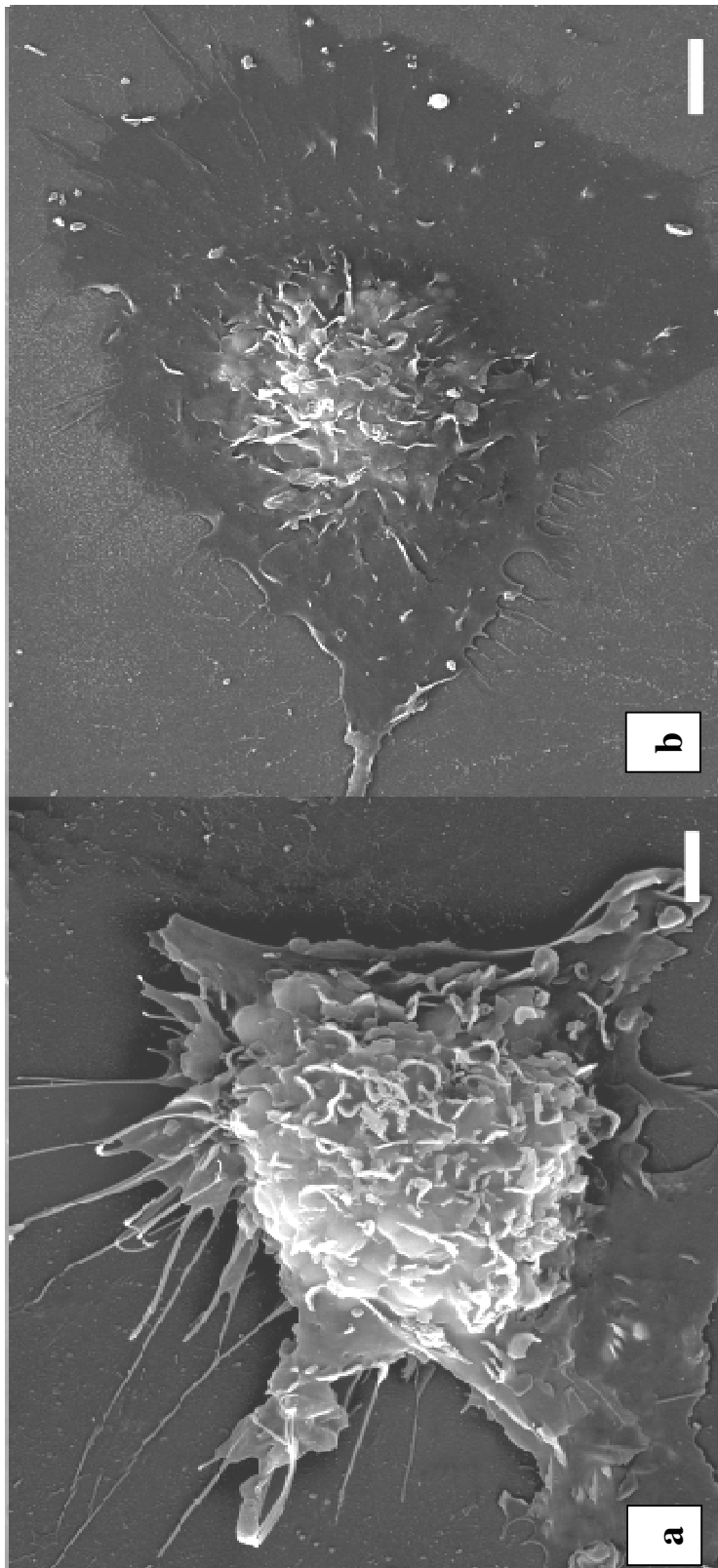
5.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Devido ao espraiamento observado através de MO, macrófagos tratados com 50 $\mu\text{g/mL}$ de HMP foram observados por MEV para uma análise mais detalhada da formação de filopódios e espraiamento. Foi possível observar a presença de muitos filopódios e maior espraiamento e adesão nas células tratadas (Figura 9 b) quando comparadas às células não tratadas (controle – Figura 9 a).

Figura 9. Alterações ultraestruturais em macrófagos tratados com HMP observados através de MEV.

(a) Macrófagos residentes sem tratamento. (b) Células tratadas apresentando várias projeções citoplasmáticas e maior espraçamento quando comparadas às células não tratadas. Barras: 1 μm .

Figura 9



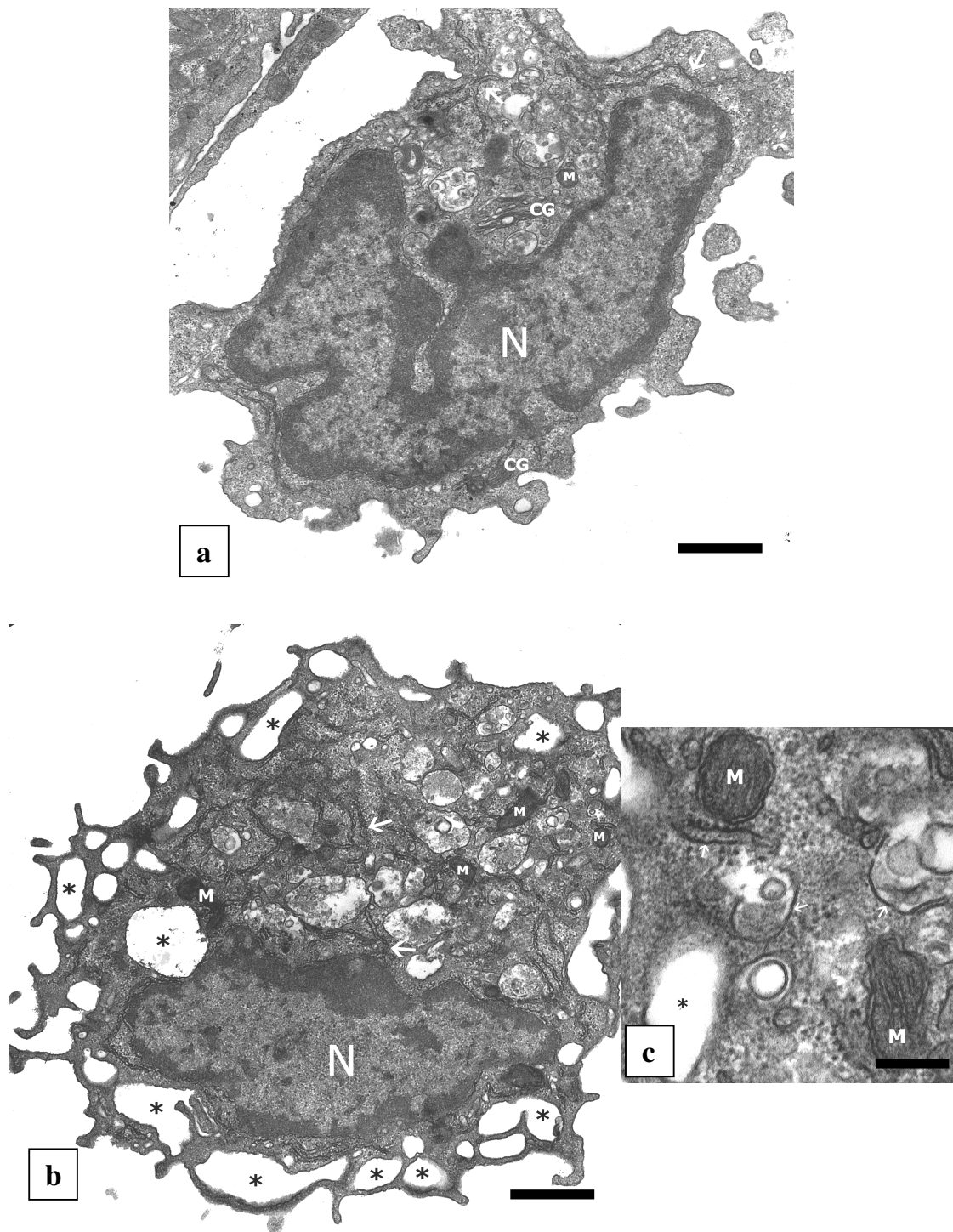
5.2.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para obtenção de maiores detalhes acerca da ação do HMP sobre organelas da célula hospedeira, macrófagos tratados com 50 µg/mL de HMP foram analisados por MET. Foi observado a presença de filopódios e vacúolos em células tratadas (Figura 10 b, asteriscos). Não houve alterações nas organelas citoplasmáticas, como mitocôndria (Figura 10 c), retículos endoplasmáticos ou mesmo no núcleo da célula tratada quando comparadas às células não tratadas (Figura 10 a)

Figura 10. Análise ultraestrutural em MET de macrófagos tratados com 50 µg/mL de HMP.

(a) Controle sem tratamento. Observar célula sem presença de vacúolos e com organelas citoplasmáticas com características de macrófagos residentes, retículo endoplasmático em pouca quantidade (setas). (b) Macrófagos tratados com 50 µg/mL de HMP. Observar grande quantidade de vacúolos (*) e filopódios, além da presença de mitocôndrias sem alterações e retículo endoplasmático (setas). (c) Maior aumento de (b) mostrando detalhes das mitocôndrias sem alterações e retículo endoplasmático (setas). N: Núcleo, CG :Complexo de Golgi, M: Mitocôndria. Barras (a-b) 1 µm; (c) 0,1 µm.

Figura 10



5.3 EFEITO DO HMP NO ÍNDICE ENDOCÍTICO DE *Saccharomyces cerevisiae*

A análise da atividade fagocítica foi realizada utilizando macrófagos tratados com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HMP por 1 h e submetidos à interação com *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente, foi realizada a contagem do número de partículas fagocitadas em microscópio óptico de campo claro. Foi observado aumento do índice fagocítico em células tratadas com HMP (Figura 11).

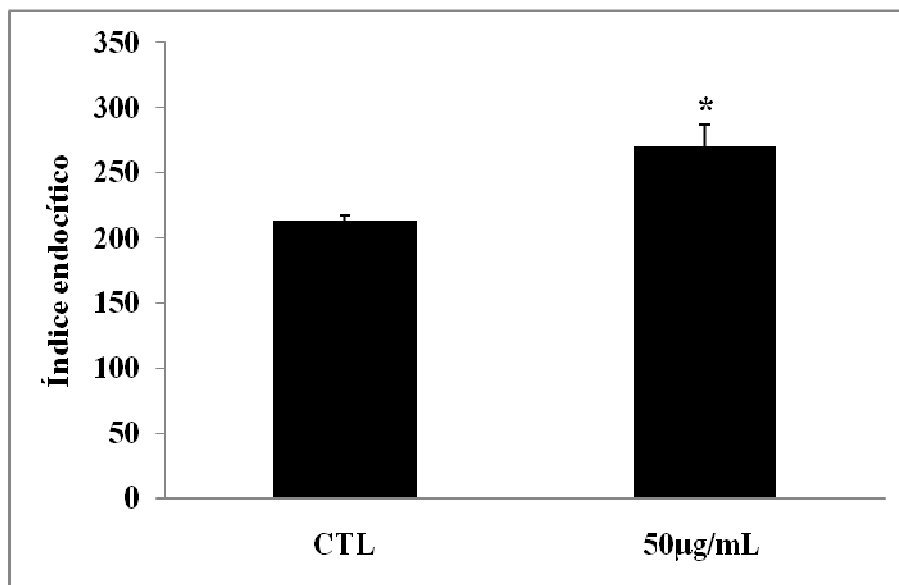


Figura 11. Índice endocítico de macrófagos tratados com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HMP por 1 h, seguido da interação por 2h com *Saccharomyces cerevisiae*.

5.4 ATIVIDADE MICROBICIDA DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM HMP

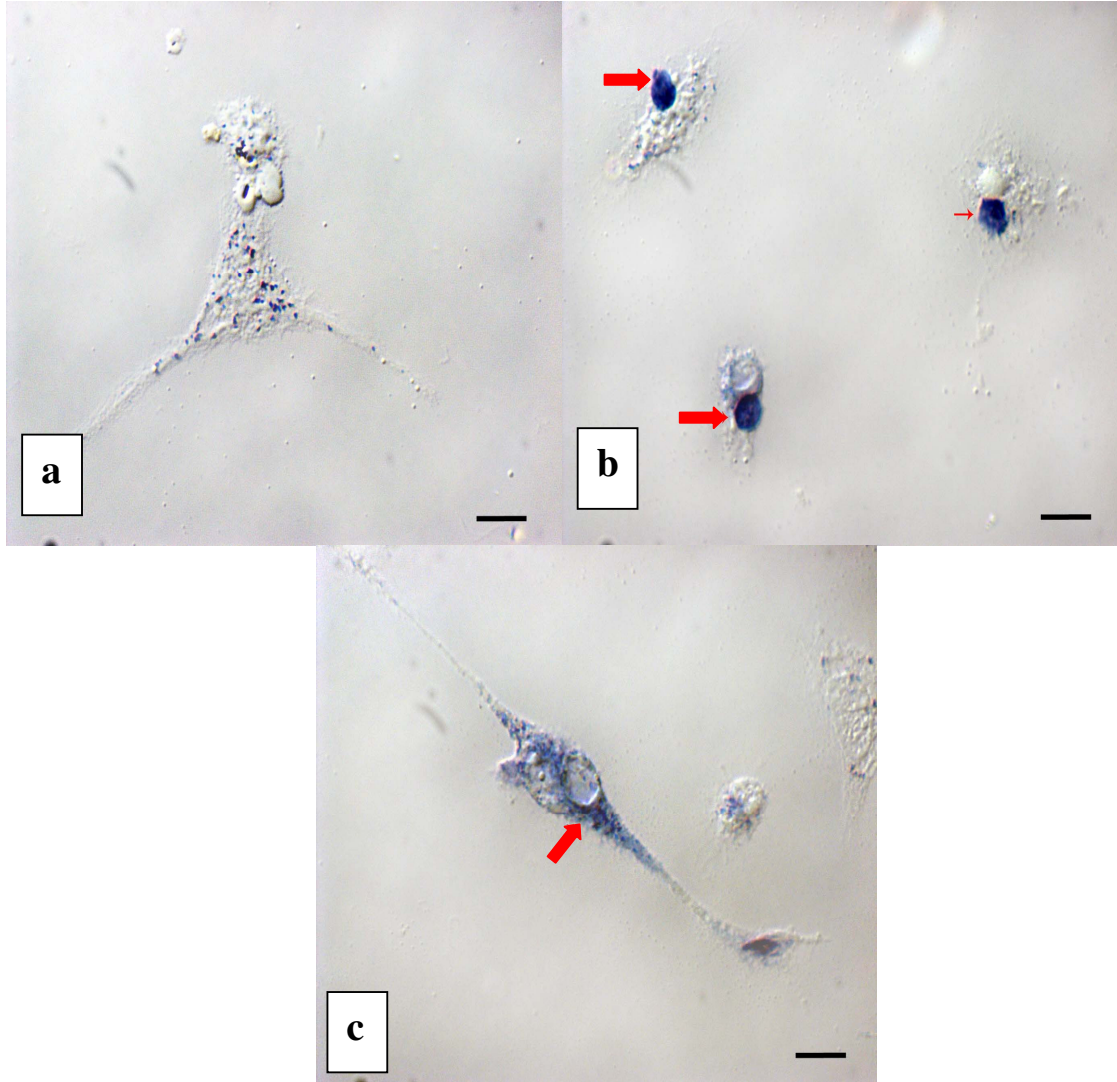
5.4.1 Produção de superóxidos por macrófagos tratados com HMP

A produção de superóxido foi detectada em macrófagos tratados com 50 $\mu\text{g/mL}$ a partir de reação citoquímica com NBT. Macrófagos tratados apresentaram intensa atividade da enzima por toda a célula (Figura 12 c). Um controle negativo (Figura 12 a) e um controle positivo (Figura 12 b) foram utilizados para confirmar a especificidade da reação. A análise foi feita em contraste interferencial de Normaski com objetiva de 100x em microscópio óptico Axiophot Zeiss.

Figura 12. Detecção da produção de superóxido através da reação citoquímica com NBT em macrófagos tratados com HMP por 1 h.

(a) Controle negativo da reação, macrófagos não tratados e não-infectados. Observar a ausência de reação. (b) Controle positivo em macrófagos infectados com Zimozan A (Sigma). Observar reação no local da infecção (setas). (c) Macrófagos tratados com 50 µg/mL de HMP por 1 hora. Observar reação por toda a célula (seta). Barra: 10 µm.

Figura 12



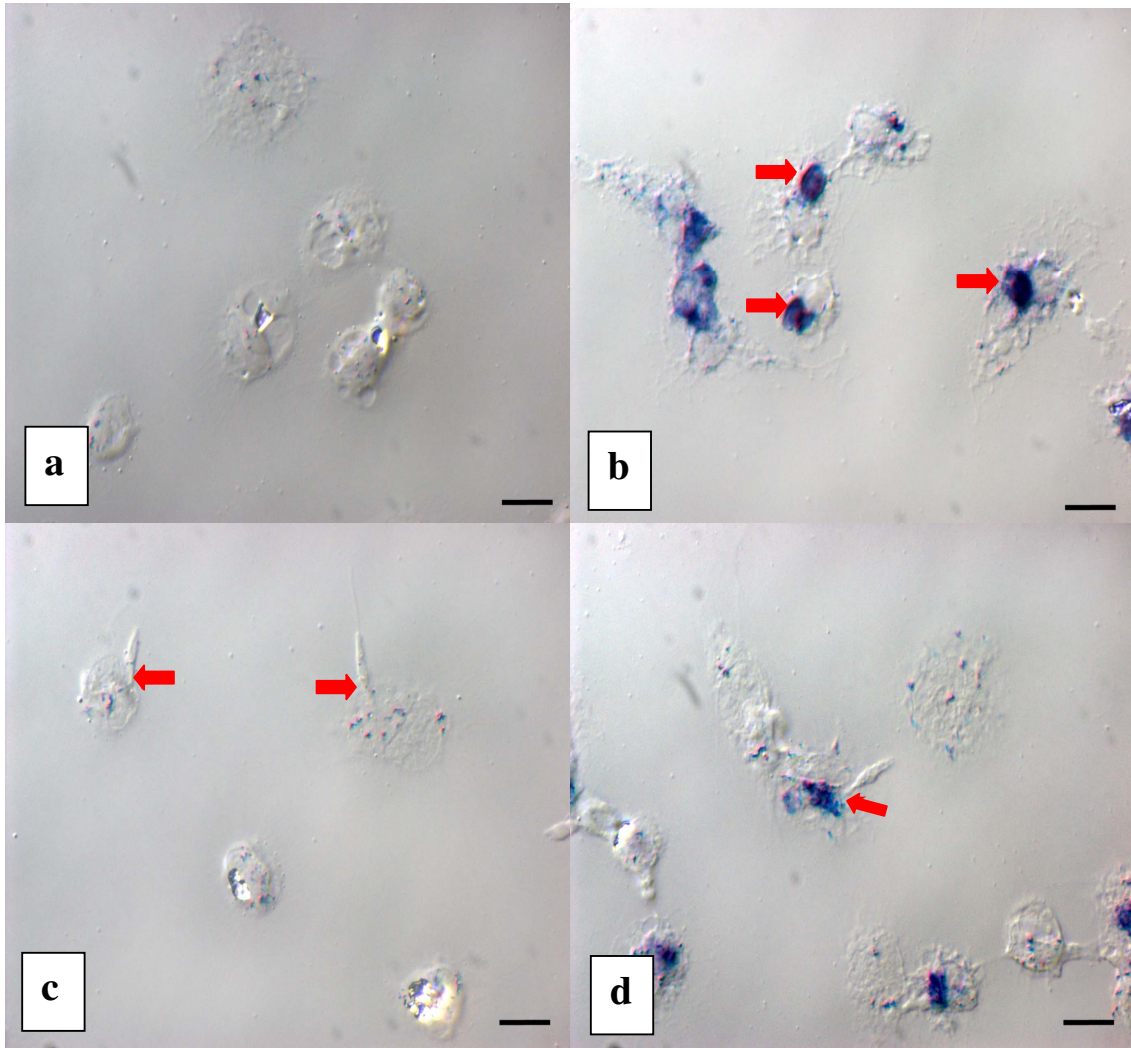
5.4.2 Produção de superóxidos por macrófagos infectados e tratados com HMP

A produção de superóxido foi detectada em macrófagos tratados com 50 µg/mL de HMP e infectados com *L. amazonensis* a partir de reação citoquímica com NBT. Macrófagos tratados e infectados apresentaram atividade da enzima no local da adesão de formas promastigotas de *Leishmania* (Figura 12 d - seta). Um controle negativo (Figura 12 a) e um controle positivo (Figura 12 b) foram realizados para confirmar a especificidade da reação e um controle apenas com interação com *L. amazonensis* (Figura 12 c) foi feito para demonstrar a inibição da produção de radicais de oxigênio por esta espécie de *Leishmania* (seta).

Figura 13. Detecção da produção de superóxido através da reação citoquímica com NBT em macrófagos infectados e tratados por 1 hora com HMP

(a) Controle negativo da reação, macrófagos não tratados e não-infectados. Observar a ausência de reação. (b) Controle positivo, macrófagos infectados com Zimozan A (Sigma). Observar reação no local da infecção (setas). (c) Macrófagos com *Leishmania* aderida à superfície. Observar a ausência de reação devido a inibição da produção de radicais de oxigênio pela *L. amazonensis* (setas) (d) Macrófagos infectados e tratados com 50 µg/mL de HMP por 1 hora. Observar reação na célula, mesmo com a presença da forma promastigota aderida à superfície da célula hospedeira (seta). Barra: 10 µm.

Figura 13



5.4.3 Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos tratados com HMP

Para analisar se houve produção de NO em macrófagos tratados com HMP, células foram tratadas por 1h com a droga e mantidas em cultivo por 24 h.

A análise da produção de NO mostrou que não houve produção significativa de NO em células tratadas por 1 hora com 10, 20, 50 e 600 $\mu\text{g/mL}$ de HMP quando comparadas ao controle sem tratamento e às células estimuladas com $\text{INF-}\gamma$. (Figura 14).

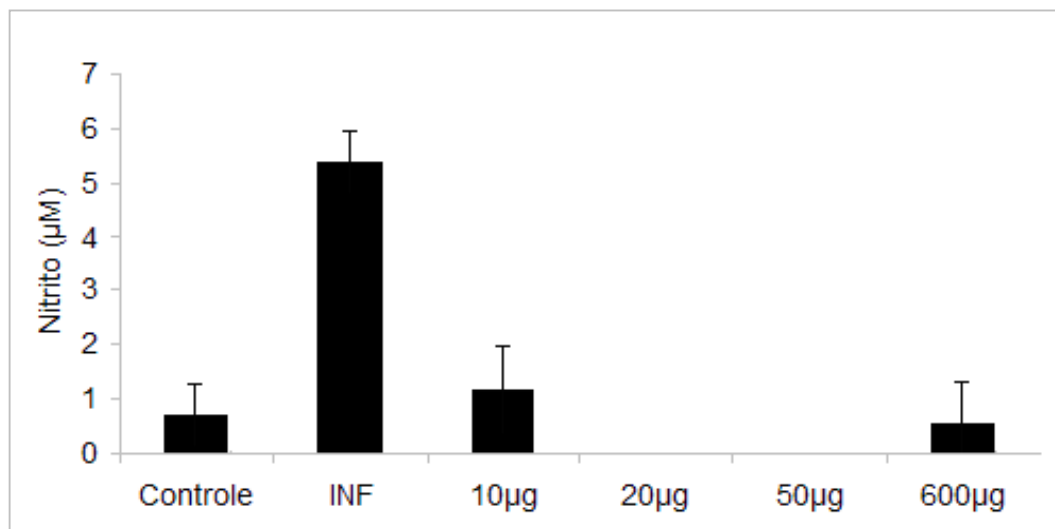


Figura 14. Produção de NO por células tratadas com HMP.

INF: Macrófagos estimulados com Interferon- γ .

5.4.4 Atividade da enzima fosfatase ácida (AcP) por macrófagos tratados com HMP

Para análise da atividade da enzima AcP, foram utilizados macrófagos tratados com HMP por 1 hora. Foram realizadas duas análises:

a) Análise quantitativa

Macrófagos tratados com HMP foram utilizados para determinação da atividade da AcP. Não foi detectada diferença na atividade da enzima AcP em células tratadas por 1 hora com 20 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de HMP, mantidas por 24 horas em cultivo, quando comparadas ao controle sem tratamento (Figura 15).

b) Análise qualitativa

Macrófagos tratados por 1 h com HMP e mantidos em cultivo por 24 h foram utilizados para análise citoquímica em MET para detecção da atividade da enzima AcP. Foi possível observar, em células tratadas (Figura 16 d), a presença de poucos vacúolos periféricos contendo material eletrodense quando comparados ao controle positivo, células sem tratamento submetidas à interação com Zimozan (Figura 16 c).

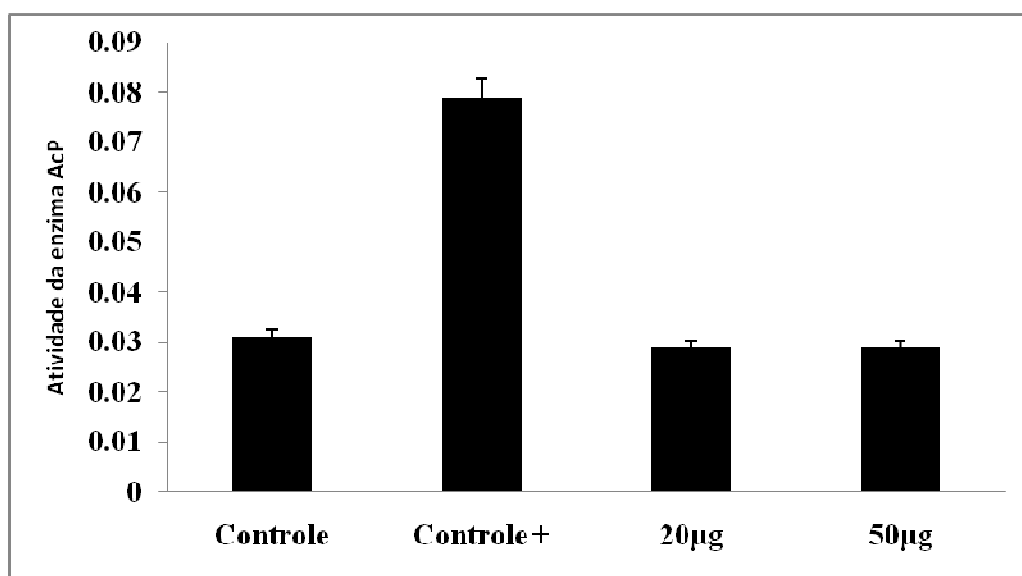
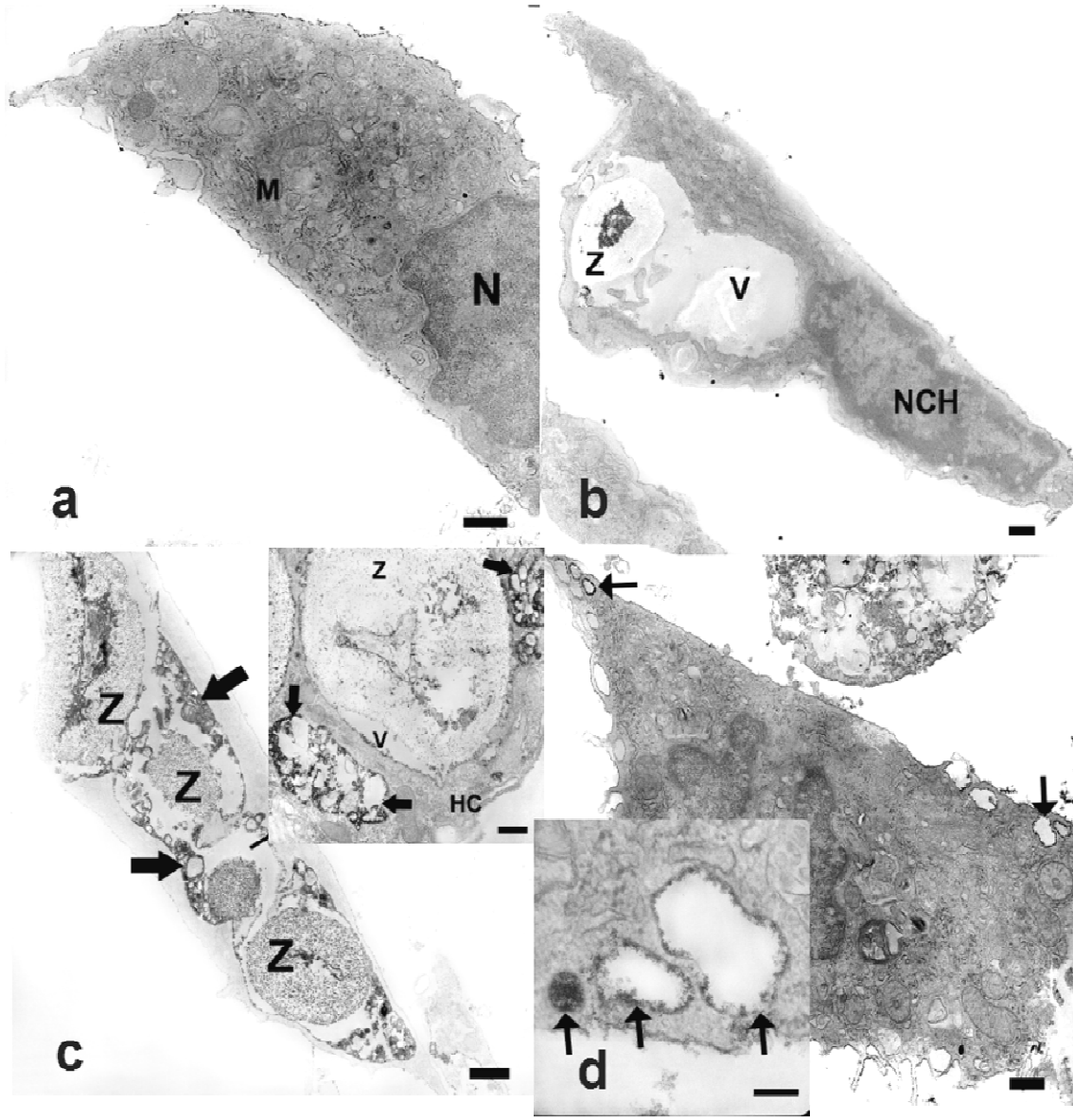


Figura 15. Gráfico da atividade enzimática da AcP em células tratadas com HMP.

Figura 16. Citoquímica para detecção da atividade da enzima AcP em macrófagos tratados com HMP e analisados através de MET.

(a) Macrófagos não tratados. (b) Controle da reação. Macrófagos não tratados seguido da interação com Zimozan, incubados na ausência do substrato para enzima. Notar ausência da reação. (c) Macrófagos não tratados seguido da interação com Zimozan. Observar presença de material eletrodenso (setas) no interior de vacúolos contendo Zimozan (*inset*). (d) Macrófagos tratados com HMP e sem interação. Observar pequena atividade da enzima (setas), com pouco precipitado eletrodenso em alguns vacúolos (*inset*). N: núcleo; Z: zimozan; NCH: núcleo da célula hospedeira; V: vacúolo. Barras: (a-b, d, *inset* c) 2 μm ; (c) 3 μm , *inset* d 0,5 μm .

Figura 16



6 DISCUSSÃO

A atividade microbicida da célula hospedeira para destruição do microorganismo invasor envolve uma série de alterações na célula hospedeira. Os macrófagos são as principais células de defesa envolvidas no controle e/ou desenvolvimento das leishmanioses. Quando entram em contato com o parasito sofrem diversas alterações morfológicas e fisiológicas, como aumento do espriamento e adesão celular, a produção de radicais de oxigênio e superóxidos e promoção de uma resposta imune específica (KOBAYASHI *et al.*, 2005). Inicialmente, foi verificado no presente estudo se macrófagos infectados e tratados com HMP reduziram os parasitos intracelulares de uma maneira dose-dependente. A partir dos resultados obtidos foi possível observar que houve uma redução significativa do número de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* utilizando de 50 µg/mL, sendo esta redução de 62% quando comparado àquelas sem tratamento e de 79% no número de amastigotas em células parasitadas.

Resultados semelhantes foram observados com outros metabólitos e compostos extraídos de fungos. Roy *et al.* (1990) ao analisar a ação de uma micotoxina, a faseolinona, sobre *L. donovani*, obteve uma diminuição de 90% no crescimento de formas promastigotas tratadas com 50 µg/mL. Outro metabólito isolado do fungo *Nigrospora sphaerica*, a afidicolina, utilizado como inibidor do ciclo celular, demonstrou efeito sobre promastigotas de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. enriettii*, *L. major* e amastigotas de *L. donovani* (KAYSER *et al.*, 2001). Além disso, as substâncias hipocrelina A e B, que são pigmentos isolados de fungos *Hypocrella banbusa*, também demonstraram efeito contra *L. donovani*, sendo que a hipocrelina A parece ser mais eficaz que a B e até mesmo que a pentamidina e anfotericina B (MA *et al.*, 2004). Um composto proveniente do cogumelo *Merulius incarnates* também demonstrou efeito sobre promastigotas de *Leishmania* (JIN & ZJAWIONY, 2006).

Os resultados encontrados na literatura relacionados a atuação de metabólitos de fungos sobre a *Leishmania* analisaram apenas ação sobre o parasito. Poucos destes estudos demonstraram o efeito dos metabólitos sobre a célula hospedeira, especialmente macrófagos.

O macrófago é a principal célula envolvida na resposta imune celular contra protozoários do gênero *Leishmania* presentes em indivíduos infectados. O controle da doença somente é possível através da ativação das células hospedeiras contra os mecanismos de escape do parasito. Sendo assim, vários medicamentos estão sendo analisados com a finalidade de ativar a célula hospedeira, sem causar efeitos colaterais e ao mesmo tempo inibir os mecanismos desenvolvidos pelo parasito para burlar a resposta imune das células fagocíticas. Entretanto, diversos medicamentos utilizados para tratamento das leishmanioses como, por exemplo, os

antimoniais, as pentamidinas e a anfotericina, atualmente não têm demonstrado eficácia devido à resistência criada por essas drogas em diferentes espécies de *Leishmanias* (SINGH & SIVAKUMAR, 2004; AMEEN, 2007). Portanto, a busca pelo uso de medicamentos em baixas doses, que estimulem a resposta microbicida da célula hospedeira, sem alterar sua morfologia ou funções biológicas e que, ainda seja capaz de destruir o parasito, é contínua.

Diversos estudos têm demonstrado que bioprodutos e diferentes drogas têm sido capazes de estimular macrófagos em diferentes aspectos (PEREIRA *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2006; MORROW *et al.*, 2007; TIWARI AND KAKKAR 2009; MAITY *et al.*, 2009). Essa ativação é observada quando ocorre aumento da adesão e espraiamento celular, alteração no índice fagocítico e ativação da resposta microbicida celular, como produção de ROS (BILITEWSKI *et al.*, 2008). No presente trabalho, o uso do 5-hidroxi-2-hidroxi-metil- γ -pirona (HMP) em macrófagos promoveu a ativação destas células com produção de ROS em macrófagos não infectados e também em células infectadas com *L. amazonensis*, espécie capaz de inibir a resposta microbicida da célula hospedeira (BALESTIERI *et al.*, 2004). Niwa & Akamatsu (1991) demonstraram que o AK aumentou a capacidade de neutrófilos produzirem radicais de oxigênio e também o mecanismo de fagocitose. O aumento na produção de ROS também foi observado em macrófagos tratados com extratos provenientes de cogumelos *Lentinus edodes* (LEE *et al.*, 2008). Entretanto, macrófagos tratados com HMP não foram capazes de alterar a produção de Óxido Nítrico (NO). Esse resultado está de acordo com estudos realizados com um polissacarídeo proveniente do fungo *Agaricus brasiliensis* que também não foi capaz de estimular a produção de NO (MARTINS *et al.*, 2008). Essa redução na produção de NO pode estar envolvida com o mecanismo de proteção da célula, uma vez que o NO em excesso é tóxico e possui papel importante na autoregulação da apoptose em macrófagos. Dependendo da quantidade e duração da produção de NO, pode haver uma inibição reversível das funções dos macrófagos, como a formação de pseudópodes, fagocitose e adesão das células ao substrato (JUN *et al.*, 1996; GOTOH *et al.*, 2002; HORTELANO *et al.*, 2003; KHARAZIL *et al.*, 2003; MORI, 2008).

Além da análise da produção de radicais de oxigênio, NO e superóxidos pela célula hospedeira, foi analisada a ação da enzima fosfatase ácida, que é uma hidrolase presente no sistema endossomo/lisossomal que também é utilizada como critério de avaliação da ativação do macrófago e da fusão fagolisossomal (LOPES *et al.*, 2006). Entretanto, não foi observado um aumento na atividade desta enzima em células tratadas com HMP por 1 h. Foi observada a presença de material eletrodense em alguns vacúolos da célula analisado através de reação citoquímica para detecção de AcP em MET.

A maioria das funções de macrófagos ativados, como produção de ROS, adesão celular, espreadimento, fagocitose, apresentação de antígenos entre outras, são reguladas por componentes do citoesqueleto (AMER e SWANSON, 2002; CRUZ *et al.*, 2007; MORROW *et al.*, 2007; CRUME *et al.*, 2007; BILITEWSKI, 2008; MOSSER e EDWARDS, 2008). Assim, além da avaliação da atividade microbicida, também foram observadas alterações em filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários (vimentina) em macrófagos tratados com HMP. O HMP foi capaz de promover a reorganização dos componentes do citoesqueleto. Gupton *et al.* (2002) demonstraram que a estabilidade de microtúbulos contribui para o rearranjo de filamentos de actina e a extensão de filopódios. Esses filamentos proporcionam uma modulação de microtúbulos que contribui para o espreadimento e fagocitose celular (GUPTON *et al.*, 2002). Células tratadas com HMP também demonstraram filamentos de actina dispostos nos filopódios. Alguns produtos microbicidas, como LPS, também são capazes de estabilizar tais filamentos, contribuindo com o aumento da adesão celular (WILLIAM *et al.*, 2000). Além disso, um polissacarídeo proveniente de cogumelo também foi capaz de estimular a formação de filopódios (LEE *et al.*, 2008). A presença de filopódios e espreadimento celular também foi observada através da MEV no presente estudo. A extensão dos componentes do citoesqueleto, principalmente de microtúbulos e filamentos de actina, é fundamental também para a fusão do lisossomo ao fagossomo (PATEL *et al.*, 2009; DAMIANI *et al.*, 2003). A disposição de vimentina foi observada na superfície de células tratadas com HMP. Vários estudos demonstraram que essa característica periférica da vimentina, em monócitos estimulados com TNF- α , pode estar relacionada com a ativação do mecanismo oxidativo (MOR-VAKNIN *et al.*, 2002; DEPIANTO e COULOMBE, 2004; GARG *et al.*, 2006). Sendo assim, a análise do citoesqueleto torna-se uma característica importante na ativação celular, uma vez que filamentos intermediários parecem estar associados aos microtúbulos para proporcionar a sustentação de organelas (CORREA *et al.*, 1999; TANG *et al.*, 2008) e também parecem estar ligados aos filamentos de actina através da fimbrina, para a formação dos filopódios.

Também foram observadas alterações ultraestruturais em macrófagos tratados. Estas células apresentaram inúmeros vacúolos, com aumento das cisternas do retículo endoplasmático e filopódios. Devido ao rearranjo do citoesqueleto e maior espreadimento celular, foi observado que macrófagos tratados com HMP foram capazes de aumentar a fagocitose quando submetidos a interação com leveduras. Os dados encontrados no presente trabalho estão de acordo com aqueles descritos por Lopes *et al.* (2006), que após tratar macrófagos peritoneais com Canova, observaram em microscopia óptica (MO) um aumento celular com espreadimento e projeções celulares, além de elevada atividade fagocítica. A fagocitose é um mecanismo da

resposta imune inata capaz de destruir patógenos e células apoptóticas, potencializado por citocinas, pelo LPS e por algumas drogas e/ou bioprodutos (ADEREM e UNDERHILL, 1999; UNDERHILL e OZINSKY, 2002; STUART e EZEKOWITZ, 2005; CHO, 2008). Estes dados demonstram a importância dos diferentes componentes do citoesqueleto na ativação da célula hospedeira contra microorganismos intracelulares.

Para confirmar a seletividade da droga contra parasito foi realizado o teste de MTT em macrófagos tratados para avaliar a atividade mitocondrial celular. De acordo com Fotakis *et al.*, (2005), o teste do MTT parece ser mais sensível às injúrias sofridas pela célula em relação ao teste do LDH. O composto não afetou as desidrogenases mitocondriais de células tratadas que foram capazes de metabolizar o MTT. Também foi realizado o teste de apoptose, onde foi utilizado o iodeto de propídio para detecção de células mortas. Não foi observado aumento de morte em macrófagos tratados com HMP.

Tendo em vista que grande parte das substâncias descritas na literatura são solúveis em soluções tóxicas à célula hospedeira, o metabólito aquoso HMP torna-se promissor para o tratamento de lesões causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. A presença de alterações características de ativação celular como a polimerização de filamentos de actina e microtúbulos, aumento da quantidade de vacúolos, maior produção de radicais de oxigênio e superóxidos, com diminuição do desenvolvimento de formas intracelulares do parasito demonstram que a provável ação leishmanicida do HMP ocorre por meio da ativação da célula hospedeira. Além disso, os testes de viabilidade, análise estrutural e ultraestrutural da célula hospedeira demonstraram que mesmo em concentrações elevadas não houve diminuição da viabilidade celular. Assim, a partir dos resultados obtidos sugere-se que o HMP pode ser utilizado como possível agente leishmanicida.

Estudos *in vivo* deverão ser realizados para comprovação de sua atuação como medicamento de uso tópico contra leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania amazonensis*, causadora de leishmaniose cutânea difusa anérgica.

7 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados e discutidos permitem concluir que:

1. O HMP demonstrou atividade leishmanicida sobre formas promastigotas e amastigotas em macrófagos infectados e tratados.
2. O metabólito HMP foi capaz de ativar macrófagos peritoneais de camundongo, uma vez que houve maior espraiamento, aumento da quantidade de vacúolos e alteração em componentes do citoesqueleto.
3. O metabólito HMP proporcionou a produção de radicais de oxigênio em macrófagos tratados e também em macrófagos infectados com *L. amazonensis*.
4. Não foi detectada produção de óxido nítrico e atividade da enzima Fosfatase ácida pelos macrófagos tratados com o HMP.
5. Não houve diminuição na viabilidade celular e nem aumento da indução de morte celular em macrófagos tratados com o HMP.

8 PRODUÇÃO TÉCNICA

- **Depósito de patente nacional:**

RODRIGUES, A. P. D., SANTOS, A.S., SILVA, E. O., ALVES, C. N., DO NASCIMENTO, J. L. M., CARVALHO, A. S. C. Uso do 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona como agente de ativação do macrófago no combate da Leishmaniose Cutânea. N° **protocolo: 000185/08**, em 14/08/2008 (Anexo I).

- **Depósito de patente internacional (EUA):**

RODRIGUES, A. P. D., SANTOS, A.S., SILVA, E. O., ALVES, C. N., DO NASCIMENTO, J. L. M., CARVALHO, A.S.C. Use of 5-hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pyrone as a macrophage activation agent to combat cutaneous leishmaniasis. N° **protocolo: PCT/BR2009/000254** em 14/08/2009 (Anexo II).

9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

- **Artigos submetidos:**

RODRIGUES, A.P.D., CARVALHO, A.S.C., SANTOS, A.S., C.N. ALVES, NASCIMENTO, J. L.M., SILVA, E. O. Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus sp.*, as inducer of macrophage activation. **Cell Biology International**, em 28/01/2010 (Anexo III).

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEREM, A.; UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu Rev Immunol** 17:593-23, 1999.
- ALVES, W.A.; SENA, J.M.; GOMES, M.L.S.; ELKHOURY, A.N.S.M. **Leishmaniose: Situação Atual no Brasil**. Anais do XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul, Curitiba, Set, 2008.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. **Expert Opin Pharmacother** 8(16), Pages 2689-99, 2007.
- AMER, A.O.; SWANSON, M.S. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. **Curr Opin Microbiol** 5:56-61, 2002.
- ARRUDA, D.C.; MIGUEL, D.C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.; KATZIN, A.M.; ULIANA, S.R. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. **Biomed Pharmacother** 63(9):643-9, 2009.
- ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **J Med Microbiol Feb** 56 (PT 2):143-53, 2007.
- AYRES, M.; AYRES J.R., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. Bioestat 4.0, **Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, MCT, 4ª Edição, 2006.
- AYRES, D.C., MARCUCCI, M.C., GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 102(2):215-20, 2007.
- AZZAM, O.A.; LEHETA, T.M.; NAGUI, N.A.; SHAARAWY, E.; HAY, R.M.; HILAL, R.F. Different therapeutic modalities for treatment of melasma. **J Cosmet Dermatol**. 8(4):275-81, 2009.
- BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N.J. Cutaneous leishmaniasis. **Clin Dermatol** 25:203-21, 2007.
- BALESTIERI, F. M. P.; QUEIROZ, A. R. P.; SCAVONE, C.; COSTA, V. M. A.; BARRAL-NETO, M.; ABRAHAMSOHN, I. A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes and Infection** 4: 23-29, 2002.

- BENTLEY, R. From *miso*, *sake* and *shoyu* to cosmetics: a century of science for kojic acid. **Nat Prod Rep** **23**:1046-62, 2006.
- BLUMENTHAL, C. Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. **Regul Toxicol Pharmacol** **39**:214-28, 2004.
- 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. **J Ethnopharmacol** **111**:396-402, 2007.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Editora MS, 2ª Ed., 2007.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb>. Último acesso em: 03/06/2009.
- BILITEWSKI, U. Determination of immunomodulatory effects: focus on functional analysis of phagocytes as representatives of the innate immune system. **Anal Bioanal Chem** **391**:1545-54, 2008.
- BURDOCK, G. A.; SONI, M.G.; CARABIN, I. G. Evaluation of Health Aspects of Kojic Acid in Food. **Regul Toxicol Pharmacol** **33**:80-101, 2001.
- CALLE, Y.; BURNS, S.; THRASHER, A. J.; JONES, G. E. The leukocyte podosome. **Eur J Cell Biol** **85**:151-57, 2006.
- CHAGAS, A. C.; PESSOA, F. A. C.; DE MEDEIROS, J. F.; PY-DANIEL, V.; MESQUITA, É. C.; BALESTRASSI, D.A. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em uma vila de exploração de minérios - Pitinga, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. **Rev Bras Epidemiol** **9**(2):186-92, 2006.
- CHANG T. An updated review of tyrosinase inhibitors. **Int J Mol Sci** **10**:2440-75, 2009.
- CHO, J.Y. Suppressive effect of hydroquinone, a benzene metabolite, on in vitro inflammatory responses mediated by macrophages, monocytes, and lymphocytes. **Mediators Inflamm** **2008**:1-11, 2008.
- CORREIA, I.; CHU, D.; CHOU, Y.H.; GOLDMAN, R.D.; MATSUDAIRA, P. Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. **J Cell Biol** **146**:831-42, 1999.
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S. & FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev** **19** (1):111-126, 2006.

- CRUME, K.P.; MILLER JH; L.A. FLAMME; A.C. Peloruside A, an antimitotic agent, specifically decreases tumor necrosis factor- α production by lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. **Exp Biol Med** **232**:607-13, 2007.
- CRUZ, G.V.; PEREIRA, P.V.; PATRÍCIO, F.J.; COSTA, G.C.; SOUSA, S.M.; FRAZÃO, J.B. Cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. **J Ethnopharmacol** **111**:148-54, 2007.
- CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Exp Mol Pathol** **72**:132-41, 2002.
- DAMIANI, M. T. & COLOMBO, M. I. Microfilaments and microtubules regulate recycling from phagosomes. **Exp Cell Res** **289**:152-61, 2003.
- DIKONOVA, M.; BOKOCH, G.; SWANSON, J.A. Dynamics of Cytoeskeletal Proteins during Fc γ Receptor-mediated phagocytosis in Macrophages. **Mol Biol Cell** **13**:402-11, 2002.
- DIAS, F. C.; RUIZ, J. C.; LOPES, W. C. Z.; SQUINA, F. M.; RENZI, A.; CRUZ, A. K.; TOSI, L.R.O. Organization of H locus conserved repeats in *Leishmania (Viannia) braziliensis* correlates with lack of gene amplification and drug resistance. **Parasitol Res** **101**:667-76, 2007.
- DI GIORGIO, C.; RIDOUX, O.; DELMAS, F.; AZAS, F. N.; GASQUET, M.; TIMON-DAVID, P. Flow Cytometric Detection of *Leishmania* Parasites in Human Monocyte-Derived Macrophages: Application to Antileishmanial-Drug Testing. **Antimicrob Agents Chemother** **44** (31):3074-78, 2000.
- DEPIANTO, D.; COULOMBE, P.A. Intermediate filaments and tissue repair. **Exp Cell Res** **301**:68-76, 2004.
- DUNAND, C.; CRÈVECOEUR, M.; PENEL, C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. **New Phytologist** **174**:332-34, 2007.
- DURAN, G., DURAN, N., CULHA, G., OZCAN, B., OZTAS, H., OZER, B. *In vitro* antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. **Parasitol Res** **102**(6):1217-25, 2008.
- EMAMI, S.; HOSSEINIMEHR, S. J.; TAGHDISI, S. M.; AKHLAGHPOOR, S. Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. **Bioorg Med Chem Lett** **17**:45-48, 2007.

- ENGEL, J.; ZENTARIS, A.G. Miltefosine, the story of a successful partnership: disease endemic country – TDR – pharmaceutical industry (Zentaris). **TDR on line, n° 68**, 2002. Disponível em [http:// www.who.int/tdr/publications/tdrnews/news68/miltefosine-zentaris.htm](http://www.who.int/tdr/publications/tdrnews/news68/miltefosine-zentaris.htm). Último acesso em: 11/01/2008.
- FICKOVA, M.; PRAVDOVA, E.; RONDHAL, L.; UHER, M.; BRTKO, J. In Vitro Antiproliferative and cytotoxic activities of novel kojic acid derivatives: 5-benzyloxy-2-selenocyanatomethyl- and 5-methoxy-2-selenocyanatomethyl-4-pyranone. **J Appl Toxicol** **28**(4):554-9, 2008.
- FITZPATRICK, J.M.; HIRAI, Y.; HIRAI, H; HOFFMANN, K.F. Schistosome eggproduction is dependent upon the activities of two developmentally regulated tyrosinases. **FASEB J.** **21**(3):823-35, 2007.
- FOTAKIS, G. & TIMBRELL, J. A. in vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, vermelho neutro, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol Lett** **160**:171-77, 2006.
- GAMBOA-LEÓN, M. R.; ARANDA-GONZÁLEZ, I.; MUT-MARTIN, M.; GARCIA-MISS, M. R.; DUMONTEIL, E. In vivo and In vitro Control of *Leishmania mexicana* due to Garlic-induced NO Production. **Scand J Immunol** **66**:508-14, 2007.
- GANGULY, N.K. Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral leishmaniasis. TDR – pharmaceutical industry (Zentaris). **TDR on line, n° 68**, 2002. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/tdrnews/news68/miltefosine-india.htm>. Último acesso em: 11/01/2008.
- GARG, A.; BARNES, P.F.; PORGADOR, A.; ROY, S.; WU, S.; NANDA, J.S. Vimentin expressed on *Mycobacterium tuberculosis*-infected human monocytes is involved in binding to the NKp46 receptor. **J Immunol** **177**:6192-8, 2006.
- GOMES, A.J.; LUNARDI, C.N.; GONZALEZ, S.; TEDESCO, A.C. The antioxidant action of *Polypodium leucotomos* extract and kojic acid: reactions with reactive oxygen species. **Braz J Med Biol Res** **34**(11):1487-94, 2001.
- GOMES-SILVA, A.; DE CÁSSIA, B. R.; NOGUEIRA R.S.; AMATO, V.S.; DA SILVA, M. M.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; COUTINHO, S.G.; DA-CRUZ, A.M. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clin Exp Immunol** **149**:440-44, 2007.
- GOTOH, T.; OYADOMARI, S.; MORI, K.; MORI, M. Nitric oxide-induced apoptosis in raw 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving atf6 and chop. **J Biol Chem** **277**(14):12343-50, 2002.

- GRUENHEID, S.; FINLAY, B. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. **Nature** **422**(6933):775-81, 2003.
- GUEIRARD, P.; LAPLANTE, A.; RONDEAU, C.; MILON, G.; DESJARDINS, M. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cell Microbiol** **10**(1):100-11, 2008.
- GUPTON, S.L.; SALMON, W.C.; WATERMAN-STORER, C.M. Converging populations of f-actin promote breakage of associated microtubules to spatially regulate microtubule turnover in migrating cells. **Curr Biol** **12**:1891-9, 2002.
- HEHNLY, H. & STAMNES, M. Regulating cytoskeleton-based vesicle motility. Minireview. **FEBS Letters** **581**:2112-18, 2007.
- HIGA, Y.; KAWABE, M.; NABAE, K.; TODA, Y.; KITAMOTO, S., HARA,.; TANAKA, N.; KARIYA, K.; TAKAHASHI, M. Kojic Acid – Absence of tumor-initiating activity in rat liver, and of carcinogenic and photo-genotoxic potential in mouse skin. **J Toxicol Sci** **32**(2):143-159, 2007.
- HORTELANO, S.; TRAVÉS, P.G.; ZEINI, M.; ALVAREZ, A. M.; BOSCA, L. Sustained nitric oxide delivery delays nitric oxide-dependent apoptosis in macrophages: contribution to the physiological function of activated macrophages. **J Immunol** **171**: 6059-64, 2003.
- HOSSEINIMEHR, S.J., EMAMI, S., ZAKARYAEE, V., AHMADI, A., MOSLEMI, D. Radioprotective effects of kojic acid against mortality induced by gamma irradiation in mice. **Saudi Med J** **30**(4):490-3, 2009.
- JIN, W.; ZJAWIONY J. K. 5-Alkylresorcinols from *Merulius incarnates*. **J Nat Prod** **69**, 704-06, 2006.
- JUN, C.; HAN, M.; KIM, U.; CHUNG, H. Nitric Oxide Induces ADP-Ribosylation of Actin in Murine Macrophages: Association with the Inhibition of Pseudopodia Formation, Phagocytic Activity, and Adherence on a Laminin Substratum. **Cellular Immunology** **174**, 25–34 1996.
- KAYSER, O., KIDERLEN, A.F., BERTELS, S., SIEMS, K. Antileishmanial Activities of Aphidicolin and Its Semisynthetic Derivatives. **Antimicrob Agents Chemother** **45**(1):288-92, 2001.
- KAYSER, O.; KINDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitol Res** **90**: S55-S62, 2003.

- KHARAZI, S.; ZAVARAN H.A.; TIRAIHI, T. The Role of Overproduction of Nitric Oxide in Apoptosis of BALB/C Mice Macrophages Infected with *Leishmania Major* in Vitro. **Iran J Allergy Asthma Immunol** **2**(4):209-14, 2003.
- KOBAYASHI, S.D.; VOYICH, J.M.; BURLAK, C.; DELEO, F.R. Neutrophils in the innate immune response. **Arch Immunol Ther Exp** **53**(6): 505-17, 2005.
- KONO, T.; MOTO, M.; MUGURUMA, M.; TAKAHASHI, M.; JIN, M.; KENMOCHI, Y.; YOKOUCHI, Y.; MITSUMORI, K. Enhancement of hepatocellular proliferative activity of kojic acid in mice by a simultaneous administration of ascorbic acid. **J Vet Med Sci** **69** (9):899-908, 2007.
- LALA, S.; GUPTA, S.; SAHU, N. P.; MANDAL, D.; MONDAL, N. B.; MOULIK, S. P.; BASU, M.K. Critical evaluation of the therapeutic potential of boric acid incorporated in oil-in-water microemulsions and poly-d,l-lactide nanoparticles against experimental leishmaniasis. **J of Drug Targeting** **14**(4):171-79, 2006.
- LALA, S.; PRAMANICK, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.; BASU, M. K. Harmine: evaluation of its antileishmanial properties in various vesicular delivery systems. **J Drug Target** **(3)**:165-75, 2004.
- LANG, T.; LECOEUR, H.; PRINA, E. Imaging *Leishmania* development in their host cells. **Trends Parasitol** **25** (10):464-73, 2009.
- LÁZARO-DIÉGUEZ, F.; AGUADO, C.; MATO, E.; SÁNCHEZ-RUIZ, Y.; ESTEBAN, I.; ALBERCH, J.; KNECHT, E.; EGEA, G. Dynamics of an F-actin aggregate generated by the actin-stabilizing toxin jasplakinolide. **J Cell Sci** **121**:1415-25, 2008.
- LAWN, S.D.; ARMSTRONG, M.; CHILON, D.; WHITTY, C.J. Electrocardiographic and biochemical adverse effects of sodium stibogluconate during treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis among returned travelers. **Trans R Soc Trop Med Hyg** **100**(3):264-9, 2006.
- LEE, J.Y.; KIM, J.Y.; LEE, Y.G.; RHEE, M.H.; HONG, E.K.; CHO, J.Y. Molecular mechanism of macrophage activation by exopolysaccharides from liquid culture of *Lentinus edodes*. **J Microbiol Biotechnol** **18**:355-64, 2008.
- LIBUSOVÁ, L.; SULIMENKO, T.; SULIMENKO, V.; HOZÁK, P.; DRÁBER, P. γ -Tubulin in *Leishmania*: cell cycle-dependent changes in subcellular localization and heterogeneity of its isoforms. **Exp Cell Res** **295**:375-86, 2004.
- LIM, J.T. E. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. **Dermatol Surg** **25**: 282-84, 1999.

- LIN, C.; WU, H.; HUANG, Y. Combining high-performance liquid chromatography with on-line microdialysis sampling for the simultaneous determination of ascorbyl glucoside, kojic acid, and niacinamide in bleaching cosmetics. **Anal Chim Acta** **581**:102-07, 2007.
- LO, A.; LIANG, Y.; LIN-SHIAU, S.; HO, C.; LIN, J. Carnosol, na antioxidant in rosemary, supresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kB in mouse macrophages. **Carcinogenesis** **23**(6):983-91, 2002.
- LOPES, L.; GODOY, L.M.F.; DE OLIVEIRA, C. C.; GABARDO, J.; SCHADECK, R.J.G.; BUCHI, D. F. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron** **37**:277-87, 2006.
- MA, G.; KHAN, S.I; JACOB, M.R.; TEKWANI, B.L.; LI, Z.; PASCO, D.S.; WALKER, L.A.; KHAN, I.A. Antimicrobial and anileishmanial activites of Hypocrellins A e B. **Antimicrob Agents Chemother** **48**(11):4450-52, 2004.
- MACHADO, G.M., LEON, L.L., DE CASTRO, S.L. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **102**(1):73-7, 2007.
- MAITY, P.C.; BHATTACHARIEE, S.; MAIUMDAR, S.; SIL, A.K. Potentiation by cigarette smoke of macrophage function against *Leishmania donovani* infection. **Inflamm Res** **58**:22-9, 2009.
- MARTIN, M.B.; GRIMLEY, J.S.; LEWIS, J.C.; HEATH, H.T. 3RD; BAILEY, B.N.; KENDRICK, H.; YARDLEY, V.; CALDERA, A.; LIRA, R.; URBINA, J.A.; MORENO, S.N.; DOCAMPO, R.; CROFT, S.L.; OLDFIELD, E. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. **J Med Chem. Mar** **44**(6):909-16, 2001.
- MARTINS, P.R.; GAMEIRO, M.C.; CASTOLDI, L.; ROMAGNOLI, G.G.; LOPES, F.C.; PINTO, A.V. Polysaccharide-rich fraction of *Agaricus brasiliensis* enhances the candidacidal activity of murine macrophages. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **103**:244-50, 2008.
- MI HA, Y.; CHUNG, S. W.; SONG, S.; LEE, H.; SUH, H.; CHUNG, H. Y. 4-(6-Hydroxy-2-naphthyl)-1,3-bezendiol: A Potent, New Tyrosinase Inhibitor. **Biol Pharm Bull** **30** (9):1711-15, 2007.
- MISHRA, B.B., KALE, R.R., SINGH, R.K., TIWARI, V.K. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia** **80**:81-90, 2009.
- MORI, M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. **J Nutr** **137**(6 Suppl 2):1616S-20S, 2007.

- MORROW, D.M.; ENTEZARI-ZAHER, T.; ROMASHKO, J. 3RD; AZGHANI, A.O.; JAVDAN, M.; ULLOA, L. Antioxidants preserve macrophage phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* during hyperoxia. **Free Radic Biol Med** **42**:1338-49, 2007.
- MOR-VAKNIN, N.; PUNTURIERI, A.; SITWALA, K.; MARKOVITZ, D.M. Vimentin is secreted by activated macrophages. **Nat Cell Biol** **5**:59-63, 2002.
- MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol** **8**:958-69, 2008.
- MOTO, M.; MORI, T.; OKAMURA, M.; KASHIDA, Y.; MITSUMORI, K. Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice. **Arch Toxicol**, **80**: 299-304, 2006.
- MUKHERJEE, A.; PADMANABHAN, P. K.; SAHANI, M. H.; BARRETT, M. P.; MADHUBALA, R. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. **Mol Biochem Parasitol** **145**:1-10, 2006.
- NEUBER, H. Leishmaniasis. **J Dtsch Dermatol Ges** **6**(9):754-65, 2008.
- NIWA, Y. & AKAMATSU, H. Kojic acid scavenges free radicals while potentiating leukocyte functions including free radical generation. **Inflammation** **15** (4):4, 1991.
- NOHYNEK, G.J.; KIRKLAND, D.; MARZIN, D.; TOUTAIN, H.; LECLERC-RIBAUD, C.; JINNAI, H. An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. **Food Chem Toxicol** **4**: 93-105, 2004.
- OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA, S.M.; GODOY, L.M.F.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Canova, a brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **J Infect** **52**:420-32, 2006.
- PALUMBO, E. Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review. **Braz J Infect Dis**. **12**(1):2-4, 2008.
- PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BRÉARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother** **48**(3):852-59, 2004.
- PATEL, P.C.; FISHER, K.H.; YANG, E.C.; DEANE, C.M.; HARRISON, R.E. Proteomic analysis of microtubule-associated proteins during macrophage activation. **Mol Cell Proteomics** **8**:2500-14, 2009.
- PEREIRA, W.K., LONARDONI, M.V., GRESPAN, R., CAPARROZ-ASSEF, S.M., CUMAN, R.K., BERSANI-AMADO, C.A. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. **J Infect** **51**:157-64, 2005.
- PINHEIRO, R. O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma** **80** (16):7-8, 2004.

- PINTO-DA-SILVA, L. H.; CAMURATE, M.; COSTA, K. A.; OLIVEIRA, S. M.P.; CUNHA-E-SILVA, N.L.; SARAIVA, E.M.B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. **Int J Parasitol** **32**:1371-77, 2002.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis** **7**: 581-96, 2007.
- ROBINSON, J.M.; SEGUCHI, H.; BADWEY, J.A. Active oxygen and nitrogen species in biology: from cytotoxic agents or signaling intermediates. **Histochem Cell Biology**, **122**: 173-275, 2004.
- 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*. **Antimicrob Agents and Chemother** **47**(6):1895-901, 2003.
- ROY, R., BHATTACHARYA, G., SIDDIQUI, K.A., BHADRA, R. A new antileishmanial compound, phaseolinone. **Biochem Biophys Res Commun** **16**:168(1):43-50, 1990.
- SANTA-RITA, R. M.; HENRIQUES- Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **J Antimicrob Chemother** **54**:704-10, 2004.
- SANTOS, A.O., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B.P., VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO, A.C., NAKAMURA, C.V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **J Ethnopharmacol** **120**:204-208, 2008.
- SANTOS, D.O.; COUTINHO, C.E.; MADEIRA, M.F.; BOTTINO, C.G.; VIEIRA, R.T.; NASCIMENTO, S.B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S.C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R.T.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. **Parasitol Res** **103**:1-10, 2008.
- SERENO, D.; CORDEIRO DA SILVA, A.; MATHIEU-DAUDE, F.; OUAISSI, A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasit Intern** **56**:3-7, 2007.
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E.P. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **100**(5):525-534, 2005.
- SILVEIRA, F. Diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the Amazon region, Brazil: clinical and epidemiological aspects. **Gaz Méd Bahia** **79** (Supl.3):25-29, 2009.

- SINGH, S; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **J Infect Chemother** **10**:307-15, 2004.
- SOUZA, C. S. F.; MAIA, H.; CALABRESE, K. S.; ROSA, M. S. S.; CUPOLILO, S. M. N.; COSTA, S. C. G. DA; VALLE, T. Z. DO. **As Leishmanioses**. Departamento de Protozoologia. Fundação Osvaldo Cruz, 1997.
- STUART, L.M.; EZEKOWITZ, R.A.B. Phagocytosis: Elegant Complexity. **Immunity** **22**:539-50, 2005.
- SÜLSEN, V.P.; CAZORLA, S.I.; FRANK, F.M.; REDKO, F.C.; ANESINI, C.A.; COUSSIO, J.D.; MALCHIODI, E.L.; MARTINO, V.S.; MUSCHIETTI, L.V. Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids from Argentine medicinal plants. **Am J Trop Med Hyg** **77**(4):654-9, 2007.
- TAMURA, T.; MITSUMORI, K.; TOTSUKA, Y.; WAKABAYASHI, K.; KIDO, R.; KASAI, H.; NASU, M.; HIROSE, M. Absence of in vivo genotoxic potential and tumor initiation activity of kojic acid in the rat thyroid. **Toxicology** **222**:213-224, 2006.
- TANG, H.L.; LUNG, H.L.; WU, K.C.; LE, A.H.; TANG, H.M.; FUNG, M.C. Vimentin supports mitochondrial morphology and organization. **Biochem J** **410**:141-6, 2008.
- TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S.E.; DE ANDRADE, H.F. JR.; DE AMORIM, G.N.C.; YOGI, A.; CARVALHO, C.S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; FISCHER D.C. Antiprotozoal Activity of Brazilian Plant Extracts from Isoquinoline Alkaloid-Producing Families. **Phytomedicine** **5**:382-90, 2005.
- TIWARI, M; KAKKAR, P. Plant derived antioxidants - Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. **Toxicol in Vitro** **23**:295-301, 2009.
- UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu Rev Immunol** **20**:825-52, 2002.
- TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immuneresponse to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunol Med Microbiol** **51**:229-242, 2007.
- WILLIAMS, L.M.; RIDLEY, A.J. Lipopolysaccharide induces actin reorganization and tyrosine phosphorylation of pyk2 and paxillin in monocytes and macrophages. **Immunol** **164**:2028-36, 2000.
- WINBERG, M. E.; RASMUSSEN, B.; SUNDQVIST, T. *Leishmania donovani*: inhibition of phagosomal maturation is rescued by nitric oxide in macrophages. **Exp Parasitology**, **117**(2):165-70.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Leishmaniasis: Disease information. Disponível em <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>. Último acesso em: 13/05/2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis: The Global Trend. http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_leishmaniasis/en/index.html. Último acesso em: 17/05/2009.

ANEXOS

ANEXO I

REPRESENTAÇÃO DO INPI-PARÁ PROTOCOLO GERAL Nº <u>00015/08</u> RECEBIDO Em: <u>14/08/2008</u> Hora: <u>09:15hs</u> Responsável: <u>[assinatura]</u>

Protocolo

Número (21)

(Uso exclusivo do INPI)

DEPÓSITO Pedido de Patente ou de Certificado de Adição	depósito / /
	<small>Espaço reservado para etiqueta (número e data de depósito)</small>

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):1.1 Nome: **UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**1.2 Qualificação: 1.3 CGC/CPF: **34621748000123**1.4 Endereço completo: **AV. AUGUSTO CORREA, Nº01, GUAMÁ, BELÉM-PA, CEP 66075-900**1.5 Telefone: **91 3201-7258**FAX: **91 3201-7258** continua em folha anexa**2. Natureza:** 2.1 Invenção 2.1.1. Certificado de Adição 2.2 Modelo de UtilidadeEscreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: **PATENTE DE INVENÇÃO****3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):**
USO DO 5-HIDROXI-2-HIDROMETIL-Y-PIRONA ... continua em folha anexa**4. Pedido de Divisão** do pedido nº . , de .**5. Prioridade Interna** - O depositante reivindica a seguinte prioridade:Nº de depósito Data de Depósito (**66**)**6. Prioridade** - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

Pais ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

 continua em folha anexa**7. Inventor (72):** Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)7.1 Nome: **ALBERDAN SILVA SANTOS**7.2 Qualificação: **BRASILEIRA**7.3 Endereço: **AV AUGUSTO CORREA N. 1, CIDADE UNIVERSITÁRIA JOSÉ SILVEIRA NETTO, GUAMÁ, BELÉM, PA**

Formulário 1.01 - Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 1/2)

[assinatura]

7.4 CEP: 66075110

7.5 Telefone 91 3201-7258

 continua em folha anexa**8. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:** em anexo**9. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):**

(art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo nº 127/97):

 em anexo**10. Procurador (74):**

10.1 Nome

CPF/CGC:

10.2 Endereço:

10.3 CEP:

10.4 Telefone

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de recolhimento	08 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	09 fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	01 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de prioridade	fls.	<input type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	01 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros (especificar): RESOLUÇÃO E PORT.				08 fls.
	11.10 Total de folhas anexadas:				27 fls;

12. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

RESM.14.08-2008

Local e Data



Assinatura e Carimbo
 Prof. Dr. Roberto Dall'Agnol
 Pró-Reitor de Pesquisa e
 Pós-Graduação

Continuação ...

3. Título da Invenção, Modelo de Utilidade ou de Certificado de Adição:

...COMO AGENTE DE ATIVAÇÃO DO MACRÓFAGO NO COMBATE DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA..

7. INVENTORES (72)

EDILENE OLIVEIRA DA SILVA
NACIONALIDADE: BRASILEIRA
ENDEREÇO: TV D. ROMUALDO DE SEIXAS 1398, APTO. 104, UMARIZAL, CEP 66055-200, BELÉM, PARÁ.

JOSÉ LUIZ MARTINS DO NASCIMENTO
NACIONALIDADE : BRASILEIRA
ENDEREÇO: ENDEREÇO: TV D. ROMUALDO DE SEIXAS 1398, APTO. 104, UMARIZAL, CEP 66055-200, BELÉM, PARÁ.

CLÁUDIO NAUM ALVES
NACIONALIDADE : BRASILEIRA
ENDEREÇO: CONJUNTO CIDADE NOVA VIII, WE 39-A, CASA 521, COQUEIRO, ANANINDEUA, PARÁ.

ANA PAULA DRUMOND RODRIGUES
NACIONALIDADE : BRASILEIRA
ENDEREÇO: TV PIRAJÁ 1877, APTO. 304, BLOCO B, CEP 66095-470, BELÉM, PARÁ.

ANTÔNIO SÉRGIO COSTA CARVALHO
NACIONALIDADE : BRASILEIRA
ENDEREÇO: TV SÉTIMA 62, BAIRRO NOVO, MARITUBA, CEP 67100-0000.



ANEXO II

P1553 - ANA

1/6

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	PCT/BR2009/000254
0-2	International Filing Date	14 AGO 2009 14 08 09
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	INPI/BRAZIL-PCT INTERNATIONAL APPLICATION
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.028.203 MT/FOP 20080401/0.20.5.12
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	National Institute of Industrial Property (Brazil) (RO/BR)
0-7	Applicant's or agent's file reference	P1553 - ANA
I	Title of invention	USE OF 5-HYDROXY-2-PYRONE (HMP) AS A LEISHMANICIDAL AGENT
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	Universidade Federal do Pará
II-5	Address	Av. Augusto Correa, 01 Guamá 66075-900 Belém - PA Brazil
II-6	State of nationality	BR
II-7	State of residence	BR

PCT/BR2009/000254

P1553 - ANA

2/6

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	SANTOS, Alberdan Silva
III-1-5	Address	Av. Augusto Correa, 01, Cidade Universitária José Silveira Netto Guamá 66075-110 Belém - PA Brazil
III-1-6	State of nationality	BR
III-1-7	State of residence	BR
III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	SILVA, Edilene Oliveira da
III-2-5	Address	TV D. Romualdo de Seixas, 1398 - Apto. 104 Umarizal 66055-200 Belém - PA Brazil
III-2-6	State of nationality	BR
III-2-7	State of residence	BR
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	NASCIMENTO, José Luiz Martins do
III-3-5	Address	TV D. Romualdo de Seixas, 1398 - Apto. 104 Umarizal 66055-200 Belém - PA Brazil
III-3-6	State of nationality	BR
III-3-7	State of residence	BR

PCT / BR2009 / 000254

P1553 - ANA

3/6

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	ALVES, Cláudio Naum
III-4-5	Address	Conjunto Cidade Nova VIII, WE 39-A, casa 521 Coqueiro Ananindeua - PA Brazil
III-4-6	State of nationality	BR
III-4-7	State of residence	BR
III-5	Applicant and/or inventor	
III-5-1	This person is	applicant and inventor
III-5-2	Applicant for	US only
III-5-4	Name (LAST, First)	RODRIGUES, Ana Paula Drumond
III-5-5	Address	TV Pirajá 1877, Apto. 304, Bloco B 66095-470 Belém - PA Brazil
III-5-6	State of nationality	BR
III-5-7	State of residence	BR
III-6	Applicant and/or inventor	
III-6-1	This person is	applicant and inventor
III-6-2	Applicant for	US only
III-6-4	Name (LAST, First)	CARVALHO, Antônio Sérgio da Costa
III-6-5	Address	TV Sétima 62 Bairro Novo 67100-000 Marituba - PA Brazil
III-6-6	State of nationality	BR
III-6-7	State of residence	BR

PCT/BR2009/000254

USE OF 5-HYDROXY-2-HYDROXYMETHYL-PYRONE (HMP) AS A LEISHMANICIDAL AGENT

The present invention refers to the use of HMP (a secondary metabolite obtained from *Aspergillus* fungi) as an agent that intensifies the mechanism of macrophage activation, leading to the death of *L. (Leishmania) amazonensis*, the etiologic agent of cutaneous leishmaniasis. The main mechanism of action of this agent is the activation of the microbicidal activity of host cells, through increased superoxide production, number of lysosomes, actin and microtubule filament polymerization and increased spreading, typical of activated cells. Additionally, HMP represents a molecule of easy acquisition, presents an efficient combat mechanism with no adverse reactions and capacity to inhibit the development of promastigotes and amastigotes forms. Finally, results suggest HMP to be a potential candidate for use against cutaneous leishmaniasis at a minimal concentration of 50µg/mL.

ANEXO III

**ONLINE SUBMISSION**

HOME JOURNAL WEBSITE MY SUBMISSIONS NEW SUBMISSION PROFILE LOG OUT FEEDBACK HELP

Powered by SIRIUS, brought to you by Portland Press Ltd.

My recent submissions

[Submission Home](#)

The table below lists your electronic submissions currently on file, along with their status.

If you need to check a converted PDF, please use the "Review" link provided.

If you want to continue an incomplete submission, please use the "Continue" link provided.

Date submitted	MS no. (Ver no.)	Title	Status
27 Jan 2010	CBI2010/0083 (1)	 Kojic acid, a secondary metabolite from <i>Aspergillus sp.</i>, as inducator of macrophage activation	In review

* Denotes that you were the submitting author

Numbers in brackets indicate the version number of manuscript submitted, (1) = first version (2) = revised version etc.

[Submission status help](#) (You must allow pop-ups for this site on your browser)

Note: You must have Adobe Acrobat Reader installed to view PDF files. If you do not have it installed, you can download it for free from [Adobe](#).

1 **Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus sp.*, as inducer of macrophage**
2 **activation**

3
4 Ana Paula D. Rodrigues¹, Antônio Sergio C. Carvalho², Alberdan S. Santos², Claudio
5 N. Alves², José Luiz M. do Nascimento³ and Edilene O. Silva^{1*}

6
7 ^{1,*} Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de
8 Biologia Estrutural, Belém, Pará, Brazil

9 ² Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Laboratório
10 Desenvolvimento e Planejamento de Fármacos, Belém, Pará, Brazil

11 ³ Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de
12 Neuroquímica Molecular e Celular, Belém, Pará, Brazil

13

14 **Kojic acid as macrophage activator**

15

16 Author for correspondence: Edilene O. Silva

17 Universidade Federal do Pará, Laboratório de Biologia Estrutural, Avenida Augusto
18 Corrêa, 01, Bairro Guamá, 660975-110, Belém, Pará, Brazil

19 E-mail address: edilene@ufpa.br

20

21 **Keywords:** Cytoskeleton; Kojic acid; Macrophage activation; Phagocytosis; Secondary
22 metabolite

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

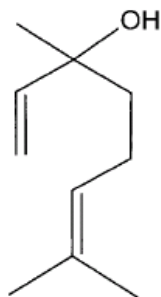
1 **Abstract**

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

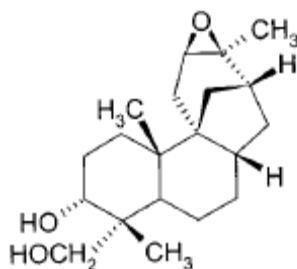
Kojic acid (KA) is a secondary metabolite isolated from *Aspergillus* fungi that has demonstrated skin-whitening, antioxidant, antitumor and other properties. However, limited information is available regarding its effects on macrophages, the major cell involved in cell defense. The aim of the present study was to analyze whether KA affects functional properties related to macrophage activation, such as phagocytosis and the spreading ability over the substrate. The results revealed that 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KA for 1 h induced both morphological and physiological alterations in resident macrophages. Immunofluorescence microscopy revealed enhanced cell spreading and an increase in cell surface exposure related to a rearrangement of microtubules, actin filaments and intermediate filaments. KA also potentiated phagocytosis by macrophages, as demonstrated by the increase in phagocytic activity towards the yeast when compared to untreated cells. The cytotoxic assay revealed that macrophages maintain their viability following KA treatment. These results indicate that KA can modulate macrophage activation through cytoskeleton rearrangement, increase cell surface exposure and enhance the phagocytosis process. Therefore, the present study reveals a novel function for KA as a macrophage activator.

ANEXO IV

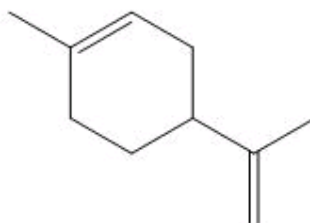
Estruturas químicas das substâncias citadas no presente trabalho a fim de facilitar a comparação destas moléculas com a molécula do 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona (HMP).



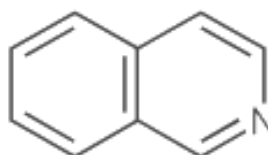
1. Estrutura química do Linalol, óleo proveniente da planta *Croton cajucara*.



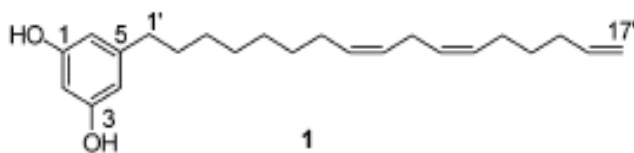
2. Estrutura química da afidicolina, metabólito proveniente do fungo *Nigrospora sphaerica*.



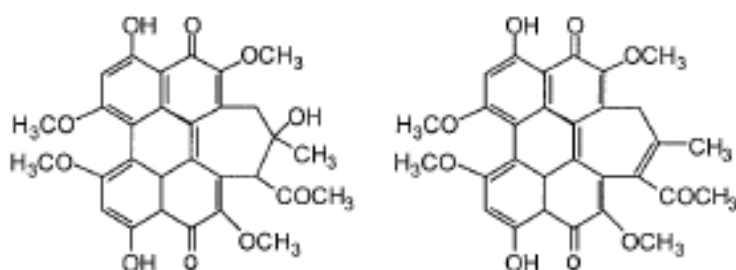
3. Estrutura química do limoneno, molécula presente na casca de frutas cítricas.



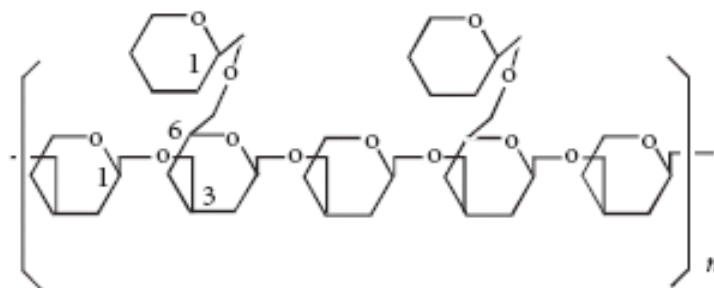
4. Estrutura química dos alcalóides do tipo quinolina, encontrado na raiz de plantas.



5. Estrutura química do 5-alkylresorcinols um metabólito obtido do fungo *Merulius incarnatus*.



6. Estrutura química da hypocrellina A e B, respectivamente, obtidas do fungo *Hypocrella bambusae*.



7. Estrutura química geral de polissacarídeos obtidos do cogumelo *Lentinus edodes*.

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](#)