



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

**AÇÃO DO ALCALOIDE (+)-FILANTIDINA SOBRE O PROTOZOÁRIO
Leishmania (Leishmania) amazonensis E A CÉLULA HOSPEDEIRA.**

LIENCE SILVEIRA DE MORAES

BELÉM - PA

2014

**AÇÃO DO ALCALOIDE (+)-FILANTIDINA SOBRE O PROTOZOÁRIO
Leishmania (Leishmania) amazonensis E A CÉLULA HOSPEDEIRA.**

LIENNE SILVEIRA DE MORAES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular.

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

BELÉM - PA

2014

**AÇÃO DO ALCALOIDE (+)-FILANTIDINA SOBRE O PROTOZOÁRIO
Leishmania (Leishmania) amazonensis E A CÉLULA HOSPEDEIRA.**

LIENNE SILVEIRA DE MORAES

Orientadora: **Prof^a Dr^a Edilene Oliveira da Silva**
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular, sob avaliação da seguinte banca:

Membro: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Membro: Prof^a. Dr^a. Giselle Maria Skelding Pinheiro Guilhon
Instituto de Ciências Exatas e Naturais – UFPA

Suplente: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Belém (PA), 14 de Agosto de 2014.

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Protozoologia e Biologia Estrutural (LBE) do Instituto de Ciências Biológicas, em colaboração com o Laboratório de Química do Instituto de Ciências Exatas e Naturais, da Universidade Federal do Pará e com o Laboratório de Microscopia do Instituto Evandro Chagas. O apoio financeiro foi proveniente do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para financiamento da bolsa de mestrado, Instituto Nacional de Ciência, Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB), Programa Nacional de Cooperação Acadêmica - Novas Fronteiras (PROCAD) pelo projeto “Cooperação Interinstitucional em Neurociências e Biologia Celular em Modelos Experimentais de Interesse na Região Amazônica”, para realização do mestrado sanduiche no Laboratório de Neurobiologia Comparativa e do Desenvolvimento, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Nobody said it was easy.
No one ever said it would be this hard.
(Chris Martin)

A Deus por sempre iluminar meu caminho...
A minha mãe Beatriz...
Aos meus irmãos João e Leopoldo...

Dedico!!!!

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Beatriz, pelo carinho, dedicação, amor, apoio e incentivo. Obrigada por acreditar junto comigo nos meus sonhos e me encorajar a correr atrás e por tudo que a senhora me ensinou e me ensina. A senhora foi e sempre será muito importante em minha vida. À senhora toda minha gratidão, amor e alegria de poder ser sua filha!!!!!!

Aos meus irmãos, João e Leopoldo, pelo apoio nos dias mais difíceis, pela torcida, brigas (essenciais na relação de qualquer irmão) e por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus filhotes Joselito e Dexter, pelas alegrias, mordidas, carinho, amor incondicional e verdadeiro.

Ao Jorge, obrigada pelo carinho, amizade, dedicação, apoio, incentivo, pela companhia de todos os dias, cumplicidade, momentos de alegria e diversão. Por suportar meu estresse e minhas manias. Espero poder contar com você sempre. Obrigada por você fazer parte da minha vida.

À Prof^a. Dr^a. Edilene Oliveira, pela orientação, confiança, críticas, por ser um exemplo de profissional e pela oportunidade a mim dada em fazer parte do grupo do Laboratório de Protozoologia e Biologia Estrutural. Obrigada por ter acreditado em mim!!!!!!

À todos os integrantes do Laboratório de Protozoologia e Biologia estrutural, que me acolheram com muito amor e carinho:

Luis e Ana DE FARIAS (kkkkkkkk). Obrigada pelas conversas, dicas, conselhos, ajudas, ensinamentos, pela orientação para o delineamento deste trabalho e momentos divertidos que passamos juntos. Vocês foram muito importantes para a finalização desse trabalho. Foi muito bom conhecer vocês.

Neide, pessoa sempre doce e que não mede esforços para ajudar a todos, mesmo com toda correria que é sua vida entre o Miri e o Lab. Obrigada por tudo. Você se tornou uma grande amiga. Admiro muito você!!!!!!!!!!

Carol, sempre verdadeira. Foi muito bom poder conhecer você melhor. Obrigada pelas conversas, passeios e pela amizade.

Amanda (Didi), obrigada pelo carinho, papos, passeios e acima de tudo obrigada pela amizade. O Doutorado nos espera!!!!!!!!!!

Rodrigo, primeira pessoa com quem conversei no laboratório. Com o passar do tempo percebi o quanto você é verdadeiro e amigo. Obrigada por todos os momentos felizes que passamos no lab e fora dele.

Paula, CHEFINHA. Foi muito bom conhecer uma pessoa tão meiga e sensível como você. Obrigada por tudo!!!!

Bruno, “menino dos olhos”!!!! Obrigada pela ajuda sempre precisa com os experimentos, discussões de resultados e momentos alegres que passamos.

Davi, Obrigada pelos papos descontraídos, troca de protocolos, ajudas sempre precisas, palavras de incentivo na hora do nervosismo, transporte das leishmanias para o lab quando estávamos desesperados para fazer experimentos e pelas histórias contadas.

Evelen, obrigada pelas conversas, apoio e por fazer parte deste momento importante em minha vida. Você é uma pessoa muito especial.

Sandro, obrigado pela ajuda com os experimentos, camundongos e momentos de descontração no laboratório.

Diane, a mais nova integrante do lab e mesmo com pouco convívio já participou de bons momentos. Obrigada!!!

Fernanda obrigada pelo processamento das amostras de MET, por não medir esforços em me ajudar sempre que precisei e pelo carinho que teve por mim desde o início do mestrado.

Chubert, pela ajuda no uso de alguns equipamentos no LBE.

À Prof^a. Dr^a Silvana Alodi do Laboratório de Neurobiologia Comparativa e do Desenvolvimento, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por aceitar me receber no mestrado sanduiche e permitir que acompanhasse os experimentos no laboratório.

Aos integrantes do laboratório Neurobiologia Comparativa e do Desenvolvimento da UFRJ: Inês (pelo carinho durante o mês em que fiquei no Rio, pelo passeio que fizemos a Niterói e pela amizade), Paulinha, Serginho (pela disponibilidade e paciência em me ensinar o Blotting, pelas trocas de protocolos, conversas e momentos de descontração), Isadora, Louise, Daniel, Vivi, Hugo.

Aos Membros da banca Dr^a. Giselle Guilhon e Dr. Marcelo Bahia, por terem aceitado contribuir com este trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Neurociências e Biologia Celular.

Ao Instituto Evandro Chagas, pelo fornecimento da cepa de *Leishmania* usada no trabalho.

Ao Laboratório de Microscopia do Instituto Evandro Chagas.

Ao Sanderson do LM do IEC pela ajuda com o processamento das amostras de MEV.

À CAPES e INBEB, pelo apoio financeiro durante a realização dessa pesquisa e mestrado sanduiche no Rio de Janeiro.

À professora Giselle do Laboratório de Química da UFPA pelo fornecimento do bioprobuto.

Ao Programa de Pós Graduação em Neurociências e Biologia Celular.

Aos camundongos, pois sem eles não seria possível a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a conquista de mais uma etapa em minha vida.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença de caráter antroponóico causada por parasitas do gênero *Leishmania*. Estes parasitas proliferam principalmente dentro de macrófagos de mamíferos e são responsáveis por promover uma diversidade de manifestações clínicas como Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Mucocutânea (LMC). O único tratamento utilizado para a leishmaniose é a quimioterapia, onde geralmente são utilizadas drogas tóxicas e com longo período de tratamento. O estudo de produtos naturais obtidos de plantas como agente leishmanicida desempenha um papel importante na busca de novas drogas para o tratamento da leishmaniose. A (+)-filantidina é um alcaloide extraído do caule da planta *Margaritaria nobilis*, pertencente a família Phyllanthaceae. Desta forma, objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da (+)-filantidina sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a célula hospedeira. A atividade antiproliferativa de formas promastigotas foi avaliada quando os parasitas foram tratados com 50, 100 e 200 µg/ml do alcaloide por 96 horas, com redução de 73,75%, 82,50% e 88,75% no número de parasitas respectivamente, quando comparados ao grupo controle sem tratamento. No período de 96 horas, foi observado um valor IC₅₀ de 56,34 µg/ml. A anfotericina B foi utilizada como droga de referência na concentração de 0,1 µg/ml, sendo observada redução de 100% dos parasitas durante as 96 horas de tratamento. O tratamento com o alcaloide promoveu alterações importantes nas promastigotas, mostradas através de microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Foram observadas alterações no corpo celular, flagelo, cinetoplasto, mitocôndria, indução na formação de rosetas, presença de vesículas eletrodensas sugestivas de corpúsculos lipídicos e aumento no número de estruturas semelhantes a acidocalcisomos. Com relação à célula hospedeira, não foi observado efeito citotóxico nos macrófagos tratados com alcaloide e análise por microscopia eletrônica de varredura mostrou que o alcaloide promoveu aumento no número de projeções citoplasmáticas, aumento do volume celular e espraiamento. Assim, estes resultados demonstram que a (+)-filantidina foi eficaz na redução do crescimento de formas promastigotas do protozoário, sendo eficaz na ativação de macrófagos sem causar efeito citotóxico para o mesmo, o que pode representar uma fonte alternativa para o tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, Atividade Leishmanicida; Alterações ultraestruturais; Alcaloide; (+)-filantidina.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an antrozoonotic disease caused by parasites of the genus *Leishmania*. These parasites proliferate primarily within macrophages of mammals and are responsible for promoting a variety of clinical manifestations, such as cutaneous leishmaniasis (CL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL). The treatment available is chemotherapy, but is limited by toxicity and requires a long term treatment. The study of natural products from plants such as antileishmanial agent currently plays an important role in the search for new drugs for the treatment of leishmaniasis. (+)-phylantidine, is an alkaloid extracted from stem of *Margaritaria nobilis* of the family Phyllanthaceae. The aim of this study is evaluated the effects of (+)-phylantidine on promastigotes forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and host cell. Antiproliferative activity of promastigotes forms was observed when parasites were treated with 50, 100 e 200 µg/mL of alkaloid for 96 hours, with reduction of 73.75%, 82.50% and 88.75%, respectively when compared with non-treated parasites. In the period of 96 hours it was observed an IC₅₀ of 56.34 µg/mL. Amphotericin B was used as reference drug and reduction of 100% in parasites treated with 0.1 µg/mL was observed after 96 hours. Treatment with the alkaloid promoted important changes in promastigotes that were observed by scanning and transmission electron microscopy. Alterations in cell body, flagellum, kinetoplast, mitochondria, rosette formation, presence of electrodense vesicles suggestive of lipid body and increase in structures like acidocalcissomes were observed. In the host cell no cytotoxic effect was observed in the macrophages treated with the alkaloid and analysis by scanning electron microscopy showed that the alkaloid promoted an increase in the number of cytoplasmic projections, increased cell volume and spreading. Thus, these results demonstrate that (+)-phylantidine was effective in reducing the growth of the protozoa, without citotoxy effect which may represent a promising natural alternative source for the treatment of leishmaniasis.

Key words: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; Leishmanicidal activity; Alkaloid; (+)-Phylantidine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Classificação taxonômica do gênero *Leishmania*..... 11
- Figura 2:** Principais espécies dermatrópicas de *Leishmania*..... 12
- Figura 3:** Formas evolutivas de *Leishmania* sp. (A) Promastigota e (B) Amastigota... 13
- Figura 4:** Ciclo biológico da *Leishmania* sp. 16
- Figura 5:** Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana. (A) Leishmaniose cutânea localizada (LCL); (B) Leishmaniose cutâneo-difusa (LCD); (C) Leishmaniose mucocutânea (LMC)..... 17
- Figura 6:** Esquema da síntese do NO. O aminoácido L-arginina é transportado para o interior da célula com o auxílio de uma proteína transportadora, e no interior da célula é convertido pela enzima iNOS em L-citrulina e NO. 20
- Figura 7:** (A) Planta *Margaritaria nobilis*. (B) Estrutura química do alcaloide (+)-filantidina..... 26
- Figura 8:** Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com diferentes concentrações de (+)-filantidina durante 96 horas. A diferença entre as células tratadas e o grupo controle (CTL) sem tratamento é representada por: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 35
- Figura 9:** Alterações morfológicas em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com o alcaloide (+)-filantidina e observadas por MEV. (A e B) Promastigotas sem tratamento. (C e D) Promastigotas tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ do extrato. Observar divisão celular atípica (seta maior) e duplicação do flagelo (seta menor). (E e F) Promastigotas tratadas com 100 $\mu\text{g/mL}$ do alcaloide. Observar encurtamento do flagelo (seta), debris celulares e formação de rosetas. Barras: (A, C e E) 20 μm , (B e D) 10 μm e (F) 50 μm 37
- Figura 10:** Alterações ultraestruturais de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com o alcaloide (+)-filantidina. (A) Grupo controle: Promastigotas sem tratamento. (B) Promastigotas tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ do alcaloide. (C) Promastigotas tratadas com 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato. N – núcleo; BF – bolsa flagelar; K – cinetoplasto; F – flagelo; M – Mitocôndria. Barras: 39
- Figura 11:** Viabilidade celular através do método MTT em macrófagos peritoneais cultivados por 24 horas e tratados com diferentes concentrações de (+)-filantidina por 1 hora. 40
- Figura 12:** Análise da viabilidade celular de macrófagos tratados com (+)-filantidina por 1 hora pelo método JC-1 através de citometria de fluxo. (A) Macrófagos sem tratamento, (B) Macrófagos tratados com 50 $\mu\text{g/mL}$ de (+)-filantidina, (C) Macrófagos tratados com 100 $\mu\text{g/mL}$ de (+)-filantidina. 41

Figura 13: Teste de apoptose feito por citometria de fluxo utilizando Iodeto de Propídio e Anexina-V como marcadores em macrófagos tratados com (+)-filantidina. (A) Macrófagos controle (sem tratamento); (B) Células tratadas com 50µg/ml do alcaloide; (C) Macrófagos tratados com 100 µg/ml..... 42

Figura 14: Microscopia eletrônica de Varredura de macrófagos tratados com (+)-filantidina. (A e B) Macrófagos sem tratamento. Observar formato arredondado das células e poucas projeções citoplasmáticas. (C e D) Células tratadas com 50 µg/mL. Observar presença de inúmeros filopódios (seta grossa). (E e F) Macrófagos tratados com 100 µg/mL. Observar células com alteração no tamanho e forma e maior espraiamento celular mostrando a presença de lamelipódios (setas finas) quando comparadas às células não tratadas. Barras: (A, C e E) 30 µm; (B, D e F) 10 µm. 44

Figura 15: Detecção da produção de radicais superóxido através da citoquímica com NBT em macrófagos tratados por 1 hora com o alcaloide (+)-filantidina. (A) Controle negativo sem tratamento. Observar ausência de reação. (B) Controle positivo, macrófagos infectados com *Sacharomyces cerevisiae*. Observar reação no local da interação (setas). (C) Macrófagos tratados com 50 µg/mL. (D) Macrófagos tratados com 100 µg/mL. Observar reação nos macrófagos tratados (setas). (E) Porcentagem de macrófagos marcados com NBT. Barras: 10 µm. 46

Figura 16: Detecção da produção de Espécies Reativas de Oxigênio em macrófagos tratados com (+)-filantidina através do marcador fluorescente CellRox[®]. Foi utilizado teste ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey com $p < 0,05$ 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- BSA – Sigla inglesa para soro albumina bovina
- B.O.D - *Biological Oxygen Demand*
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DMSO – Dimetilsufóxido
- ERO- Espécie Reativa de Oxigênio
- FS – Fosfatidilserina
- GP63 – Glicoproteína de superfície de 63kDa
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- IL- Interleucina
- IP - Iodeto de Propídio
- IC₅₀ – concentração inibitória máxima capaz de inibir em 50% o crescimento
- INF- γ – Interferon γ
- iNOS – Óxido nítrico sintase induzida
- LC – Leishmaniose cutânea
- LCDB – Leishmaniose Cutânea Disseminada Borderline
- LCD – Leishmaniose cutâneo difusa
- LCL – Leishmaniose cutâneo localizada
- LMC – Leishmaniose mucocutânea
- LPG - Lipofosfoglicano
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LTA – Leishmaniose tegumentar americana
- LV – Leishmaniose visceral
- MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- $\mu\text{g/mL}$ - Microgramas por mililitros
- μL – Microlitros
- μm – Micrômetros
- mg/mL – Miligramas por mililitros
- MTT – Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
- NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase hidrogenase
- NNN – Neal, Novy e Nicolle
- NO – Sigla inglesa para Óxido nítrico

OMS – Organização mundial da Saúde

PBS – Sigla inglesa para Tampão Fosfato Salino

PHEM – Solução tamponada contendo PIPES, HEPES, EGTA e magnésio

ROS – Radicais de oxigênio

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SBF – Soro Bovino Fetal

SFM – Sistema fagocítico mononuclear

SOD – Superóxido Dismutase

O^{2-} – Aniôn superóxido

$\Delta\Psi$ – Potencial de membrana mitocondrial

$^{\circ}C$ – graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	10
1.2 <i>Leishmania</i> sp.	11
1.2.1 Classificação	11
1.2.2 Morfologia	12
1.2.3 Organelas e estruturas da <i>Leishmania</i> sp.	13
1.2.4 Ciclo biológico	15
1.3 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	16
1.3.1 Epidemiologia, clínica e imunologia.	16
1.4 CÉLULA HOSPEDEIRA	19
1.4.1 Interação parasita-hospedeiro	20
1.5 TRATAMENTO	22
1.5.1 Produtos naturais com ação leishmanicida	23
1.5.2 Alcaloides	24
1.5.3 <i>Margaritaria nobilis</i> e o alcaloide (+)-filantidina	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL:	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	28
3.1.1 Obtenção da (+)-filantidina	28
3.1.2 Diluição da droga	28
3.1.3 Cultivo e manutenção do parasita	28
3.1.4 Obtenção e cultivo da célula hospedeira	28
3.1.5 Tratamento dos macrófagos com (+)-filantidina	29
3.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	29

3.2.1 Atividade antipromastigota	29
3.3 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS FORMAS PROMASTIGOTAS TRATADAS COM (+)-FILANTIDINA.....	30
3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	30
3.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	30
3.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS MURINOS TRATADOS COM (+)-FILANTIDINA.....	31
3.4.1 Método <i>Thiazolyl blue</i> (MTT)	31
3.4.2 Detecção do potencial de membrana mitocondrial (JC-1)	32
3.4.3 Detecção de apoptose em macrófagos tratados com (+)-filantidina e marcados com Iodeto de Propídio (IP) e Anexina V	32
3.5 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM (+)-FILANTIDINA	33
3.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	33
3.6 RESPOSTA MICROBICIDA DOS MACRÓFAGOS TRATADOS COM (+)-FILANTIDINA.	33
3.6.1 Detecção de Radicais Superóxidos em Macrófagos tratados com (+)-filantidina	33
3.6.1.1 Método Nitroblue Tetrazolium (NBT)	33
3.6.2 Detecção de Espécie Reativa de Oxigênio em Macrófagos tratados com (+)-filantidina	34
3.6.2.1 Kit CellROX [®]	34
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4 RESULTADOS	35
4.1 ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	35
4.1.1 Atividade antipromastigota	35
4.2 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS FORMAS PROMASTIGOTAS	36
4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	36
4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	38
4.3 VIABILIDADE CELULAR DA CÉLULA HOSPEDEIRA.....	40

4.3.1 Método Thiazolyl blue (MTT)	40
4.3.2 Potencial de Membrana Mitocondrial (JC-1).....	41
4.3.3 Anexina V e Iodeto de Propídeo	42
4.4 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA CÉLULA HOSPEDEIRA.....	43
4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	43
4.5 RESPOSTA MICROBICIDA DOS MACRÓFAGOS TRATADOS	45
4.5.1 Detecção de Radicais Superóxidos.....	45
4.5.1.1 Método Nitroblue Tetrazolium (NBT)	45
4.5.2 Detecção de Espécie Reativa de Oxigênio	47
4.5.2.1 Kit CellROX [®]	47
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

As leishmanioses são doenças consideradas um sério problema de saúde pública, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, acometendo cerca de 12 milhões de pessoas no mundo (BRASIL, 2010). Desse total, 75% são casos de leishmaniose cutânea e 25% de leishmaniose visceral (GOMES *et al.*, 2012), com cerca de 20 espécies patogênicas ao homem. É considerada uma das seis doenças tropicais de maior importância no mundo (WHO, 2010).

A leishmaniose é endêmica em 98 países, tendo a maioria dos casos reportados em países tropicais e subtropicais (ALVAR *et al.*, 2012). Países da América Latina como Brasil e Peru, registram elevados índices de doença, com cerca de 90% dos casos notificados (WHO, 2010).

A doença é transmitida através da picada da fêmea hematófaga dos gêneros *Lutzomia* (novo mundo) e *Phlebotomus* (velho mundo), que inoculam formas promastigotas infectantes durante o repasto sanguíneo, que se transformam em formas amastigotas no interior da célula hospedeira. De acordo com a espécie envolvida e a relação parasita-hospedeiro, a leishmaniose pode apresentar diferentes formas clínicas, destacando as formas visceral e tegumentar (WANG *et al.*, 2010).

O tratamento utilizado para a leishmaniose é o mesmo desde a década de 40, com os antimoniais pentavalentes como drogas de eleição (BRASIL, 2011; WHO, 2010). Como drogas de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose tegumentar americana (LTA) em pacientes que não respondem ou tem alguma restrição aos antimoniais são usados pentamidina e anfotericina B (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Alguns estudos demonstram que as drogas utilizadas apresentam algumas limitações, como resistência das cepas, alto custo, toxicidade elevada, reações adversas e invasividade do tratamento (CROFT *et al.*, 2003; AMEEN, *et al.*, 2010).

Devido a esses problemas enfrentados, a leishmaniose ainda é uma doença com tratamento limitado. Alguns estudos foram desenvolvidos na busca de um método alternativo para ser utilizado no tratamento da doença atuando em diferentes vias. Dentre os bioprodutos desenvolvidos destacam-se os alcaloides, metabólitos secundários, extratos, polissacarídeos dentre outros, que são extraídos de diversas fontes (KAYSER *et al.*, 2001; MISHRA *et al.*, 2009).

1.2 *Leishmania* sp.

1.2.1 Classificação

De acordo com Ross (1903), o gênero *Leishmania* pertence taxonomicamente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatida. A classificação mais utilizada é a proposta por Lainson & Shaw (1987), a qual subdivide o gênero *Leishmania* em dois subgêneros, o *Leishmania* e o *Viannia* (Figura 1).

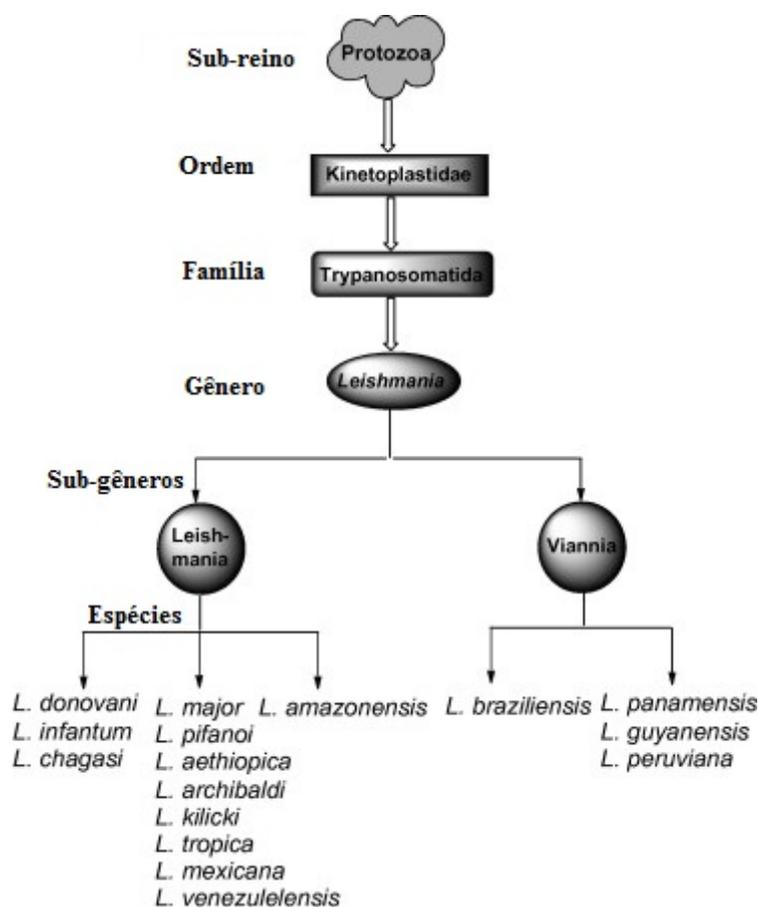


Figura 1: Classificação taxonômica do gênero *Leishmania*.

Fonte: SINGH, *et.al*, 2013 (Modificada).

Algumas espécies de *Leishmania* distribuídas no mundo apresentam características específicas quanto aos vetores, manifestações clínicas, epidemiologia, resposta ao tratamento e distribuição geográfica (VALE & FURTADO, 2005).

Cerca de 30 espécies de *Leishmania* foram descritas, onde 20 são patogênicas ao homem (NEUBER, 2008). No Brasil, oito espécies dermatrópicas são importantes por causarem doença em humanos, com duas pertencentes ao subgênero *Leishmania* e seis ao subgênero *Viannia* (Figura 2). Três espécies são bem conhecidas: *Leishmania (Viania) braziliensis*, *Leishmania (Viania) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, sendo a última, alvo do presente estudo e responsável pelas formas cutânea localizada e difusa, estando distribuída pelas Américas, com notificação em todas as regiões brasileiras (REITHINGER *et al.*, 2007).

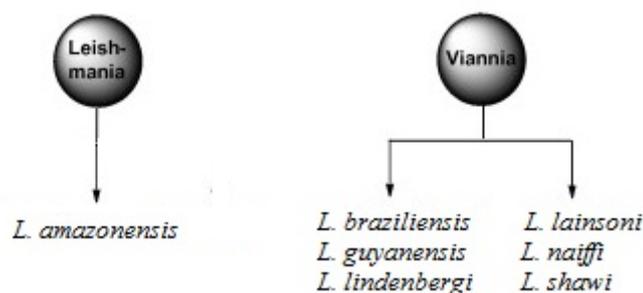


Figura 2: Principais espécies dermatrópicas de *Leishmania*.

Fonte: SINGH, *et.al.*, 2013 (Modificada).

1.2.2 Morfologia

Protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* são digenéticos (alternam entre dois hospedeiros: vertebrados e invertebrados), unicelulares, intracelulares obrigatórios do sistema fagocítico e apresentam duas formas evolutivas em seu ciclo biológico, a forma promastigota, encontrada no hospedeiro invertebrado e a forma amastigota, encontrada no vacúolo parasitóforo dos macrófagos do hospedeiro vertebrado (TANAKA *et al.*, 2007).

As formas promastigotas são encontradas colonizando o tubo digestivo e saliva do inseto vetor, são delgadas medindo 1,5 µm de largura e 20 µm de comprimento, apresentando um flagelo livre na extremidade anterior que emerge da bolsa flagelar, multiplicam-se por divisão binária, são extracelulares e transmitidas ao hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo do vetor hematófago (SACKS & KAMHAWI, 2001) (Figura 3A). Na região central é possível visualizar o núcleo arredondado ou oval e uma estrutura característica da ordem, o cinetoplasto em forma de bastão. Essas

formas podem ser subdivididas em formas procíclicas, com multiplicação no intestino do vetor e metacíclicas, formas infectantes para o hospedeiro vertebrado.

As formas promastigotas procíclicas apresentam um glicocálice com cerca de 7nm de espessura enquanto que as promastigotas metacíclicas, estão cobertas por uma camada de glicocálice com 17nm de espessura, que pode ser perdido após fagocitose e/ou após transformação intracelular (TUON et. al, 2008).

As formas amastigotas variam de arredondadas a ovóides, medindo entre 2 a 6µm, apresentando um flagelo reduzido, que está internalizado na bolsa flagelar (Figura 3B). Estas formas são intracelulares obrigatórias e estão presentes em vacúolos de células do sistema mononuclear fagocítico (SMF), principalmente nos macrófagos, onde irão sofrer multiplicação por divisão binária e romper a célula hospedeira para liberação de novas amastigotas que estarão aptas a infectar outras células (VANIER-SANTOS, 2002).

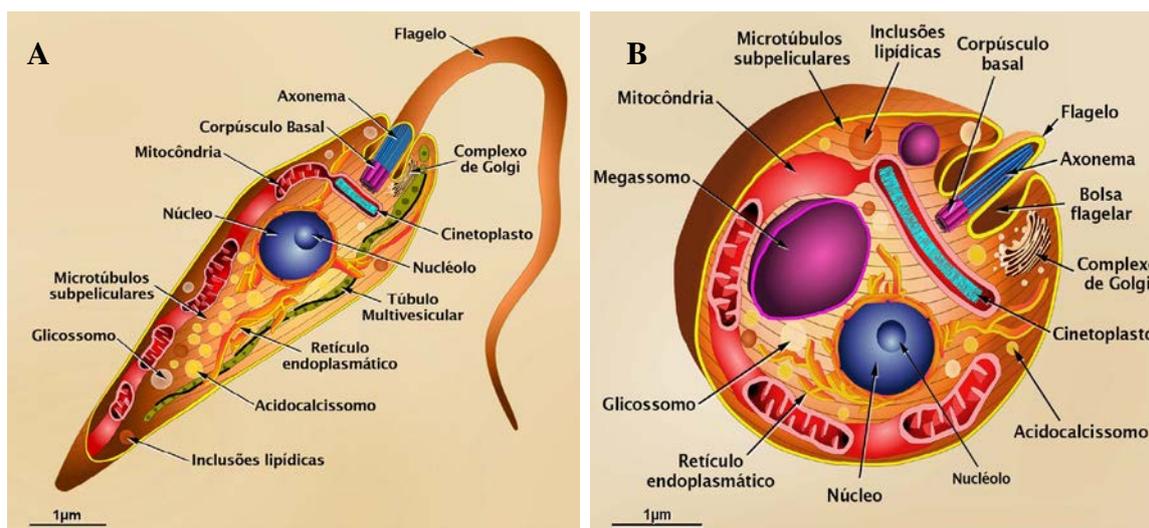


Figura 3: Formas evolutivas de *Leishmania* sp. (A) Promastigota e (B) Amastigota.

Fonte: Teixeira *et al.*, 2013.

1.2.3 Organelas e estruturas da *Leishmania* sp.

As duas formas evolutivas apresentam estruturas que são específicas de protozoários pertencentes a ordem Kinetoplastida, como o cinetoplasto, acidocalcisomo e outras organelas comuns aos demais eucariotos, como núcleo, retículo endoplasmático, complexo de Golgi. O corpo do protozoário é revestido por uma membrana plasmática constituída de lipídios, ergosterol, carboidratos e proteínas.

Algumas proteínas de superfície como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína 63 (GP63) conferem proteção ao parasita contra a resposta imune do hospedeiro.

Sob a membrana plasmática está localizada uma estrutura que confere rigidez e/ou flexibilidade ao corpo do parasita, o citoesqueleto. Esta estrutura é composta por microtúbulos - envolvidos na locomoção, divisão celular e manutenção da forma - e actina, proteína que auxilia na motilidade, contratilidade e transporte celular. Abaixo da membrana do parasita, são encontrados microtúbulos subpeliculares interligados que estão envolvidos na manutenção da forma das células e conferem rigidez ao corpo celular protegendo o parasita de estresses mecânicos (JAYANARAYAN & DEY, 2002).

Os tripanossomatídeos apresentam um flagelo único que emerge da bolsa flagelar localizada na região anterior das formas promastigotas e amastigotas. Esta estrutura tem função sensorial, de motilidade e fixação. A bolsa flagelar é o local onde ocorrem os processos de exocitose e endocitose da leishmania.

A mitocôndria é uma estrutura presente nas formas promastigota e amastigota é única e ramificada, está localizada abaixo dos microtúbulos e apresenta um arranjo complexo de DNA mitocondrial, denominado cinetoplasto, característico de sua ordem *Kinetoplastida*, uma região dilatada localizada próximo ao flagelo (CAVALCANTI *et al.*, 2008).

O núcleo é bem definido, com um cariossomo central, cromatina e nucléolo. É envolto por membranas que possuem poros nucleares e a membrana externa é contínua à membrana do retículo endoplasmático (DE SOUZA, 2008).

Além dessas estruturas, o protozoário possui outras que também são importantes para o seu ciclo de vida. O complexo de Golgi, localizado próximo a bolsa flagelar, é responsável pelos processos de glicosilação e sulfatação. O retículo endoplasmático (liso e rugoso) presente em todo corpo celular e em grande parte próximo aos microtúbulos subpeculiares e mitocôndria, está envolvido na síntese de lipídeos e proteínas (DE SOUZA, 2002). Os acidocalcissomos são organelas ácidas que estocam cálcio, cátions e fósforo, atuando na manutenção da homeostase, pH e osmorregulação (DOCAMPO *et al.*, 2005).

Os glicossomos são organelas delimitadas por membrana, presentes em grande quantidade em amastigotas e estão envolvidos em processos celulares, como metabolismo de peróxido, gliconeogênese e biossíntese de lipídeos (OPPERDOES & COOMBS, 2007).

Os megassomos são estruturas que tem atividade lisossomal, importantes para a sobrevivência das amastigotas no macrófago, sendo o destino final de todas as macromoléculas ingeridas pelo processo de endocitose do parasita (DE SOUZA *et al.*, 2009).

1.2.4 Ciclo biológico

O ciclo biológico varia de acordo com o hospedeiro, região geográfica, tipo de vetor, espécie do parasita e reservatório. O hospedeiro acidental é o homem, já os hospedeiros naturais são cães, gatos, alguns animais silvestres como preguiças, marsupiais e canídeos selvagens, que são considerados reservatórios desses patógenos, caracterizando a leishmaniose como uma zoonose. A transmissão ocorre principalmente em áreas florestais, quando o homem invade o ecossistema onde esses animais vivem.

No hospedeiro mamífero, as formas amastigotas estão livres na circulação ou dentro dos macrófagos e são ingeridas pelo vetor durante o repasto sanguíneo em vertebrados contaminados. As formas amastigotas alcançam o intestino médio do vetor, onde estas formas se transformam em promastigotas procíclicas e posteriormente em promastigotas metacíclicas, através de uma diferenciação celular denominada metaciclogênese, tornando-se infectantes para o hospedeiro vertebrado (NEUBER, 2008). As promastigotas metacíclicas migram para a probóscide do inseto vetor e são inoculadas no hospedeiro durante o hematofagismo, onde resistem à ação do complemento, devido à presença de algumas moléculas na superfície do parasita, como a LPG e a GP63, sendo fagocitadas por células do SFM, principalmente macrófagos, que são atraídos para o local da inoculação pela intensa reação inflamatória (GUEIRARD *et al.*, 2008)

Após ação das células do SFM, ocorre formação do vacúolo parasitóforo, onde as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, sendo estas resistentes e aptas a se multiplicarem por divisão binária no interior do vacúolo parasitóforo (HENRIQUES *et al.*, 2003), até a ruptura deste, liberando as formas amastigotas na circulação, infectando células vizinhas e novos vetores ao se alimentarem de sangue do hospedeiro infectado (Figura 4) (SAKTHIANANDESWAREN *et al.*, 2009).

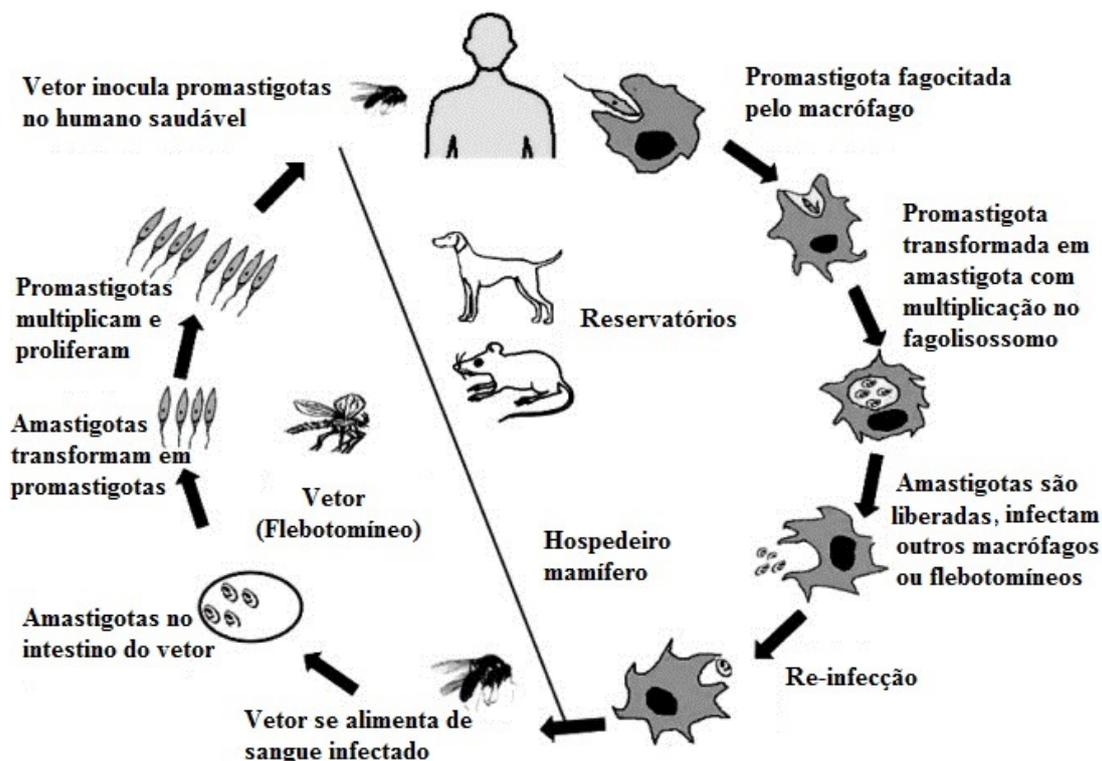


Figura 4: Ciclo biológico da *Leishmania* sp.
Fonte: SINGH, *et.al*, 2013 (Modificada)

Os vetores das leishmanioses são dípteros que pertencem a subfamília *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia*, sendo denominados cientificamente como flebotomíneos e popularmente recebem várias denominações como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros de acordo com a região onde são encontrados. Esses vetores podem ser encontrados no mundo inteiro, mas predominam em climas tropicais, subtropicais e temperados (LAINSON, 2010).

1.3 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

1.3.1 Epidemiologia, clínica e imunologia.

É uma doença infecciosa de caráter antroponótico e uma das infecções mais frequentes. Esta doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e apresenta evolução crônica, afetando a pele de forma difusa ou localizada (DAVID & CRAFT, 2009).

A LTA é considerada como uma das seis doenças infecciosas mais importantes de acordo com a OMS, sendo um sério problema de saúde pública, com cerca de 2

milhões de casos registrados por ano. O Brasil é um dos países que apresenta elevada incidência de LTA, com destaque para as formas cutânea e mucocutânea (ALVAR, *et al.*, 2012).

Na América do Sul e Central são registrados cerca de 60.000 novos casos de LTA, sendo que deste total de novos casos, 79% ocorrem no Brasil, Colômbia e Peru. No Brasil, no ano de 2010 foram registrados cerca de 22.000 casos de LTA, com uma atenção para a região norte, que registrou 32% dos casos, sendo o Pará, o estado que mais contribuiu para essa estimativa com cerca de 30% dos casos, mostrando assim o caráter endêmico da doença no Estado (WHO, 2010).

Estudos epidemiológicos demonstram que estão ocorrendo mudanças no comportamento da doença, devido a ação antrópica, como desmatamentos, construção de barragens, urbanização e a migração de pessoas não–imunes para áreas endêmicas são fatores que estão contribuindo para mudanças no perfil da doença (SILVA & MUNIZ, 2009; GOTO & LINDOSO, 2010).

A LTA apresenta diferentes manifestações clínicas e de acordo com o Ministério da Saúde é uma infecção bastante frequente, tendo as regiões Nordeste e Norte com maior incidência de leishmaniose representando 40% e 32% dos casos respectivamente. Na região Norte, destaca-se os estados do Acre, Amazonas e Pará. No estado do Pará, em 2010 foram confirmados 2.331 casos da doença, mostrando assim o caráter endêmico da doença no Estado (BRASIL, 2011 Sinan/SVS/MS).

De acordo com a espécie, aspectos clínicos, imunológicos e características diferenciais das lesões, a doença pode ser caracterizada em: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LMC) e Leishmaniose Cutânea Disseminada *borderline* (LCDB) (SILVEIRA *et al.*, 2008) (Figura 5).

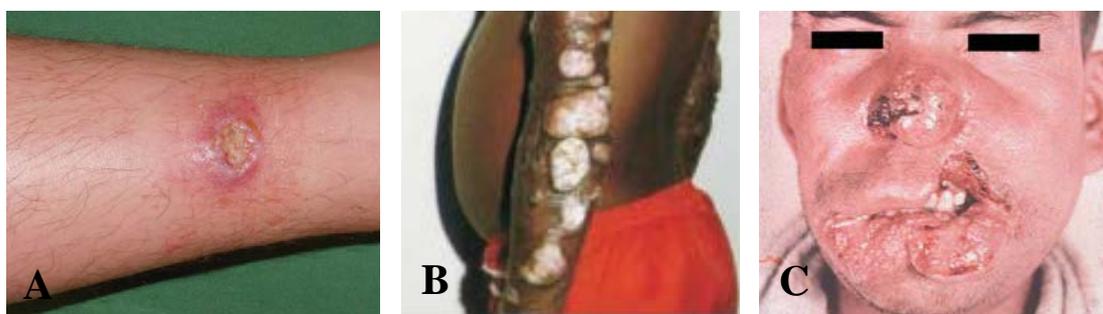


Figura 5: Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana. (A) Leishmaniose cutânea localizada (LCL); (B) Leishmaniose cutâneo-difusa (LCD); (C) Leishmaniose mucocutânea (LMC).

Fonte: (A e C) NEUBER, 2008; (B) SILVEIRA *et al.*, 2004.

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma clínica mais frequente. É caracterizada por lesão ulcerativa, única, arredondada, geralmente indolor, que acomete primariamente a pele, localizada principalmente no local do repasto sanguíneo, podendo disseminar para a via linfática e variando quanto a gravidade, espectro clínico e tempo para cura espontânea (PIRES *et al.*, 2012).

Na LCL, a presença de macrófagos intensamente parasitados por formas amastigotas e presença de infiltrado de plasmócitos são características comuns nas lesões causadas por *Leishmania (L.) amazonensis*. O perfil imunológico da LCL é caracterizado pela presença de linfócitos T CD4+, predominando resposta do tipo Th1 (SILVEIRA *et al.*, 2004), com expressão das IL-4 e IFN- γ que promovem ativação de macrófagos e eliminação do parasita determinando resistência a infecção (SILVEIRA, *et al.*, 2008; MOUGNEU, *et al.*, 2011). Resposta do tipo Th2 com presença de células CD8+ está relacionada a susceptibilidade a infecção e pacientes que apresentam equilíbrio entre as respostas do tipo Th1 e Th2 podem apresentar cura espontânea. (SILVEIRA *et al.*, 2004, SILVEIRA *et al.*, 2009).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é a forma mais rara, severa e de difícil tratamento da doença. É caracterizada por nódulos múltiplos não ulcerados, múltiplos e disseminados, que se difundem a partir do local inicial da infecção, podendo abranger todo o corpo do paciente. O predomínio de resposta em pacientes infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* é do tipo Th-2, com elevada expressão de IL-10, IL-4 e IL-5, que vão inibir a ativação de macrófagos permitindo sobrevivência do parasita (PIRES *et al.*, 2012; NYLÉN & EDISMO, 2012).

Nesta forma ocorre supressão da resposta imune, possibilitando a proliferação do parasita. O infiltrado inflamatório é rico em macrófagos, mas a expressão de TNF- α é ausente e a enzima óxido nítrico sintase induzida é inibida (iNOS) (NYLÉN & EDISMO, 2012). Esta intensa proliferação foi mostrada por Silveira *et al.* (2009) ao analisar tecidos de ratos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*, onde observaram presença de macrófagos fortemente parasitados, um único vacúolo parasitóforo com várias amastigotas.

Na leishmaniose mucocutânea (LMC) ocorre ativação mista de linfócitos Th-1 e Th-2, tendo como característica principal a destruição da mucosa (REINTHINGER *et al.*, 2007). A leishmaniose cutânea disseminada *borderline* (LCDB) é um perfil que apresenta características da LMC e da LCD (SILVEIRA *et al.*, 2004).

1.4 CÉLULA HOSPEDEIRA

Os macrófagos são as principais células fagocíticas, especializadas na destruição de agentes patogênicos invasores, sendo consideradas células centrais da resposta imune inata (CHANG et al., 2010). Estas células são originadas após migração de monócitos da corrente sanguínea para diferentes tipos de tecidos. Após maturação, os macrófagos expressam algumas proteínas em sua superfície, como a EMRI F4/80, uma proteína exclusiva dessas células, parece ser importante para o processo de adesão, migração e sinalização celular, porém tais funções ainda não estão completamente elucidadas (KHAZEN et al., 2005; MOSSER & EDWARDS, 2008).

Essas células têm como principais funções destruir e eliminar os agentes infecciosos e para exercer essas funções, apresenta estruturas como complexo de Golgi e retículo endoplasmático bem desenvolvidos e um grande número de lisossomos (ABBAS et al., 2011; SMIT et al., 2008).

A superfície dessa importante célula de defesa é composta por vários receptores que tem por função o reconhecimento de antígenos do parasita (GRUENHEID & FINLAY, 2003). Ao entrar em contato com o microrganismo, é desencadeado um processo de sinalização celular que promove algumas alterações no macrófago como aumento da capacidade fagocítica – pela presença de alguns receptores como o CR1, CR3 e CD14 (receptor para LPS) – e alterações morfológicas, como espraiamento celular, caracterizando assim o processo de ativação celular (PATEL & SETHI, 2009; ROSSETI, 2009; LÁZARO-DIÉGUEZ et al., 2008).

O processo de ativação dos macrófagos é estimulado por citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-6, que induzem liberação de algumas substâncias tóxicas, como espécies reativas de oxigênio (ERO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânions superóxidos (O²⁻) e óxido nítrico (NO) (STEMPIN & CERBAN, 2007; MOSSER et al., 2008). A liberação dessas substâncias caracteriza o chamado “*burst oxidativo*”, que irá auxiliar a célula hospedeira na destruição do parasita (ROBINSON, 2004). ERO estão relacionadas ao complexo enzimático NADPH, que está distribuído pela membrana do fagossomo e citosol. Após estímulos, as subunidades que formam este complexo são unidas, sendo capazes de reduzir O₂ em O²⁻, que é convertido em H₂O₂ por meio de enzima superóxido dismutase (SOD) (OLIVEIRA et al., 2009).

Outra importante substância produzida pelos macrófagos após ativação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) principalmente através da LPS e do INF- γ

é o NO, uma molécula altamente reativa com potente ação microbicida (HORTELANO, 2003; WINBERG et al., 2007) sendo importante também para sinalizar reações moleculares no interior da célula, promovendo ativação da guanilato ciclase, com posterior liberação de Ca^{++} intracelular (LO et al., 2002; WINBERG et al., 2007). A iNOS promove a conversão do aminoácido L-arginina em NO e L-citrulina após ativação da célula hospedeira (Figura 5).

Além das características mostradas, o NO também atua como importante mediador inflamatório no combate de agente infeccioso, impedindo a progressão tumoral e no controle de doenças autoimunes e degenerativas (ROSSETI, 2009).

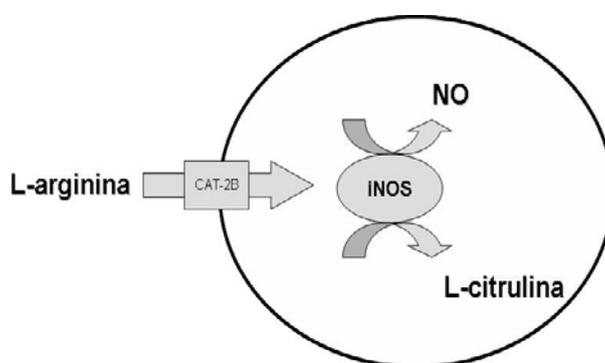


Figura 6: Esquema da síntese do NO. O aminoácido L-arginina é transportado para o interior da célula com o auxílio de uma proteína transportadora, e no interior da célula é convertido pela enzima iNOS em L-citrulina e NO.

Fonte: RODRIGUES, 2008.

1.4.1 Interação parasita-hospedeiro

Parasitas do gênero *Leishmania* são intracelulares obrigatórios, que possuem afinidade por macrófagos se multiplicando dentro do vacúolo parasitóforo (KLING & KÖRNER, 2013). Além dos macrófagos, esse parasita pode infectar outras células do sistema imune, como células dendríticas, fibroblastos e neutrófilos (SILVA, 2010).

Os macrófagos são células importantes para defesa do organismo, desempenhando função vital no reconhecimento de microorganismos patogênicos, destruição e eliminação destes (GOMES-SILVA et al., 2007).

O macrófago, ao entrar em contato com o parasita, sofre algumas alterações morfológicas e funcionais, transformando-se em uma célula capaz de fagocitar o parasita gerando, assim, um ambiente adverso no interior do vacúolo. Mesmo com esse ambiente desfavorável, o parasita consegue burlar as condições hostis como

temperatura, pH e substâncias tóxicas, sobrevivendo dentro da célula hospedeira onde passa da forma promastigota para amastigota que se divide e pode infectar outras células (LIU & UZONNA, 2012).

A superfície do parasita é recoberta por algumas moléculas, como lipofosfoglicana (LPG), fosfatidilserina (FS) e a glicoproteína de superfície de 63kDa (GP63), que são importantes para o desenvolvimento da infecção, uma vez que inativam a resposta microbicida do macrófago (TRIPATHI-GUPTA, 2003; SOARES et al. 2005).

Durante o processo de interação, a LPG inibe a ligação do sistema complemento ao parasita conferindo resistência a *Leishmania*. Naderer & Mcconville (2008) demonstraram que durante a fase inicial da infecção, a LPG é responsável por retardar a fusão do fagossomo com o lisossomo, mostrando assim, que esta molécula contribui para que formas promastigotas resistam a condições adversas do interior do vacúolo para que possam se diferenciar em amastigotas. Esses mecanismos desenvolvidos pelo parasita mostram que o protozoário é capaz de manipular de várias formas a célula hospedeira.

A GP63 é uma metaloproteinase dependente de zinco que recobre toda a superfície das formas promastigotas, tornando-as mais resistentes a ação do sistema complemento, pois atua no processo de clivagem da molécula C3b em C3bi impedindo a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (CHANG & MACGWIRE, 2002). Nas formas amastigotas, a GP63 é importante, pois degrada enzimas lisossomais que estão presentes no ambiente ácido dos fagolisossomos (OLIVER et al., 2005).

Com isso, a busca pelo entendimento dos mecanismos que são utilizados pelo parasita para burlar o sistema imune do hospedeiro e da função específica de cada molécula da superfície do protozoário é um caminho importante para o desenvolvimento de drogas e vacinas eficazes contra a leishmaniose (OKWOR & UZONNA, 2009; HORTA, et al., 2012).

1.5 TRATAMENTO

A leishmaniose é uma doença causada por várias espécies de *Leishmania* e seu tratamento é o mesmo utilizado a mais de 60 anos. Algumas drogas foram desenvolvidas e estão sendo usadas devido a não existência de uma vacina contra a doença (GOTO & LINDOSO, 2010).

Embora diferentes espécies de leishmania causem a doença e induzam diferentes fenótipos de lesão, o tratamento utilizado é o mesmo para todas as formas, tendo como drogas de primeira escolha antimoniais pentavalentes como Pentostan[®] e Glucantime[®].

A ação dos antimoniais sobre o parasita já foi comprovada, onde estudos demonstram que os antimoniais são capazes de atuar no metabolismo de ácidos graxos e glicose de formas amastigotas de protozoários do gênero *Leishmania*, bem como induzir a ativação da resposta microbicida dos macrófagos (ALAVI-NAINI et al., 2012; MCGWIRE & SATOSKAR, 2014).

Com o passar do tempo, o uso prolongado e altas doses desses medicamentos estava promovendo resistência ao tratamento com os antimoniais e, além disso, essas drogas têm custo elevado, são tóxicas, causam muitos efeitos adversos aos pacientes e precisam ser administradas diariamente (SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2013).

Como droga de segunda escolha, são utilizadas pentamidinas e anfotericinas, que são administradas em pacientes que apresentam alguma restrição ou não tem resposta ao tratamento com os antimoniais.

Bailey & Lockwood (2007), demonstraram que as pentamidinas apresentam eficácia contra LV e as espécies *L. panamensis* e *L. guyanensis*. Essa droga parece promover alterações na membrana mitocondrial e cinetoplasto, atuar na inibição da biossíntese de poliaminas e interferir na síntese de DNA (CROFT et al., 2006; GOTO & LINDOSO, 2010).

A anfotericina é um antibiótico poliênico com elevada afinidade pelo ergosterol presente somente na membrana de parasitas do gênero *Leishmania*, formando um complexo com os esteróis da membrana alterando a permeabilidade o que leva a lise das células hospedeiras (MISHRA et al. 2009). Apesar de comprovada sua ação, o uso da ANF-B apresenta algumas limitações como a necessidade de internação do paciente para receber o medicamento e alguns efeitos adversos (PAVLI & MALTEZOU, 2010). O uso da anfotericina no tratamento de outras enfermidades como micoses por um

período muito longo inviabiliza o tratamento da leishmaniose, principalmente em pacientes co-infectados com HIV (CROFT & OLLIARO, 2011).

Outras drogas têm sido utilizadas para o tratamento da leishmaniose e demonstram bastante eficácia e tolerância como miltefosina, edelfosina e ilmofosina.

A miltefosina é uma droga que foi desenvolvida para o tratamento do câncer e teve sua ação leishmanicida demonstrada na década de 80. Esta droga atua induzindo apoptose nas células tumorais (VAN GRIENSVEN & DIRO, 2012), e no parasita interfere na permeabilidade e fluidez da membrana celular, modula a composição lipídica e o metabolismo de fosfolipídeos (COSTA-FILHO et al., 2008).

Ensaio *in vitro* demonstraram a eficácia desta droga em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. donovani* (PARIS et al., 2004). Estudo realizado em pacientes colombianos com LTA o tratamento com miltefosina mostrou taxa de cura de 91% (SOTO et al., 2001), enquanto trabalho feito na Guatemala demonstrou que essa porcentagem foi de 53% (SOTO & BERMAN, 2006).

Teste com o antibiótico miltefosina em seres humanos está bem avançado mostrando resultados satisfatórios em tratamentos da Leishmaniose Visceral na Índia, realizados de um a três meses (RAHMAN et al., 2011; DORLO et al., 2012)

Outras drogas como Itraconazol, Fluconazol, Cetoconazol e Paromomicina estão sendo testadas e encontram-se em diferentes estágios de desenvolvimento (KIM et al., 2009; SKLAVOS et al., 2010; EL-SAYED & ANWAR, 2010). O antibiótico Paromomicina foi descoberto como potente agente leishmanicida em 1960 e vem sendo usado no tratamento da LTA e LV (ASILIAN et al., 2003; SUNDAR et al., 2007).

1.5.1 Produtos naturais com ação leishmanicida

Com o passar do tempo, a busca e o desenvolvimento de novos produtos para o tratamento da leishmaniose, que sejam menos tóxicos, invasivos e principalmente de baixo custo são alvos de diversos estudos. Óleos e extratos oriundos de plantas da região Amazônica usados na medicina popular estão sendo o foco desses estudos (BRAGA et al, 2007; POLONIO & EFFERTH, 2008).

Produtos de origem vegetal tem demonstrado efeito contra parasitas do gênero *Leishmania*. Ueda-Nakamura et al. (2006), demonstraram a ação leishmanicida do óleo proveniente da planta *Ocimum gratissimum*. O óleo essencial extraído da raiz da planta

Croton cajucara foi capaz de promover a redução de 100% dos parasitas bem como alterações estruturais (ROSA et al., 2003). O óleo extraído da folha de *Cymbopogon citratus* após tratamento por 72 horas, foi capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas do protozoário *Leishmania (L.) amazonensis* (SANTIN et al., 2009).

Ao analisar o extrato das folhas de *Calophyllum brasiliense*, Brenzan et al. (2007), demonstraram sua ação contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. O extrato retirado de *Mikania micrantha* mostrou ter ação contra *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Trypanosoma cruzi* (LAURELLA et al., 2012).

Outros produtos com ação leishmanicida como os metabólitos e substâncias produzidas por várias espécies de fungo estão descritos na literatura. O ácido kójico, um metabólito isolado de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Acetobacter* e *Penicillium*, já foi descrito por Rodrigues et al. (2014), como importante agente leishmanicida, promovendo diminuição do crescimento de formas promastigotas e amastigotas *in vitro* e *in vivo*.

Apesar de existirem vários tratamentos para a leishmaniose, ainda não existe uma terapia que seja eficiente para combatê-la (BAILEY & LOCKWOOD, 2007) e muitos estudos estão sendo realizados na busca de bioprodutos que sejam eficazes, que possam ser utilizados em doses baixas e que sejam de baixo custo.

1.5.2 Alcaloides

Os alcaloides são compostos extraídos e/ou produzidos por uma variedade de organismos como fungos, bactérias, animais e plantas, sendo considerados metabólitos secundários. Esses compostos isolados de plantas tem grande importância para defesa contra microrganismos e herbívoros. Para o homem, esses compostos são importantes, pois apresentam diversos efeitos sobre a biologia de alguns parasitas, principalmente sobre protozoários do gênero *Leishmania* (MISHRA et al., 2009).

Alguns alcaloides apresentam efeitos farmacológicos e são utilizados como medicamentos, com destaque para morfina, vincristina (utilizado para o tratamento do câncer), vincamina (vasodilatador), quinina (usada no tratamento da malária), atropina (agente colinérgico), dentre outros (RHOADES, 1979).

Em plantas, esses compostos podem ser isolados do caule, das raízes, do córtex (casca) e das folhas de uma grande variedade como as pertencentes as famílias

Phyllantaceae, Solanaceae, Apocinaceae dentre outras. Apresentam caráter básico devido a presença de átomos de nitrogênio, originados a partir da via do ácido mevalônico, combinado com diversos aminoácidos através de algumas reações. São compostos sólidos sendo encontrados no estado livre, como sais ou como óxidos (DI STASI, 1996).

A ação de alguns alcaloides extraídos de plantas já foi descrita na literatura, com a julocrotina, um alcaloide extraído da planta *Croton pullei var. glabrior*, se mostrou eficiente contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, inibindo proliferação dessas formas de maneira dose-dependente sem efeito citotóxico para a célula hospedeira (GUIMARÃES et al., 2010).

Delorenzi et al. (2001), demonstrou que o alcaloide coronadine foi capaz de inibir 100% do crescimento após 6 dias de tratamento, de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, reduzindo também sobrevivência das amastigotas no interior dos macrófagos. Estudo feito por Rocha et al. (2009), demonstrou potente ação dos alcaloides totais de *Crotalaria retusa* em *Leishmania (L.) chagasi*.

O entendimento do papel biológico e dos benefícios do uso dos alcaloides pode fornecer informações importantes para o desenvolvimento de medicamentos que sejam eficazes, apresentem menos toxicidade e menor custo para o tratamento da leishmaniose.

1.5.3 *Margaritaria nobilis* e o alcaloide (+)-filantidina

A espécie *Margaritaria nobilis* pertence à família Phyllantaceae, gênero *Margaritaria*, apresenta distribuição na América do Sul (APGIII, 2009) sendo conhecida popularmente como “botãozinho”, “cabelo de cotia”, “café bravo”, ou “fruto de jacamin” (Figura 7a) (SECCO et al., 2010). Um pequeno grupo de alcaloides isolados de plantas pertencentes principalmente Phyllantaceae e Euphorbiaceae são conhecidos como alcaloides de securinega (CARSON & KERR, 2006), sendo constituídos estruturalmente de um tetraciclo formado por um anel piperidínico ou pirrolidínico, oxidado ou não e uma lactona bicíclica $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada (Figura 7b). O principal alcaloide securinega é a securinina, isolada das folhas de *Securinega suffruticosa*. Outros alcaloides são comuns a esse grupo, como alosecurinina, (-)-norsecurinina, securitinina e a filantidina, sendo este último alvo de estudo do presente

trabalho. Alguns desses alcaloides estão associados a várias atividades biológicas, como a securinina um potente agente antimalárico e que apresenta atividade bactericida (ZAHNG et al., 2011). A (+)-filantidina é um alcaloide raro que já foi isolado de *Phyllanthus discoides* e *Securinega suffruticosa* e seu enantiômero isolado de *Breynia coronata* (HORII et al., 1972). Estudos mostram que a (+)-filantidina também pode ser obtida através da oxidação da virosecurinina. O alcaloide (+)-filantidina utilizado no presente trabalho foi isolada do caule da planta *Margaritaria nobilis* e até o presente momento não há relatos da atividade biológica dessa substância sobre formas evolutivas do protozoário *Leishmania (L.) amazonensis* e a célula hospedeira.

Como não existe vacina e um tratamento eficaz contra a leishmaniose, a busca por fármacos potencialmente menos tóxicos e de baixo custo é necessária. Com isso, o estudo de novos produtos, principalmente aqueles extraídos de plantas, torna-se uma alternativa para o tratamento, especialmente na região Amazônica, devido sua rica biodiversidade.

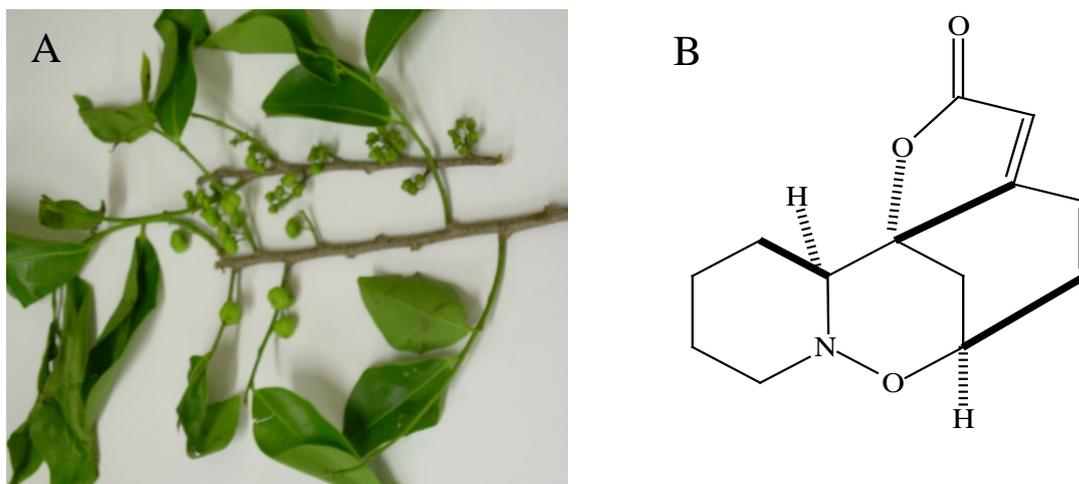


Figura 7: (A) Planta *Margaritaria nobilis*. (B) Estrutura química do alcaloide (+)-filantidina.
Fonte: Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a atividade leishmanicida da (+)-filantidina, um alcaloide isolado do caule da planta *Margaritaria nobilis*, em formas promastigotas do protozoário *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e na célula hospedeira (macrófago).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar atividade anti-promastigota de (+)-filantidina sobre o parasito *Leishmania (L.) amazonensis*.
2. Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do bioproduto em macrófagos peritoneais murino.
3. Analisar alterações ultraestruturais dos macrófagos tratados com o alcaloide.
4. Analisar alterações ultraestruturais de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* após tratamento com o alcaloide.
5. Analisar a resposta microbicida de macrófagos tratados com (+)-filantidina através da detecção da produção radicais superóxido e ERO.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

3.1.1 Obtenção da (+)-filantidina

A (+)-filantidina utilizada no presente trabalho foi cedida pela professora Dr^a Giselle Guilhon do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará. Esse alcaloide foi isolado do extrato etanólico do caule da planta de um espécime de *Margaritaria nobilis*, coletado no município de Igarapé-açu (Pará) e identificado pelo Botânico do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) Dr. Ricardo Secco. A excicata de *Margaritaria nobilis* encontra-se depositada no herbário do MPEG (MG-191.133).

3.1.2 Diluição da droga

A (+)-filantidina foi solubilizada em DMSO e diluída em DMEM ou RPMI, com uma concentração estoque de 1 mg/mL. As concentrações utilizadas foram 10, 20, 50, 100 e 200 µg/mL, obtidas a partir da solução estoque.

3.1.3 Cultivo e manutenção do parasita

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (26361) foram obtidas em meio NNN, a partir do Programa de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará. As promastigotas foram transferidas para meio RPMI 1640, suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF) a 10% e mantidas em estufa B.O.D a 27°C. Foram feitos repiques semanais, até a sexta passagem e foram utilizadas promastigotas na fase exponencial de crescimento (quarto dia) e na estacionária (sétimo dia).

3.1.4 Obtenção e cultivo da célula hospedeira

Os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos albinos (BALB/c), que foram eutanasiados em câmara de CO₂, utilizando 5 mL da solução de Hanks,

seringas e agulhas estéreis. O material aspirado foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm, em temperatura de 4°C e o sedimento ressuspendido em meio DMEM 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 com 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 realizada lavagem com solução salina de fosfato estéril (PBS) pH 7.2, para remoção das células que não aderiram e em seguida adicionado meio DMEM suplementado com 10% de SBF. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Os animais foram sacrificados de acordo com as normas do Comitê de Ética (processo submetido) e acondicionados em recipientes plásticos apropriados para despejo em contêineres de coleta seletiva para material biológico.

3.1.5 Tratamento dos macrófagos com (+)-filantidina

Os macrófagos foram tratados com o alcaloide em placas ou garrafas de cultura nas concentrações de 20, 25, 50, 100 e 200 µg/mL por 1 hora em estufa contendo 5% de CO₂ à 37°C, após realização da cultura primária descrita no item 3.1.4 Os procedimentos foram realizados após o término do tratamento.

3.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

3.2.1 Atividade antipromastigota

Para detecção da atividade antipromastigota com o alcaloide, foram utilizadas formas promastigotas do parasita no quarto dia de cultivo (fase exponencial). As leishmanias foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços na proporção de 10⁶ parasitas por mL e tratadas com (+)-filantidina nas concentrações de 10, 20, 50, 100 e 200 µg/mL. A cada 24 horas de tratamento com o alcaloide, foram retiradas alíquotas para contagem em câmara de Neubauer, até o quarto dia de tratamento. A contagem foi realizada em microscópio óptico Olympus BX41 para comparação do crescimento dos parasitas nas diferentes concentrações de tratamento. Todos os testes foram feitos em triplicata e em todos os experimentos o grupo controle não recebeu tratamento. Foi feito

um controle utilizando DMSO e como controle positivo foi utilizado Anfotericina B à 0,1µg/mL, droga utilizada no tratamento da leishmaniose.

3.3 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS FORMAS PROMASTIGOTAS TRATADAS COM (+)-FILANTIDINA

3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os parasitas foram cultivados de acordo com o item 3.2.1, fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, lavados e transferidos para lamínulas de vidro para adesão. As lamínulas foram tratadas com solução de 0,1% de poli-L-lisina. Em seguida foi feita pós-fixação em temperatura ambiente, com solução de tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio por 15 minutos, desidratação em uma série crescente de etanol (Merck) a 15, 20, 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 e as lamínulas fixadas em suporte apropriado (*stub*), metalizadas com uma película de platina de aproximadamente 2nm de espessura, usando o aparelho *Emitech K550-England*. As células foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 1450VP no Instituto Evandro Chagas. Como controles foram utilizados parasitas sem tratamento.

3.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* na fase exponencial foram cultivadas em garrafas de cultura na concentração de 10⁶ parasitas por mL, tratadas e cultivadas por 96 horas com (+)-filantidina nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Posteriormente os parasitas foram centrifugados e fixados em 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 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 concentrações de 2:1, 1:1 e 1:2 (acetona/epon) e epon puro por doze horas. Em seguida o material foi colocado em Epon puro + DMP30 por 6 horas e por fim em suporte para polimerização a 60° C por 48 horas. Os blocos polimerizados foram cortados em ultramicrotomo (Leica EM UC6) e os cortes obtidos foram contrastados durante 20 minutos com acetato de uranila 5% e em seguida, durante 5 minutos com citrato de chumbo e observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão LEO 906E na Universidade Federal do Pará.

3.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS MURINOS TRATADOS COM (+)-FILANTIDINA

3.4.1 Método *Thiazolyl blue* (MTT)

O MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (SIGMA) é um sal tetrazolium que é convertido em cristais azuis de formazan insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, após clivagem por desidrogenases mitocondriais. O produto obtido após clivagem é impermeável às membranas celulares e acumula-se em células viáveis (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006). Ao adicionar dimetilsulfóxido (DMSO), estes cristais formazan são solubilizados, sendo o produto final da reação lido por espectrofotometria. Para realização deste teste, os macrófagos peritoneais foram cultivados como descrito no item 3.1.4, em placas de 24 poços e submetidos ao tratamento com (+)-filantidina nas concentrações de 10, 20, 50, 100 e 200 µg/mL por 1 hora em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Após esse período, foi retirado o sobrenadante, os poços lavados com PBS para em seguida ser adicionado 0,5 mg/mL MTT diluído em PBS para incubação a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ por 3 horas. Após incubação com MTT, o sobrenadante foi retirado, os poços lavados com PBS e 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados em cada poço para solubilização dos cristais de formazan com incubação em placa agitadora por 10 minutos. Posteriormente, a solução final foi transferida para placas de 96 poços e lida em espectrofotômetro (BIO-RAD Model 450 Microplate Reader) com comprimento de onda de 570 nm. Para controle da reação, foram utilizadas células mortas com solução de formol 15%.

3.4.2 Detecção do potencial de membrana mitocondrial (JC-1)

O potencial de membrana mitocondrial, $\Delta\psi_m$, é um importante parâmetro da função mitocondrial usado como um indicador de viabilidade celular. O JC-1 é um marcador fluorescente que mensura o potencial da membrana mitocondrial das células. A perda de potencial de membrana mitocondrial é utilizada como indicador de apoptose. O JC-1 possui vantagens sobre outros corantes catiônicos, pois pode penetrar na mitocôndria conforme variações no potencial de membrana. JC-1 possui formas conhecidas como “J- agregados” que coram células não-apoptóticas com fluorescência vermelha intensa. Por outro lado, em células apoptóticas com baixo $\Delta\psi_m$, permanecem na forma monomérica, apresentando apenas fluorescência verde (PERELMAN et al., 2012). Macrófagos peritoneais foram cultivados em placas de cultura de 12 poços incubados por 24h. O tratamento foi feito por 1 hora nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de (+)-filantidina. Após o tratamento as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm, ressuspensas em PBS, pH 7.2, incubadas por 30 minutos com 10 mM de JC-1 a 37°C, centrifugadas e ressuspensas em PBS, para determinação da fluorescência das células por citometria de fluxo. Para esta análise foi utilizado citômetro de fluxo BD FACSCantoII TM com comprimento de onda de excitação de 488 nm, sendo que os monômeros de JC-1 emitem a 529 nm e os agregados a 590 nm. Os dados foram obtidos utilizando o software BD FACSDiva.

3.4.3 Detecção de apoptose em macrófagos tratados com (+)-filantidina e marcados com Iodeto de Propídio (IP) e Anexina V

Iodeto de Propídio (IP) é um marcador nuclear com fluorescência vermelha impermeável a membrana plasmática íntegra. Assim, células que apresentam marcação negativa para esse marcador estão viáveis, enquanto que as células mortas apresentam marcação positiva, por não apresentar a sua membrana íntegra, fazendo com que o IP tenha acesso ao DNA da célula. A Anexina V é um marcador de fluorescência verde que detecta apoptose inicial e se liga a fosfatidilserina (FS), uma proteína de membrana que é expressa na superfície de células apoptóticas. Esses marcadores permitem a distinção de células íntegras das células apoptóticas assim como o estágio de apoptose sofrido pela célula. Logo, células que apresentarem marcação negativa estarão viáveis,

enquanto que as células mortas que apresentam FS em sua superfície irão apresentar marcação positiva.

Macrófagos peritoneais foram cultivados como descrito no item 3.1.4, em placas de cultura de 12 poços e submetidos ao tratamento por 1 hora com (+)-filantidina, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Em seguida as células foram lavadas com PBS, raspadas e incubadas inicialmente com 10µL de Anexina V por 30 minutos e posteriormente com 3 µL de IP por 5 minutos. A leitura foi feita por citometria de fluxo (BD FACS Canto™ II). Os experimentos foram realizados em triplicata, células marcadas com IP e Anexina V foram consideradas mortas e os resultados expressos em porcentagens.

3.5 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM (+)-FILANTIDINA

3.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Macrófagos peritoneais tratados com (+)-filantidina nas concentrações de 50 e 100 µg/mL por 1 hora, foram cultivados em placas de 24 poços, incubados por 24 horas e processados em lamínulas de vidro. O processamento foi realizado de acordo com o item 3.1.4. Como controles foram utilizados macrófagos sem tratamento.

3.6 RESPOSTA MICROBICIDA DOS MACRÓFAGOS TRATADOS COM (+)-FILANTIDINA.

3.6.1 Detecção de Radicais Superóxidos em Macrófagos tratados com (+)-filantidina.

3.6.1.1 Método Nitroblue Tetrazolium (NBT)

Macrófagos foram cultivados em placas de cultura de 24 poços (5×10^5 células por poço) como descrito anteriormente. Os macrófagos foram lavados com PBS e incubados com meio contendo 0,5 mg/mL de Nitroblue Tetrazolium (NBT-Sigma), 20 µL de DMSO e com 50 e 100 µg/mL do alcaloide (+)-filantidina. Como controle positivo foi utilizado *Sacharomyces cerevisiae*. Após 1 hora, à 37°C em atmosfera de

5% de CO₂, os macrófagos foram lavados com PBS pH 7.2 e fixados com paraformaldeído 4% por 30 minutos, desidratadas em acetona e passadas em misturas crescentes de acetona-xilol, e duas passagens finais em xilol puro. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro com *Entellan*®, analisadas e contadas em microscópio óptico Axio Scope Zeiss. Foi realizada contagem, verificando o número de células marcadas positivamente com NBT, não levando em consideração as características morfológicas.

3.6.2 Detecção de Espécie Reativa de Oxigênio em Macrófagos tratados com (+)-filantidina.

3.6.2.1 Kit CellROX®

Macrófagos foram cultivados em placas de cultura de 24 poços e tratados com (+)-filantidina nas concentrações de 50 e 100 µg/mL por 1 hora. Após esse período, as células foram lavadas com PBS pH 7.2 e incubadas com o marcador fluorescente verde CellROX® (Molecular Probes Invitrogen) na concentração de 5 µM, diluído em meio de cultura DMEM, conforme descrito por Hyo-Yang *et al.* (2012), com algumas modificações. Como controle positivo foram usadas células tratadas com M-CSF na concentração de 100 nM por 1 hora. Após 30 minutos em estufa contendo 5% de CO₂ à 37 °C, as células foram lavadas com PBS pH 7.2, em seguida os poços foram raspados, a solução contendo as células transferidas para tubos e lidas em citômetro de fluxo (BD FACS Canto™ II). Células não marcadas com CellROX® foram utilizadas como controle negativo.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados no programa Graph Pad Prism versão 5.0. Os testes utilizados foram análise de variância (ANOVA) e Test *t* Student, sendo considerado significativo $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

4.1.1 Atividade antipromastigota

A ação do alcaloide (+)-filantidina sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* foi observada durante quatro dias consecutivos (96 horas) de tratamento. Atividade antiproliferativa das formas promastigotas foi observada nos parasitas tratados com 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, com redução de 73,75%, 82,50%, e 88,75% respectivamente quando comparadas com o controle sem tratamento. No período de 96 horas foi observado IC_{50} de 56,34 $\mu\text{g/mL}$. Anfotericina B foi utilizada como controle positivo, tendo redução de 100% nas culturas tratadas com 0,1 $\mu\text{g/mL}$ por 96 horas (Figura 8).

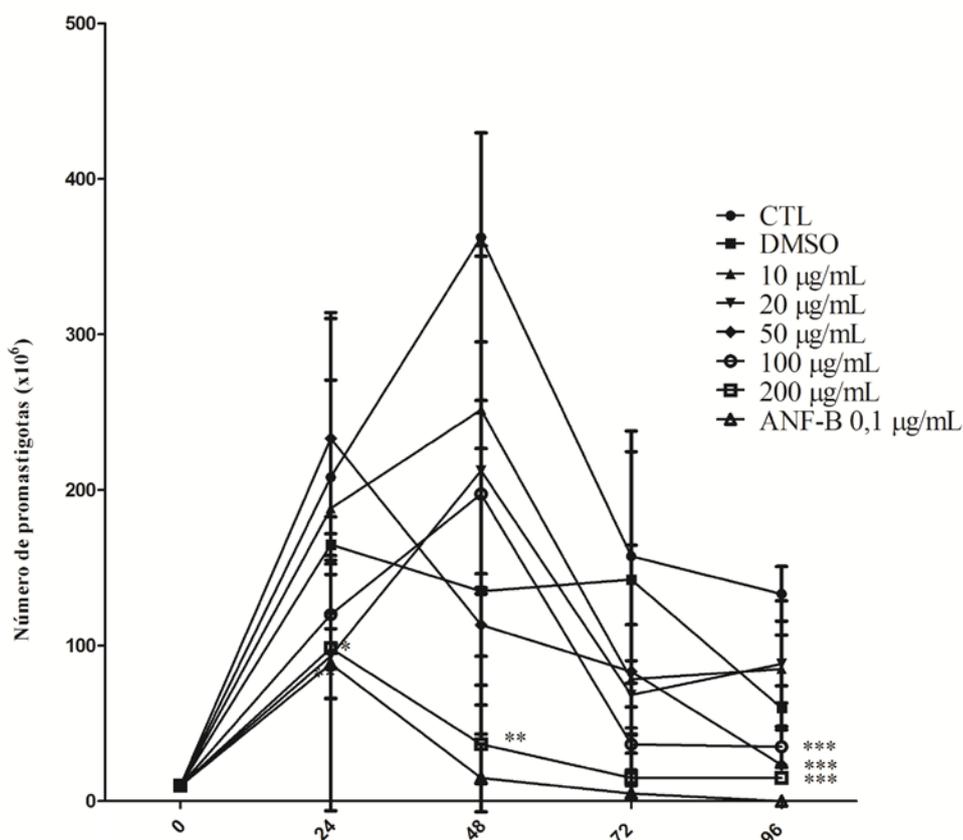


Figura 8: Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com diferentes concentrações de (+)-filantidina durante 96 horas. A diferença entre as células tratadas e o grupo controle (CTL) sem tratamento é representada por: **p < 0.05, ***p < 0.001.

4.2 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS FORMAS PROMASTIGOTAS

4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Através da análise por MEV foi possível observar alterações no flagelo e corpo celular das formas promastigotas tratadas com o alcaloide (+)-filantidina durante 96 horas. Nas promastigotas tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$, foi possível observar encurtamento do flagelo assim como septação e encurtamento do corpo celular (Figura 9 C-D). No tratamento com 100 $\mu\text{g/mL}$ foi observada a indução da formação de um aglomerado de células denominado rosetas, corpo celular com morfologia atípica, flagelo curto e presença de debris celulares (Figura 9 E-F), enquanto que no grupo controle que não recebeu tratamento, as formas promastigotas apresentaram morfologia típica, sem alterações morfológicas (Figura 9 A-B).

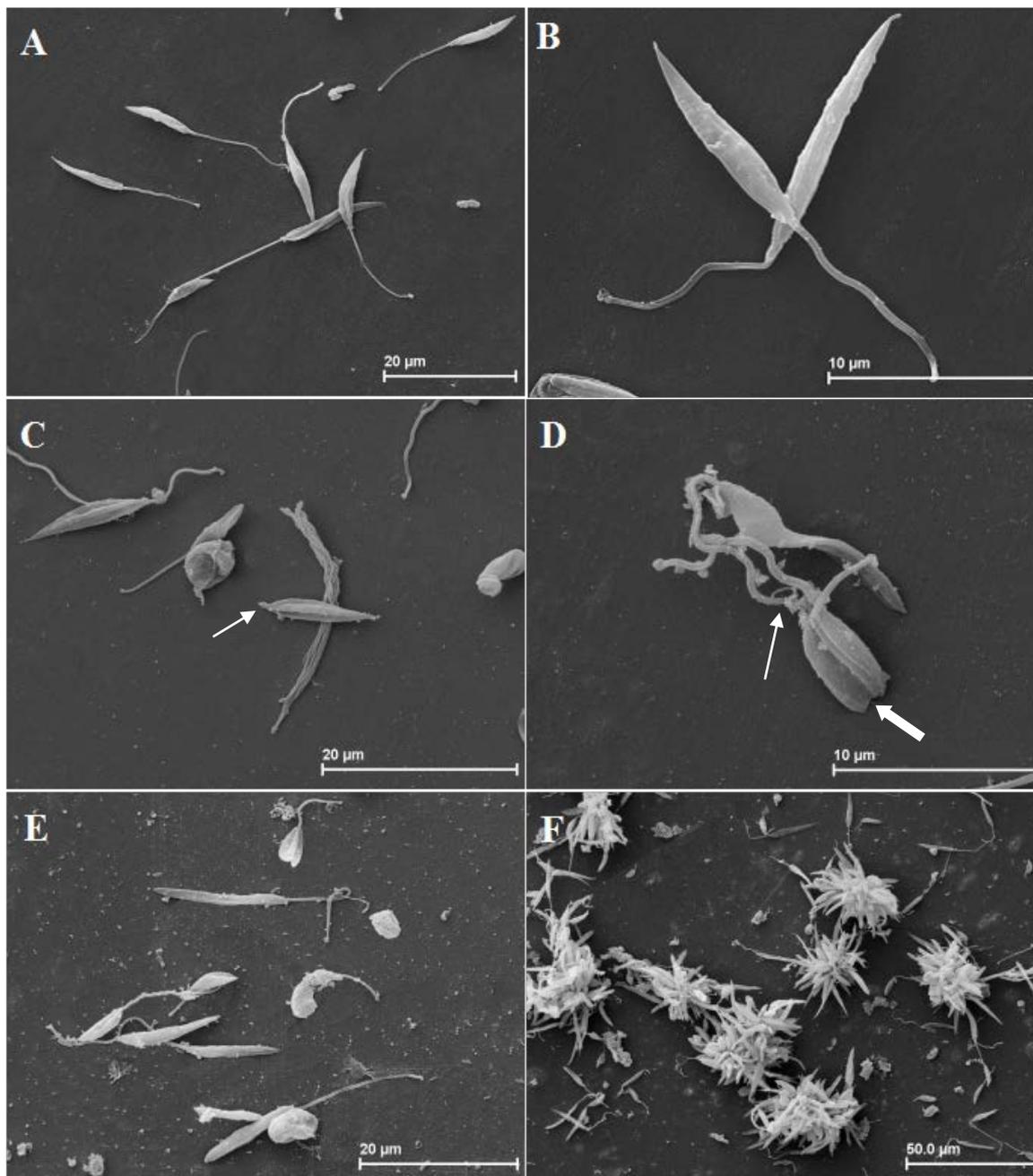


Figura 9: Alterações morfológicas em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com o alcaloide (+)-filantidina e observadas por MEV. (A e B) Promastigotas sem tratamento. (C e D) Promastigotas tratadas com 50 µg/mL do alcaloide. Observar septação (seta maior) e encurtamento do corpo celular (seta menor). (E e F) Promastigotas tratadas com 100 µg/mL do alcaloide. Observar debris celulares e formação de rosetas. Barras: (A, C e E) 20 µm, (B e D) 10 µm e (F) 50 µm.

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Análise por MET permitiu analisar com maiores detalhes as alterações causadas pelo alcaloide (+)- filantidina nas formas promastigotas. O tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$ do alcaloide promoveu tumefação do cinetoplasto (Figura 10 C), enquanto que, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foi possível observar alteração na mitocôndria e aumento de estruturas semelhantes a acidocalcissomos (Figura 10 D e E). Ainda foi possível observar nas promastigotas tratadas nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ a presença de estruturas eletrodensas sugestivas de corpúsculos lipídicos e uma maior condensação da eucromatina nuclear, quando comparado ao controle sem tratamento.

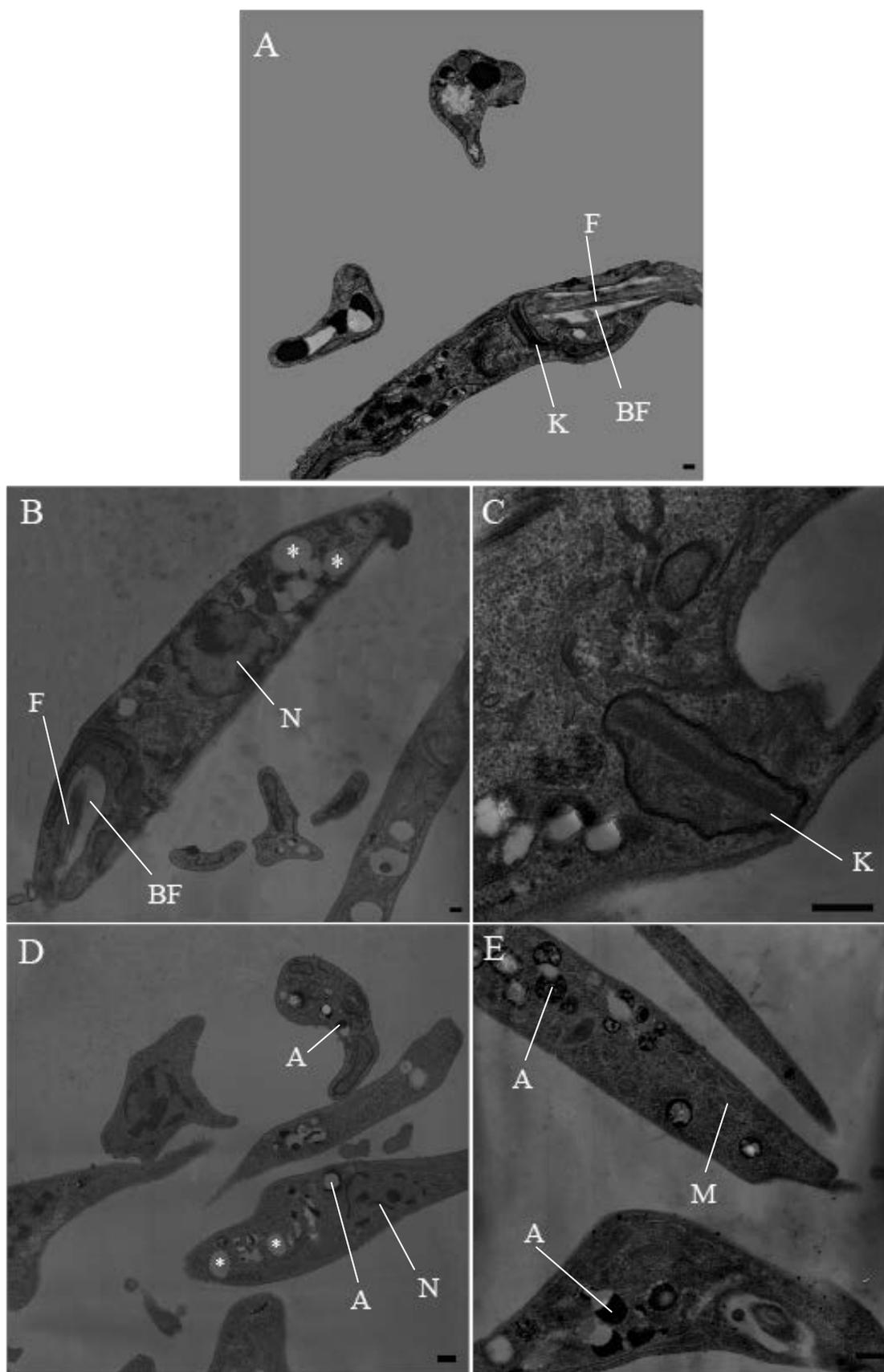


Figura 10: Alterações ultraestruturais de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com o alcaloide (+)-filantidina. (A) Grupo controle: Promastigotas sem tratamento. (B) Promastigotas tratadas com 50 µg/mL do alcaloide. (C) Promastigotas tratadas com 100 µg/mL do extrato. A- acidocalcisomo; N – núcleo; BF – bolsa flagelar; K – cinetoplasto; F – flagelo; M – Mitocôndria (*) corpúsculos lipídicos. Barras: 1µm

4.3 VIABILIDADE CELULAR DA CÉLULA HOSPEDEIRA

Para verificar se a (+)-filantidina tem algum efeito citotóxico para os macrófagos, foram realizados os testes MTT, JC-1 e Anexina V e Iodeto de Propídio.

4.3.1 Método Thiazolyl blue (MTT)

O MTT é um método utilizado para detectar a viabilidade das células tratadas, analisando a atividade das desidrogenases mitocondriais. No presente trabalho não foi observada diminuição significativa da viabilidade celular dos macrófagos (Figura 11) após tratamento com diferentes concentrações do alcaloide (+)-filantidina por 1 hora quando comparados ao controle sem tratamento. Como controle negativo, foram utilizadas células incubadas com solução de formol 15%.

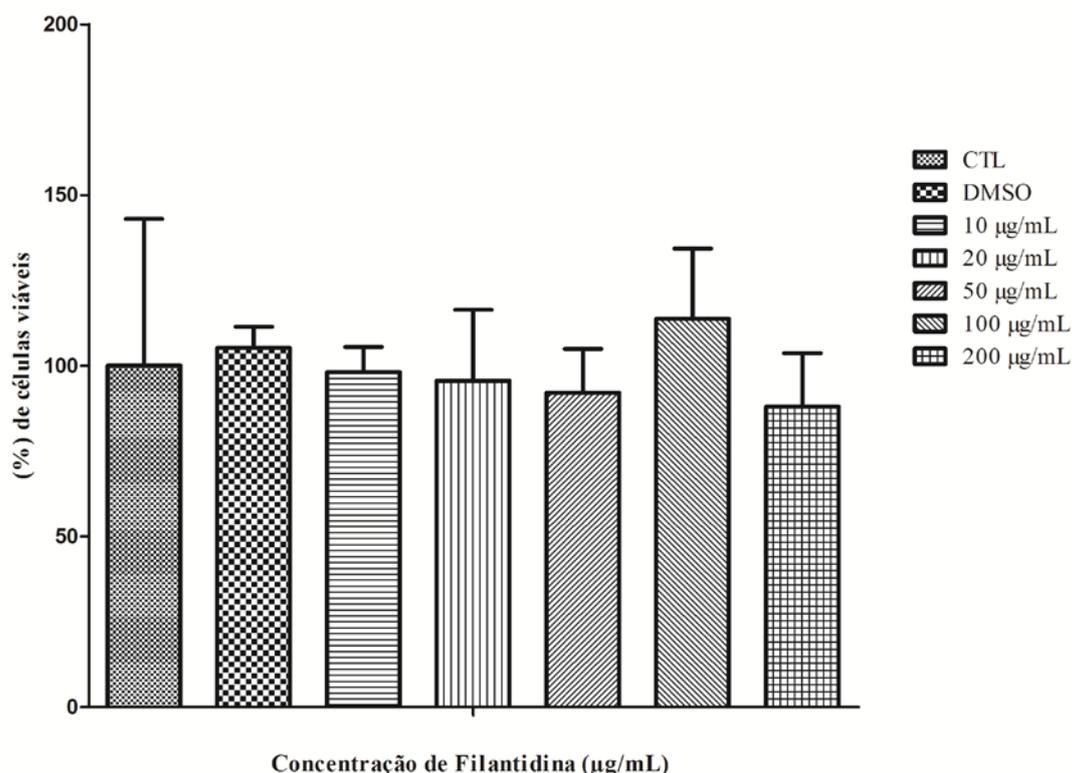


Figura 11: Viabilidade celular através do método MTT em macrófagos peritoneais cultivados por 24 horas e tratados com diferentes concentrações de (+)-filantidina por 1 hora.

4.3.2 Potencial de Membrana Mitocondrial (JC-1)

Para detectar o Potencial de Membrana Mitocondrial foi utilizado o método JC-1. Na figura 12 estão sendo mostrados histogramas representativos de citometria de fluxo, onde foi observado que 52,82% e 52,87% dos macrófagos tratados com 50 $\mu\text{g/mL}$ (figura 12B) e 100 $\mu\text{g/mL}$ (figura 12C) de (+)-filantidina, enquanto que o grupo controle apresentou 57,79% (Figura 12A) de células viáveis. Estes resultados indicam que a (+)- filantidina não possui efeito citotóxico para os macrófagos.

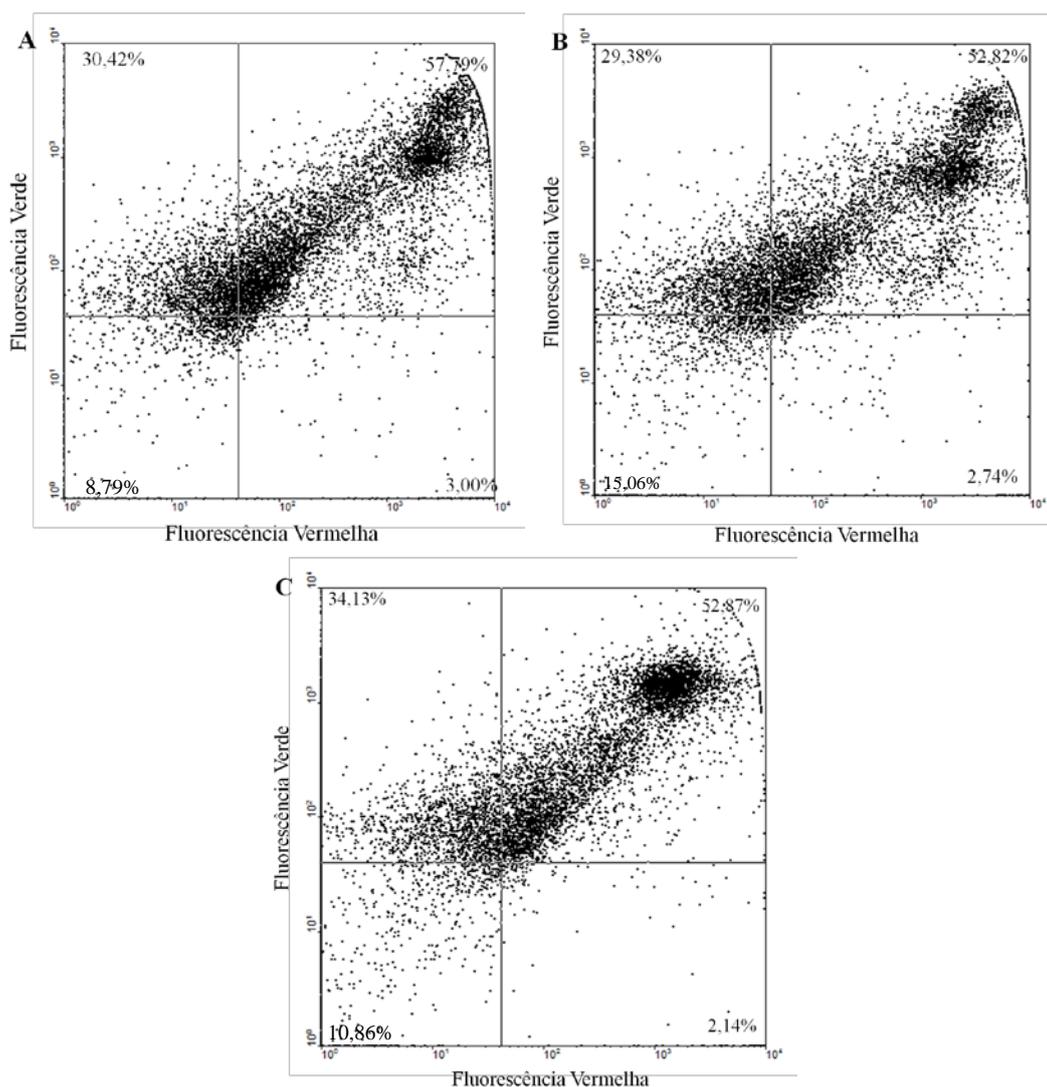


Figura 12: Análise da viabilidade celular de macrófagos tratados com (+)-filantidina por 1 hora pelo método JC-1 através de citometria de fluxo. (A) Macrófagos sem tratamento, (B) Macrófagos tratados com 50 $\mu\text{g/mL}$ de (+)-filantidina, (C) Macrófagos tratados com 100 $\mu\text{g/mL}$ de (+)-filantidina.

4.3.3 Anexina V e Iodeto de Propídeo

Para analisar morte celular e necrose nas células tratadas com o alcaloide, foram utilizados como marcadores Anexina e IP. No presente experimento foi observado que as células cultivadas com o alcaloide permaneceram viáveis. Tal resultado pode ser demonstrado quando comparamos as células tratadas com 50 $\mu\text{g/ml}$ (71,44%) e 100 $\mu\text{g/ml}$ (72,91%) do alcaloide (figura 13B-C) ao grupo controle que não recebeu tratamento (76%) (figura 13A), mostrando que essas células não foram marcadas com PI nem com Anexina V.

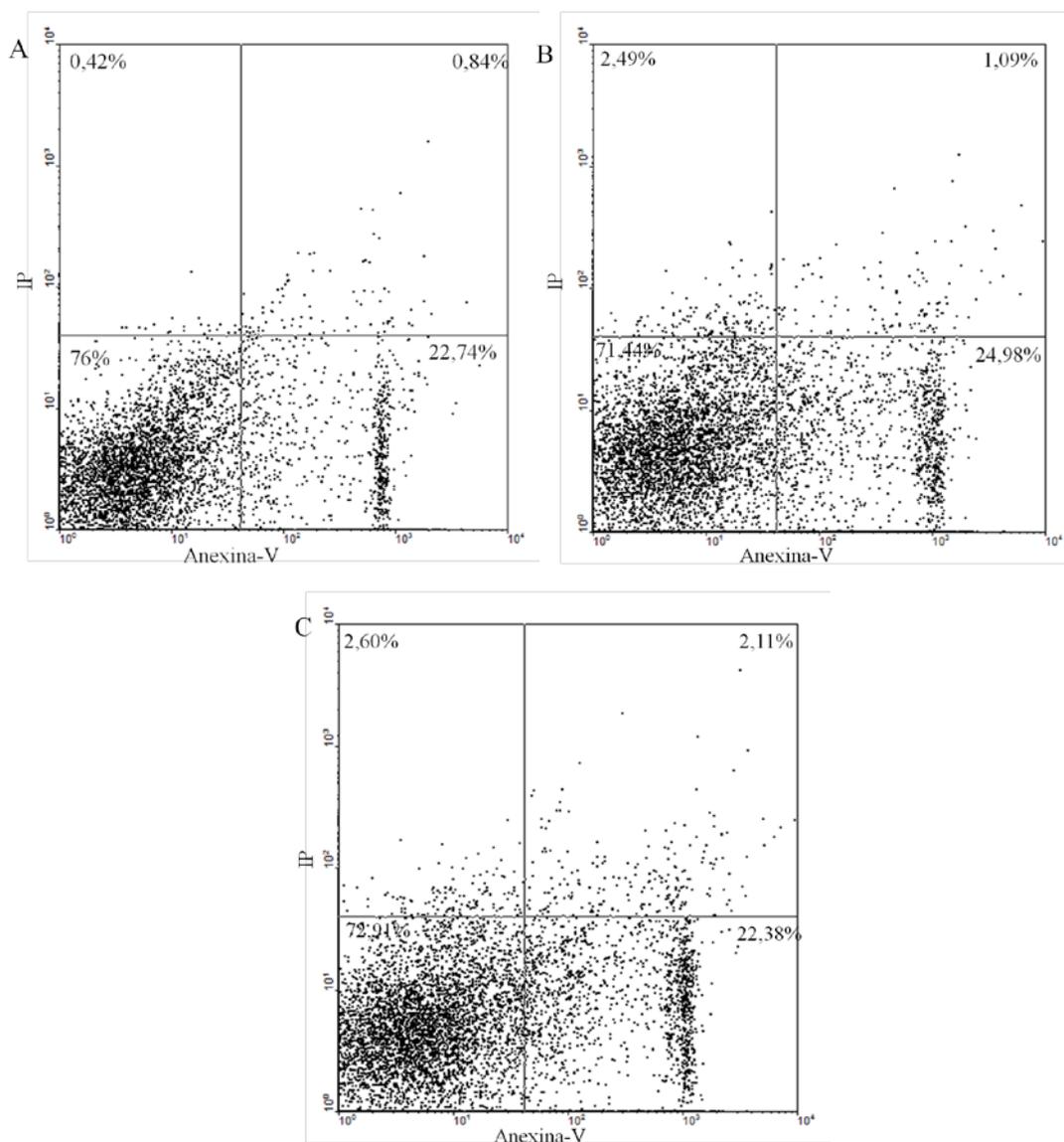


Figura 13: Teste de apoptose feito por citometria de fluxo utilizando Iodeto de Propídeo e Anexina-V como marcadores em macrófagos tratados com (+)-filantidina. (A) Macrófagos controle (sem tratamento); (B) Células tratadas com 50 $\mu\text{g/ml}$ do alcaloide; (C) Macrófagos tratados com 100 $\mu\text{g/ml}$.

4.4 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA CÉLULA HOSPEDEIRA

4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Análise dos macrófagos tratados com o alcaloide por MEV permitiu evidenciar alterações morfológicas sofridas por estas células. Nas células tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14 C-D) e 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14 E-F) do alcaloide foi observada alteração no tamanho e formato das células devido ao aumento do espraiamento celular, aumento no número de projeções citoplasmáticas (filopódios) e a formação de lamelipódios quando comparadas ao grupo controle sem tratamento (Figura 14 A-B), mostrando que essas características são típicas de células ativadas.

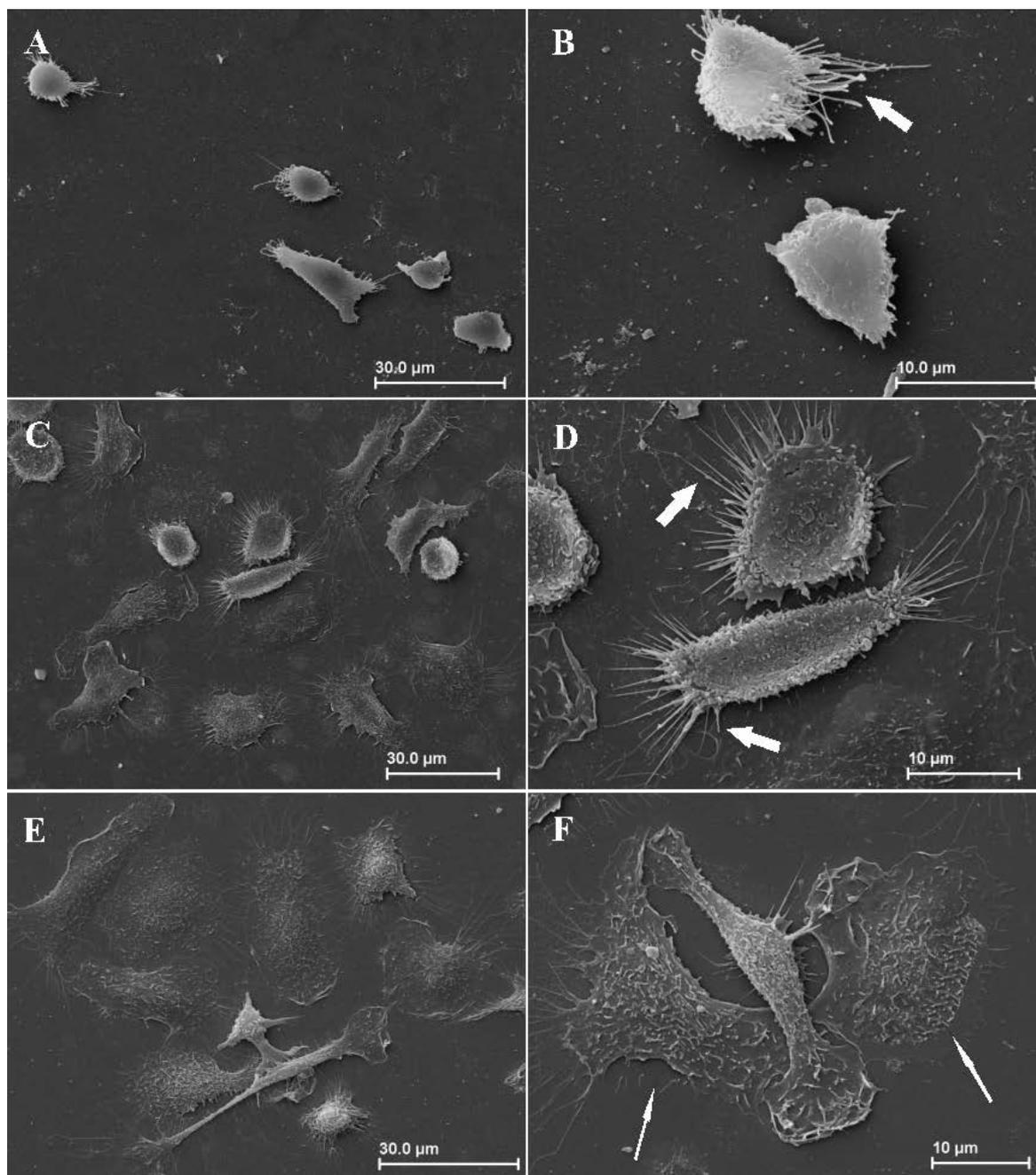


Figura 14: Microscopia eletrônica de Varredura de macrófagos tratados com (+)-filantidina. (A e B) Macrófagos sem tratamento. Observar formato arredondado das células e poucas projeções citoplasmáticas. (C e D) Células tratadas com 50 µg/mL. Observar presença de inúmeros filopódios (seta grossa). (E e F) Macrófagos tratados com 100 µg/mL. Observar células com alteração no tamanho e forma e maior espreadimento celular mostrando a presença de lamelipódios (setas finas) quando comparadas às células não tratadas. Barras: (A, C e E) 30 µm; (B, D e F) 10 µm.

4.5 RESPOSTA MICROBICIDA DOS MACRÓFAGOS TRATADOS

4.5.1 Detecção de Radicais Superóxidos

4.5.1.1 Método Nitroblue Tetrazolium (NBT)

A produção de radicais superóxidos em macrófagos tratados com o alcaloide (+)-filantidina foi detectada a partir da citoquímica NBT. Foi possível observar que as células tratadas com 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ do alcaloide (Figura 15 C e D) apresentaram um aumento da produção de radicais superóxidos quando comparadas as células do grupo controle sem tratamento (Figura 15A). Como controle positivo foi feita interação dos macrófagos com *Sacharomyces cerevisiae* (Figura 15B), demonstrando a especificidade do teste.

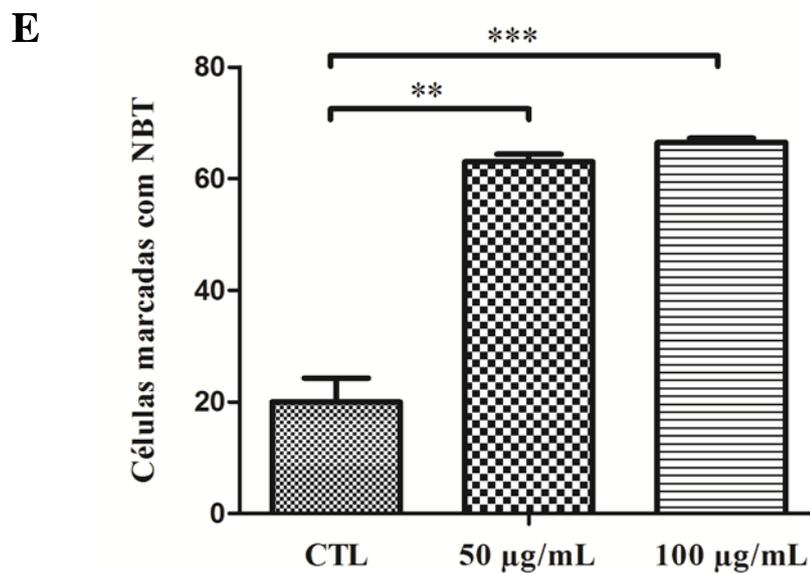
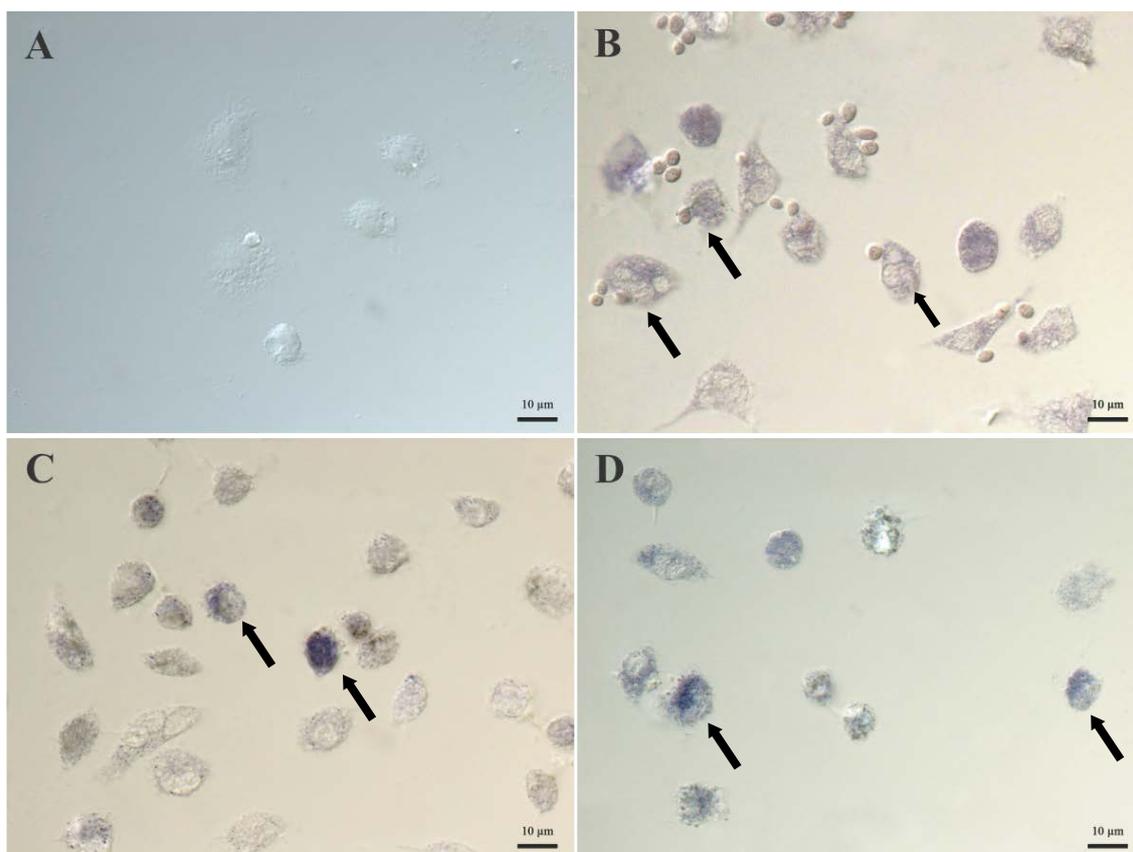


Figura 15: Detecção da produção de radicais superóxidos através da citoquímica NBT em macrófagos tratados por 1 hora com o alcaloide (+)-filantidina. (A) Controle negativo sem tratamento. Observar ausência de reação. (B) Controle positivo, macrófagos infectados com *Sacharomyces cerevisiae*. Observar reação no local da interação (setas). (C) Macrófagos tratados com 50 µg/mL. (D) Macrófagos tratados com 100 µg/mL. Observar reação nos macrófagos tratados (setas). (E) Porcentagem de macrófagos marcados com NBT. Barras: 10 µm.

4.5.2 Detecção de Espécie Reativa de Oxigênio

4.5.2.1 Kit CellROX[®]

Para avaliar a produção de ERO nos macrófagos tratados com o alcaloide, foi feita a marcação com CellRox[®] Green. Após análise foi possível observar que não houve um aumento na produção de ERO em macrófagos tratados por 1 hora com 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ do alcaloide, quando comparado aos macrófagos do grupo controle sem tratamento (Figura 16). Como controle positivo os macrófagos foram estimulados com M-CSF.

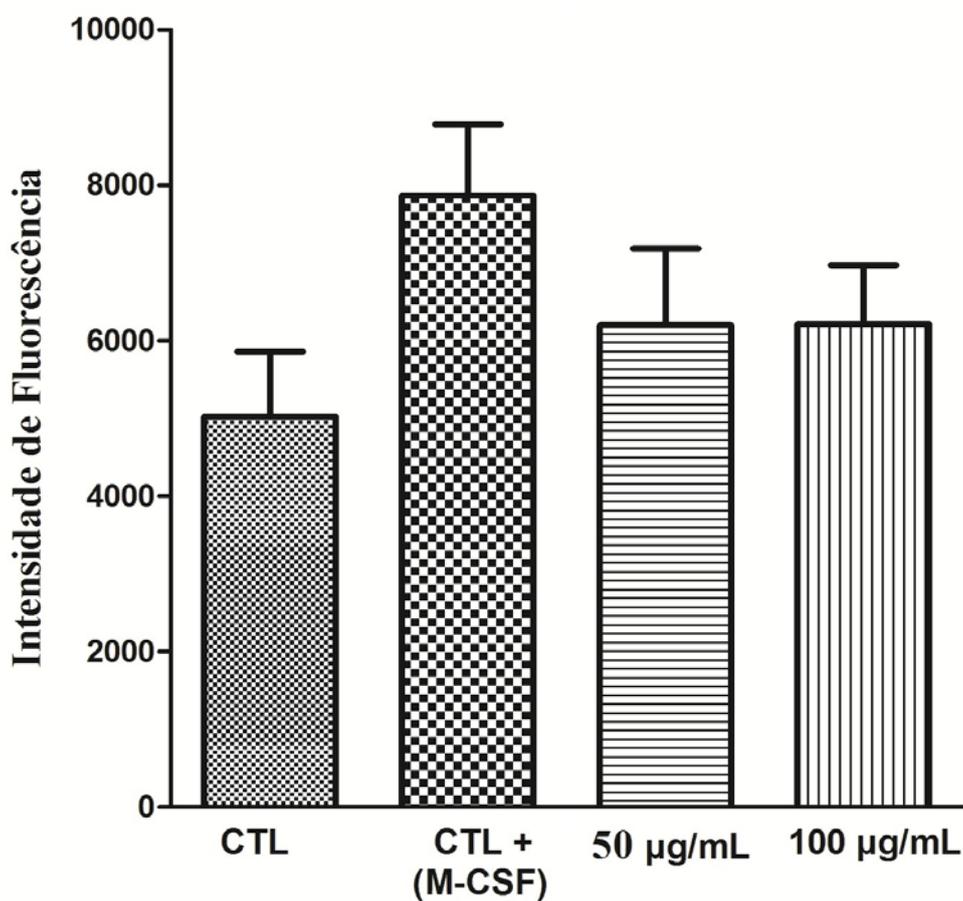


Figura 16: Detecção da produção de Espécies Reativas de Oxigênio em macrófagos tratados com (+)-filantidina através do marcador fluorescente CellRox[®]. Foi utilizado teste ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey com $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

O uso dos antimoniais pentavalentes é recomendado como droga de primeira escolha pela OMS para o tratamento das leishmanioses (FRÉZARD et al., 2009). Essas substâncias são eficazes e apresentam uma elevada taxa de cura, entretanto, apresentam elevada toxicidade, são caras e necessitam de um longo período de uso. Devido a essa problemática, vários estudos vem demonstrando que substâncias de origem natural possuem grande potencial para o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas, pois apresentam baixo custo, baixa toxicidade e fácil obtenção (GUIMARÃES et al., 2010; RODRIGUES et al., 2014).

O estudo de produtos naturais extraídos de plantas apresenta-se como uma fonte promissora de pesquisa na terapêutica contra o parasita *Leishmania*. Dentre estes compostos destacam-se os alcaloides, que apresentam diversas funções biológicas *in vitro*, sendo eficazes contra formas promastigotas e amastigotas (DELORENZI et al. 2001., DI GIORGIO et al., 2005). No entanto, não há estudos na literatura que demonstrem a ação do alcaloide (+)-filantidina sobre o parasita *Leishmania (L.) amazonensis* e a célula hospedeira.

Este estudo avaliou ação do alcaloide (+)-filantidina sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis in vitro*. Após análise dos resultados obtidos, foi possível observar redução no crescimento de promastigotas do protozoário *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas nas concentrações de 50 e 100 µg/mL do alcaloide por 96 horas, sendo esta de 73,75% e 82,50%, respectivamente, apresentando um IC₅₀ de 56,34 µg/mL.

Resultados semelhantes foram obtidos por Delorenzi et al. (2001), ao utilizar o alcaloide extraído do extrato bruto da planta *Peschiera australis*, que promoveu inibição de 90% do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* após 72 horas de tratamento. Outro estudo que corrobora aos achados no presente trabalho foi demonstrado com o alcaloide julocrotina extraído da planta *Croton pullei* var. *glabrior*, que apresentou atividade leishmanicida, promovendo redução *in vitro* de 54% das formas promastigotas do protozoário *Leishmania (L.) amazonensis* (GUIMARÃES et al., 2010).

Alguns trabalhos descrevem que compostos de origem natural são capazes de promover alterações morfológicas no parasita (RODRIGUES et al, 2014, SILVA,

2013). O presente estudo demonstrou alterações ultraestruturais sobre formas promastigotas do protozoário após tratamento com o alcaloide (+)-filantidina.

Análise ultraestrutural das formas promastigotas tratadas com o alcaloide por MEV demonstrou encurtamento do flagelo, presença de *debri* celular e indução da formação de rosetas. Alterações semelhantes foram observadas por Silva (2013) ao utilizar o extrato extraído da planta *Physalis angulata* em formas promastigotas do protozoário *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com as mesmas concentrações.

A análise das formas promastigotas por MET demonstrou que o alcaloide apresentou ação sobre o cinetoplasto, promovendo desestruturação da membrana e induzindo tumefação. Alguns autores já demonstraram modificações no cinetoplasto usando produtos naturais, como o alcaloide julocrotina extraído da planta *Croton pullei* var. *glabrior* (GUIMARÃES et al., 2010) e o óleo da planta *Ocimum gratissimum* (UEDA-NAKAMURA et al., 2006). Essa organela está presente apenas em tripanossomatídeos, sendo um importante alvo para o estudo da ação de drogas em decorrência de sua estrutura única e função (ADADE & SOUTO-PADRÓN, 2010; SEN & CHATTERJEE, 2011). Estas modificações demonstram que os alcaloides podem possuir uma ação seletiva sobre a organela.

Foi possível observar também um aumento na quantidade de vesículas eletrodensas, sugestivas de corpúsculos lipídicos, no citoplasma do protozoário, bem como aumento no número de estruturas semelhantes a acidocalcissomos, condensação da cromatina nuclear e dano mitocondrial. Essas modificações podem estar relacionadas com o mecanismo de apoptose, que é caracterizado pela condensação do material nuclear e fragmentação do DNA nuclear (FONSECA-SILVA et al., 2011; GARCIA et al., 2013). Alterações mitocondriais foram descritas por Delorenzi et al. (2001) ao tratar formas promastigotas com o alcaloide extraído de *Peschiera australis*. Com isso, é possível sugerir que o alcaloide (+)-filantidina ativa este importante mecanismo de morte celular, porém estudos mais detalhados são necessários para comprovar se a (+)-filantidina atua nessa ativação.

Para demonstrar a ação seletiva do alcaloide sobre o protozoário, foram realizados testes de citotoxicidade com a célula hospedeira após tratamento utilizando testes específicos.

Os testes utilizados foram o MTT, que avalia a atividade das desidrogenases mitocondriais, o JC-1 que mensura o potencial de membrana mitocondrial das células viáveis e Anexina V e Iodeto de Propídeo que detectam apoptose inicial/tardia e a

integridade da membrana plasmática. Após análise, foi possível demonstrar que nos três ensaios de citotoxicidade não foram detectadas alterações significativas na viabilidade dos macrófagos, demonstrando que o efeito alcaloide foi apenas sobre o protozoário.

Os macrófagos são células com funções especializadas na resposta imune envolvidos no controle, bem como na persistência da infecção por protozoários do gênero *Leishmania*. Estudos demonstram a ação ativadora de bioprodutos sobre a célula hospedeira (LOPES et al., 2006; RODRIGUES et al., 2011). Depois de ativados, sua morfologia é alterada apresentando projeções citoplasmáticas, maior adesão, espraiamento celular, produção de citocinas e ativação da resposta microbicida produzindo ERO e NO (GORDON & MARTINEZ, 2010).

Análise por MEV demonstrou a presença de filopódios, lamelipódios, aumento no espraiamento e volume celular, mostrando que o alcaloide (+)-filantidina foi capaz de ativar a célula hospedeira.

Para analisar a resposta microbicida dos macrófagos tratados com o alcaloide foram feitos testes para detecção de radicais superóxidos e ERO. Essas espécies são importantes, pois estão envolvidas em muitos processos biológicos e patológicos.

No presente trabalho foi possível demonstrar que o uso do alcaloide (+)-filantidina promoveu ativação dos macrófagos através da produção de radicais superóxidos. Na literatura não existem estudos demonstrando a indução da produção de radicais superóxidos por alcaloides. Além disso, o alcaloide (+)-filantidina não induziu a produção de ERO e NO (dados não mostrados).

Com os resultados obtidos é possível sugerir que o alcaloide (+)-filantidina é uma provável substância com ação leishmanicida e promissora fonte para o desenvolvimento de um novo agente leishmanicida. Este estudo é parte da busca de novos medicamentos que possam atuar de maneira eficaz contra protozoários do gênero *Leishmania* sem alterar as funções da célula hospedeira.

6 CONCLUSÕES

- O alcaloide (+)-filantidina demonstrou ação leishmanicida sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.
- O alcaloide (+)-filantidina promoveu alterações ultraestruturais nas formas promastigotas, promovendo alterações no cinetoplasto, mitocôndria e aumento no número de estruturas semelhantes a acidocalcissomos.
- O alcaloide (+)-filantidina parece estar promovendo morte celular por apoptose das promastigotas tratadas.
- O alcaloide (+)-filantidina não promoveu redução da viabilidade celular dos macrófagos tratados.
- O alcaloide (+)-filantidina foi capaz promover ativação de macrófagos peritoneais murinos, visto que houve aumento do espraiamento celular e alterações estruturais.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; E PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7^a Ed. Elsevier. Rio de Janeiro, 564 p, 2011.

ADADE C. M.; SOUTO-PADRON T. Contributions of Ultrastructural Studies to the Cell Biology of Trypanosmatids: Targets for Anti-Parasitic Drugs. **The Open Parasitology Journal**. V. 4, p. 178-187, 2010.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS One**, V. 7, p. e35671, 2012.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**. V.35, p. 699–705, 2010.

APGIII (The Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APGIII. **Botanical Journal of the Linnean Society**. V. 161, n.2, p. 105-121, 2009.

ALAVI-NAINI, R., FAZAELI, A., O'DEMPSEY, T. Tropical treatment modalities for old world cutaneous leishmaniasis: a review. **Prague. Medical Report**. V. 113, n. 2, p. 105-118, 2012.

ASILIAN, A. *et al.* Treatment of cutaneous leishmaniasis with aminosidine (paromomycin) ointment: double-blind, randomized trial in the Islamic Republic of Iran. **Bulletin of the World Health Organization**. V. 81, n.5, p. 353-359, 2003.

BAILEY, M.S.; LOCKWOOD, D.N.J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**. V. 25, p. 203–221, 2007.

BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 111, p. 396-402, 2007.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Editora MS, 2^a Ed.atualizada, 2010. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf. Último acesso em: 20/02/2014.

BRASIL. MINISTERIO DA SAUDE, DEPARTAMENTO DE VIGILANCIA DA SAUDE.Sistema de Informacao de Agravos de Notificacao. **Serviço de Vigilância em Saúde**. Disponível em:http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf. Último acesso em: 20/03/2014.

BRENZAN, M.A. et al. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**. V. 101, n. 3, p. 715-722, 2007.

CARSON, C. A.; KERR, M. A. Total synthesis of (+)-phyllantidine. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**. V. 45, n. 39, p. 6560-6563, 2006.

CAVALCANTI, D. P.; THIRY, M.; DE SOUZA, W.; MOTTA, M. C. M. The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching, cytochemical and immunocytochemical analysis. **Histochemistry and Cell Biology**. V. 130, n. 6, p. 1177-1185, 2008.

CHANG, K.P.; MCGWIRE, B.S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. **Kinetoplastid Biology and Disease**. V. 20, n. 1, 2002.

CHANG, Z.Q.; LEE, J.S.; GEBRU, E.; HONG, J.H.; JUNG, H.K.; JO, W.S.; PARK, S.C. Mechanism of macrophage activation induced by beta-glucan produced from *Paenibacillus polymyxa* JB115. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. V. 391, n. 3, p. 1358-62, 2010.

COSTA FILHO, A.V.; LUCAS, I.C.; SAMPAIO, R.N. Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, V. 41, n. 4, p. 424-427, 2008.

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

CROFT, S.L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitology**. V. 11, p. 502-508, 2003.

CROFT, S.L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**. V. 17, n. 10, p. 1478-83, 2011.

DAVID, C.V. & CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**. V. 22, n.6, p. 491-502, 2009.

DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitology Research**. V. 88, p. 1013-1025, 2002.

DE SOUZA, W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. V. 14, n. 9, p. 822-838, 2008.

DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C. & CUNHA-E-SILVA, N. L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**. V. 44, p. 67-124, 2009.

DELORENZI, J.C. et al. Antileishmanial activity of na índole alkaloid from *Peschiera australis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 45, n. 5, p. 1349-1354, 2001.

DI GIORGIO, C. et al. In vitro antileishmanial activity of diphyllin isolated from *Haplophyllum bucharicum*. **Plant Medical**. V. 71, p. 366-369, 2005.

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um Guia de Estudos Multidisciplinar**. São Paulo: Ed. Universidade Paulista. 215p, 1996.

DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P. & MORENO, S. N. J. Acidocalcisomes: conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**. V. 3, p. 251-261, 2005.

DORLO, T. P. C. et al. Optimal Dosing of Miltefosine in Children and Adults with Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, V. 56, n.7, p. 3864–3872, 2012.

EL-SAYED, M.; ANWAR, A.E. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. **Journal of the European Academy Dermatology and Venereology**. V. 24, n. 3, p. 335-340, 2010.

FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS One**. V. 8;6(2), e14666, 2011.

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. **Toxicology Letters**. V. 160, p.171-77, 2006.

FRÉZARD, F., DEMICHEL, C., RIBEIRO, R, R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. **Molecules**. V. 14, p. 2317-2336, 2009.

GARCIA, F.P. et al. Eupomatenoid-5 isolated from leaves of *Piper regnellii* induces Apoptosis in *Leishmania amazonensis*. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**. V. 2013, p. 940531, 2013.

GOMES, L. I.; GONZAGA, F. M.; DE MORAIS-TEIXEIRA, E.; DE SOUZA-LIMA, B.S.; FREIRE, V. V.; RABELLO, A. Validation of quantitative real-time pcr for the *in vitro* assessment of antileishmanial drug activity. **Experimental Parasitology** V. 131, p. 175–179, 2012.

GOMES-SILVA, A.; BITTAR, R. C.; NOGUEIRA, R. S.; AMATO, V. S.; MATTOS, M. S.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; COUTINHO, S. G.; CRUZ, A. M. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology**. V. 149, p. 440–444, 2007.

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

GORDON, S.; MARTINEZ, F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**. V. 28, n.32(5), p. 593-604, 2010.

GOTO, H. & LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, V. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GRUENHEID, S. & FINLAY, B. Microbial pathogenesis an cytoeskeletal function. **Nature**. V. 422, n. 6933, p. 775-781, 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. **Cellular Microbiology**. V. 10, n. 1, p. 100-111, 2008.

GUIMARÃES, RODRIGUES. L. et al. Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania (L.) amazonensis*. **Parasitology Research**. V. 107, n.5, p.1075-1081, 2010.

HENRIQUES, C.; ATELLA, G. C.; BONILHA, V. L.; DE SOUZA, W. Biochemical analysis of proteins and lipids found in parasitaphorous vacuoles containing *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**. V. 89, n. 2, p. 123-133, 2003.

HORII, Z., IMANISHI, T., YAMAUCHI, M., HANAOKA, M., PARELLO, J., MUNAVALLI, S. Structure of phyllantidine. **Tetrahedron Letters**. V. 13, p.1877–1880, 1972.

HORTA, M.F. et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, V. 2012, p. 2038-18, 2012.

HORTELANO, S.; TRAVES, 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. **Journal of Immunology**. V. 171, p. 6059-64, 2003.

HYO-YANG, A., KATHRYN, E., SMITH, F. Two-photon fluorescence microscopy imaging of cellular oxidative stress using profluorescent nitroxides. **Journal of the American Chemical Society**. V.134, n. 10, p. 4721-4730, 2012.

JAYANARAYAN, K.G.; DEY, C.S. Microtubules: dynamics, drug interaction and drug resistance in *Leishmania*. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**. V. 27, n. 5, p. 313-320, 2002.

KAYSER, O., KIDERLEN, A.F., BERTELS, S., SIEMS, K. Antileishmanial Activities of Aphidicolin and Its Semisynthetic Derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 45, n. 1, p. 288-92, 2001.

KHAZEN, W.; M'BIKA, J.P.; TOMKIEWICZ, C.; BENELLI, C.; CHANY, C.; ACHOUR, A.; FOREST, C. Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipo-cytes. **FEBS letters**. V. 579, n. 25, p. 5631-5634, 2005.

KIM, D.H. et al. Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? A meta-analysis of 14 randomized controlled trials. **PLoS Neglected Tropical Disease**. V. 3 n. 2, 2009.

KLING, C.J., KÖRNER, H. Different regulatory mechanisms in protozoan parasitic infections. **International Journal for Parasitology**. V. 43, n. 6, p. 417-425, 2013.

LAINSON, R. & SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Biology and Epidemiology*. W. Peters & R. Killick-Kendrick (eds.). London, **Academic Press**. V. 1, p. 1-120, 1987.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista pan-Amazônica de Saúde**. V. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAURELLA, L.C. et al. *In vitro* evaluation of antiprotozoal and antiviral activities of extracts from Argentinean *Mikania* species. **Scientific World Journal**, v. 2012, p. 121253, 2012.

LÁZARO-DIÉGUEZ, F.; AGUADO, C.; MATO, E.; SÁNCHEZ-RUIZ, Y.; ESTEBAN, I.; ALBERCH, J.; KNECHT, E. & EGEA, G. Dynamics of an F-actin aggresome generated by the actin-stabilizing toxin jasplakinolide. **Journal of Cell Science**. V. 121, p. 1415-1425, 2008.

LIU, D.; UZONNA, J.E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. V. 2, p. 83, 2012.

LO, A.; LIANG, Y.; LIN-SHIAU, S.; HO, C.; LIN, J. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor- κ B in mouse macrophages. **Carcinogenesis**, V. 23, n. 6, p. 983-91, 2002.

LOPES, L. et al. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron**. V. 37, p. 277-87, 2006.

MCGWIRE, B.S., SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Oxford Journal of Medicine**. V. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.

MISHRA, B.B., KALE, R.R., SINGH, R.K., TIWARI, V.K. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**. V. 80, p. 81-90, 2009.

MOSSER, D. M. & EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**. V. 8, p. 958-969, 2008.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunology Reviews**. V. 240, n. 1, p. 286-96, 2011.

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

NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**. V.6, n. 9, p. 754-65, 2008.

NYLÉN, S. & EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, V. 34, n. 12, p. 551-561, 2012.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Vaccines and vaccination strategies against human cutaneous leishmaniasis. **Hum Vaccin**, V. 5, n. 5, p. 291-301, 2009.

OLIVEIRA, V.C. et al. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**. V. 104, n.5, p.1053-1059, 2009.

OLIVIER, M., GREGORY, D.J., AND FORGET, G. Subversion Mechanisms by Which Leishmania Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. **Clinical Microbiology**. V. 18, n. 2, p. 293-305, 2005.

OPPERDOES, F. R. & COOMBS, G. H. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. **Trends Parasitology**. V. 23, p. 149-158, 2007.

PARIS, C. et al. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 48, n. 3, p. 852-859, 2004.

PATEL, S. & SETHI, A. Imported tropical diseases. **Dermatologic Therapy**. V. 22, n. 6, p. 538-549, 2009.

PERELMAN, A. et al. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. **Cell Death and Disease**. V. 22, n. 3, p. 430, 2012.

PIRES, A. M. S.; COSTA, G. C.; GONÇALVES, E. G. R.; ALVIM, A. C.; NASCIMENTO, F. R. F. Aspectos imunológicos e clínicos da Leishmaniose tegumentar americana: uma revisão. **Revista Ciência e Saúde**. V. 14, n.1, p. 30-39, 2012.

PAVLI. A., MALTEZOU, H.C. Leishmaniasis an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 14, n. 12, p. 1032-1039, 2010.

POLONIO, T.; EFFERTH, T. Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). **International Journal of Molecular Medicine**. V. 22, n. 3, p. 277-86, 2008.

RAHMAN, M., et al. Phase IV trial of miltefosine in adults and children for treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Bangladesh. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 85, n.1, p. 66-9, 2011.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B. & BROOKER. S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Disease**. V. 7, p. 581–596, 2007.

ROBINSON, J.M.; SEGUCHI, H.; BADWEY, J.A. Active oxygen and nitrogen species in biology: from cytotoxic agents or signaling intermediates. **Histochemistry Cell Biology**. V.122, p. 173-275, 2004.

ROCHA, L.G.R.; ARAGÃO, C.F.S; LOIOLA, M.I.B.; BESERRIL, R.A.; PAIVA, N.R.F.; HOLANDA, C.M.C.X; BRITO, M.E.F. Evaluation of the leishmanicide action

of ethanol extracts of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.19, p. 51-56, 2009.

RHOADES, D. F. Evolution of Plant Chemical Defense against Herbivores". In ROSENTHAL, G. A., JANZEN, D. H. Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites. **New York: Academic Press**. p. 41. ISBN 0-12-597180-X, 1979.

RODRIGUES, A.P.D. Estudo dos efeitos do metabólito secundário isolado de fungos do gênero *Aspergillus* sobre o protozoário *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a célula hospedeira. **Trabalho de conclusão de curso (Faculdade de Biomedicina)** - Belém, Universidade Federal do Pará, 54p., 2008.

RODRIGUES, A. P. D.; CARVALHO, A.S.; SANTOS, A. S.; ALVES, C. N.; NASCIMENTO, J.L.; SILVA, E.O. Kojic acid, a secondary metabolite from sp., acts as an inducer of macrophage activation. **Cell Biology International**. V. 1, p. 335-343. 2011.

RODRIGUES, A. P. D.; FARIAS, L. H. S.; CARVALHO, A. S. C.; SANTOS, A. S.; DO NASCIMENTO, J. L. M; SILVA, E.O. A Novel Function for Kojic Acid, a Secondary Metabolite from *Aspergillus* Fungi, as Antileishmanial Agent. **Plos One**. V. 9, p. e91259, 2014.

ROSA, M. S. S. et al. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, V. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.

ROSSETI, A.S. *Bordetella pertussis*: Participação da arginase. TGF- β e TRL-4 no controle da síntese de óxido nítrico em macrófagos derivados da medula óssea murina. **Dissertação (Mestrado em Interunidades em Biotecnologia)** - São Paulo, Universidade de São Paulo/Instituto Butantan, 51p, 2009.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, 1903.

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

SANTIN, M.R. et al. *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 105 (6), p.1489-1496, 2009.

SAKTHIANANDESWAREN, A.; FOOTE, S. T.; HANDMAN, E. The role of host genetics in Leishmaniasis. **Trends Parasitology**. V. 25, n. 8, p. 383–391, 2009.

SECCO, R., CORDEIRO, L., MARTINS, E.R. Phyllanthaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2010.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**. V. 18, n. 12, p. 1056-1069, 2011.

SILVA, M.T. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. **Journal of Leukocyte Biology**. V. 87, n. 5, p. 805-813, 2010.

SILVA, N.S. & MUNIZ, V. D. Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis in the State of Acre, Brazilian Amazon. **Caderno de Saúde Pública**. V. 25, n. 6, p. 1325-1336, 2009.

SILVA, R.R.P. Atividade leishmanicida do extrato da raiz de *Physalis angulata* e sua ação na célula hospedeira. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) – Belém, Universidade Federal do Pará, 2013. 90p.

SILVEIRA F. T., LAINSON, R.; GOMES C. M. C.; LAURENTI, M. D. & CORBETT, C. E. P. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous Leishmaniasis. **Parasite Immunology**. V. 31, n.8, p. 423-431, 2009.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R. & CORBETT, C. E. P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, V. 99, p. 239-51, 2004.

SILVEIRA, F. T.; MÜLLER, S. R.; DE SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D. & CORBETT, C. E. P.; Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, V. 22, n. 1, p. 9-20, 2008.

SINGH, N.; MISHRA, B. B.; BAJPAI, S.; SINGH, R. K.; TIWARI, V.K. Natural product based leads to fight against Leishmaniasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. V. 22, p. 18-45, 2013.

SKLAVOS, A.V. et al. Cutaneous leishmaniasis in a child treated with oral fluconazole. **Australasian Journal of Dermatology**, V. 51, n. 3, p. 195-197, 2010.

SMIT, E., Pretorius, E., Anderson, R., Oommen, J. & Potjo, M. Differentiation of Human Monocyte *in Vitro* Following Exposure to Canova in the Absence of Cytokines. **Ultrastructural Pathology**. V. 32, p. 147-152, 2008.

SOARES, R. P. P.; CARDOSO, T. L.; BARRON, T.; ARAÚJO, M. S. S.; PIMENTA, P.F.P.; TURCO, S.J. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. **International Journal for Parasitology**. V. 35, p. 245–253, 2005.

SOTO, J. & BERMAN, J. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 100, n. 1, p. 34-40, 2006.

SOTO, J. et al. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. **Clinical Infectious Disease**. V. 33, p. 57-61, 2001.

STEMPIN, C.C., CERBAN, F.M. Macrófagos e indução da arginase como mecanismo de evasão de parasitas. **Medicina**. V. 67, p. 737-746, 2007.

SUNDAR, S. et al. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. **New England Journal of Medicine**. V. 21,n. 25, p. 2571-2581, 2007.

SUNDAR, S. & CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Comment in Expert Opinion Pharmacotherapy**. V. 14, n. 1, p. 53-63, 2013.

TANAKA, A. K.; GORIN, P. A. J.; STRAUS, A. H. Role of *Leishmania (L.) amazonensis* amastigote glycosphingolipids in macrophage infectivity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 40, n. 6, p. 799-806, 2007.

TEIXEIRA, D.E. Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. 1ª Ed. Rio de Janeiro. **Fundação CECIERJ**, Consórcio CEDERJ, 2013.

TRIPATHI, A. & GUPTA C.M. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotas. **Molecular and Biochemical Parasitology**. V. 128, p. 1-9, 2003.

TUON, F.F., AMATO, V.S., BACHA, H.A., ALMUSAWI, T., DUARTE, M.I., NETO, V.A. Toll-Like receptors and Leishmaniasis. **Infection and Immunity**. V. 76, n. 7, p. 866-872, 2008.

UEDA-NAKAMURA, T., et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**. V. 55, n. 2, p. 99-105, 2006.

VALE, E. C. S. & FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. V. 80, p. 421-428, 2005.

VAN GRIENSVEN, J. & DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, V. 26, n. 2, p. 309-22, 2012.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. Cell Biology of *Leishmania* spp.: Invading and Evading. **Current Pharmacology Design**. V. 8, n. 4, p. 297-318, 2002.

WANG, M.Z., et al. Novel arylimidamides for treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 54, n.6, p. 2507-16, 2010.

WINBERG, M. E., RASMUSSEN, B., SUNDQVIST, T. *Leishmania donovani*: inhibition of phagosomal maturation is rescued by nitric oxide in macrophages. **Experimental parasitology**. V. 2, p. 165-170, 2007.

WHO EXPERT COMMITTEE. **Control of the leishmaniasis**. WHO technical report series;no. 949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3307017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

ZAHNG, W., JUN-YONG LI, PING LAN, PING-HUA SUN, YING WANG, WEN-CAI YE, WEI-MIN. Chemical synthesis and biological activities of Securinega alkaloids. **Journal of Chinese Pharmaceutical Science**. V. 20, p. 203-217, 2011.

Anexo I: Participação em eventos



V Encontro Anual do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB)

Certificado

Certifico que LIENNE SILVEIRA DE MORAES apresentou o trabalho
«ACTION OF ALKALOID (+)-PHYLANTIDINE ON *Leishmania (Leishmania) amazonensis*
AND THE HOST CELL.»

no V Encontro Anual do INBEB, realizado nos dias 07, 08 e 09 de maio de 2014, na
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).



Coordenador do INBEB
Professor Jerson Lima da Silva

INBEB
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
de Biologia Estrutural e Bioimagem

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico

FAPERJ
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

DECIT
Departamento de Inovação Tecnológica

CAPEB

Anexo II: Missão de Estudos



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

**DECLARAÇÃO**

Declaro que a aluna de mestrado LIENNE SILVEIRA DE MORAES, vinculada ao programa de pós-graduação de Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará, desenvolveu missão de estudo no Laboratório de Neurobiologia Comparativa e do Desenvolvimento da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo projeto intitulado “Cooperação Interinstitucional em Neurociências e Biologia Celular em Modelos Experimentais de Interesse da Região Amazônica”, aprovado no Programa Nacional de Cooperação Acadêmica – PROCAD-NF - Edital Capes 21/2009. Essa missão foi realizada no período de 29 de Abril a 29 de Maio de 2013.

Rio de Janeiro, 31 de Maio de 2013.

Dra. Silvana Allodi
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Biofísica
Colaboradora da Equipe da IES Associada 1 PROCAD/NF 2009
Laboratório de Neurobiologia Comparativa e do Desenvolvimento