



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**ESTUDO DA AÇÃO DA CROTOXINA SOBRE O PERFIL DE
ATIVÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS INFECTADOS COM
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

LUIS HENRIQUE SEABRA DE FARIAS

Belém – Pará
2016

LUIS HENRIQUE SEABRA DE FARIAS

**ESTUDO DA AÇÃO DA CROTOXINA SOBRE O PERFIL DE
ATIVÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS INFECTADOS COM
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

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

Belém – Pará
2016

LUIS HENRIQUE SEABRA DE FARIAS

ESTUDO DA AÇÃO DA CROTOXINA SOBRE O PERFIL DE ATIVAÇÃO
DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS INFECTADOS COM *Leishmania*
(Leishmania) amazonensis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientadora: Profa. Dra. Edilene Oliveira da Silva
Instituto de Ciências Biológicas, UFPa

Banca Examinadora: Dr. Chubert Bernardo Castro de Sena
Instituto de Ciências Biológicas, UFPa

Profa. Dra. Barbarella de Matos Macchi
Instituto de Ciências Biológicas, UFPa

Prof. Dr. Adriano Penha Furtado
Instituto de Ciências Biológicas, UFPa

Profa. Dra. Maria Helena Crespo Lopez
Instituto de Ciências Biológicas, UFPa

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento (Suplente)
Instituto de Ciências Biológicas, UFPa

Belém, 12 de Abril de 2016

“Nossa vida é um caminho, quando paramos, não vamos para frente”.

(Papa Francisco)

À Deus e minha família

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação profissional.

À minha família que me formou como pessoa, me preparou para a vida, para superar os problemas insuperáveis, para seguir em frente, mesmo quando todos diziam para voltar.

À minha esposa Ana Paula DE Farias, namorada, amiga, companheira, colega de trabalho, colega de faculdade...e todas as coisas boas que uma pessoa pode ser, eu agradeço, pela paciência, amor, dedicação, paciência, companheirismo, cumplicidade e....paciência. Meu orgulho de todos os dias, de te ver tão linda todas as manhãs para ir ao trabalho e ao mesmo tempo tão inteligente e decidida do que quer na vida. Não consigo me lembrar da vida antes de conhecer você, talvez eu não estivesse vivo ainda até te conhecer. Muito obrigado por tudo!

À minha professora, orientadora e conselheira Edilene Oliveira, que depois de 11 anos me mostrou como amadurecer, a como lidar com pessoas idiotas sem fechar a porta na cara delas. Aprendi nesses longos anos que fazer pesquisa é uma questão de amor, nunca de dinheiro, nem fama. Estou saindo levando a lição “Seja essencial para o laboratório, sempre”, além de muito conhecimento e muitas histórias que contarei aos meus futuros alunos. Muito obrigado pela oportunidade!

Aos meus companheiros de laboratório, Didi (Amanda Hage) que não aprendeu que ~~eacheça~~ insulina não é água não; Bruno, que provavelmente não lerá isto porque estará escrevendo outro artigo; Josineide (Neidão) que quando não está em Dubai...está em Iguarapé-Miri mesmo; Paula Frade, que nos deixou...mas esqueceu de levar o Rony consigo!; Evelen, a única pessoa detentora do guarda-roupa que leva ao Fantástico Mundo de Evelen; Lienne que adquiriu recentemente Filantidinofobia...muito triste...; Jorge que me mostrou a como viajar nas ideias sem precisar de entorpecentes; Davi que nos apresentou outras doenças transmitidas por flebotomíneos: estresse, pressão alta e rugas!; Letícia e Vanessa que, quando não estão juntas....estão separadas (alguém explica pra Letícia por favor); Carolzinha que me deixou sem ninguém para que eu possa extravasar todas a chatice; e a todos que já passaram pelo lab. com essas pessoas eu tenho as melhores lembranças de minha vida, muito obrigado a todos!

Aos professores que me ajudaram na formação com aluno e profissional.

À UFPa que por muito tempo foi minha casa me acolhendo por todos estes anos.

Ao Instituto Evandro Chagas, principalmente aos “meus” funcionários, Felipe, Jackeline e Sanderson, afinal eu pago meus impostos!

Ao Instituto Butantan que me permitiu conhecer e estudar outras áreas do conhecimento, principalmente à profa. Sandra e seus alunos, obrigado pelo acolhimento.

Ao BAIP que sempre esteve preparado para todas as minhas dúvidas, principalmente os secretários Hosana e Mirna.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 CLASSIFICAÇÃO.....	12
1.2 MORFOLOGIA	13
1.3 CICLO BIOLÓGICO	13
1.4 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	14
1.4.1 Tratamento.....	16
1.5 CÉLULA HOSPEDEIRA E A INTERAÇÃO COM O PARASITO.....	18
1.6 PERFIL DE ATIVAÇÃO MACROFÁGICA.....	19
1.7 FORMAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS E PRODUÇÃO DE PGE2	20
1.8 CROTOXINA DERIVADA DE VENENO DE <i>CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS</i>	21
1.9 OBJETIVO GERAL.....	24
1.10 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.1 OBTENÇÃO DE CROTOXINA (CTX)	25
2.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO	25
2.2.1 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS	25
2.3 PREPARO DA MATRIZ TRIDIMENSIONAL DE COLÁGENO TIPO I.....	25
2.4 AÇÃO DA CTX SOBRE MACRÓFAGOS MURINOS.....	26
2.4.1 Viabilidade celular.....	26
2.4.2 Produção de ROS	26
2.5 ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	27
2.5.1 Atividade antipromastigota.....	27
2.5.2 Atividade antiamastigota	27
2.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS APÓS TRATAMENTO COM CTX.....	28
2.6.1 Produção de Óxido Nítrico (NO) em macrófagos infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	28
2.6.2 Produção de prostaglandina E2 (PGE2) em macrófagos infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	28
2.6.3 Detecção de corpos lipídicos em macrófagos infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	28

2.6.4	Quantificação de citocinas em macrófagos infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	29
2.6.5	Alterações morfológicas em macrófagos infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	29
a.	Área celular.....	29
b.	Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	29
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
3	RESULTADOS.....	31
3.1	ANÁLISE DA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM CTX.....	31
3.2	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ROS POR MACRÓFAGOS TRATADOS COM CTX. 31	
3.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA DE CTX.....	32
3.4	ATIVIDADE ANTIAMASTIGOTA.....	33
3.5	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS.....	34
3.5.1	Área celular.....	34
3.5.2	Morfologia de formas promastigotas e macrófagos por MEV em matriz de colágeno.....	35
3.6	PERFIL DE ATIVAÇÃO MACROFÁGICA.....	37
3.6.1	Produção de NO.....	37
3.6.2	Perfil de citocinas.....	37
3.6.3	Produção de Prostaglandina E2 (PGE2).....	38
3.6.4	Formação de corpos lipídicos.....	39
4	DISCUSSÃO.....	41
5	CONCLUSÃO.....	47
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
	ANEXO 1.....	56
	ANEXO 2.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático da forma promastigota e amastigota.	13
Figura 2. Ciclo biológico de parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	14
Figura 3. Espectro clínico da leishmaniose tegumentar americana.	16
Figura 4. Representação esquemática da polarização da ativação macrofágica após diferentes estímulos.	20
Figura 5. Viabilidade celular através do método MTT em macrófagos tratados com CTX por 48h.	31
Figura 6. Gráfico da análise da produção de ROS em macrófagos tratados por 24 e 48h.	32
Figura 7. Atividade antipromastigota de CTX após 96 horas de tratamento.	33
Figura 8. Macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com CTX por 24h e 48h.	34
Figura 9. Análise morfométrica.	35
Figura 10. Microscopia Eletrônica de Varredura de co-cultivo em matriz de colágeno de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos peritoneais murinos.	36
Figura 11. Concentração de nitrito em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com CTX.	37
Figura 13. Gráfico da produção de PGE2 no sobrenadante de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com CTX por 48h.	39
Figura 14. Gráfico da intensidade fluorescência por citometria de fluxo.	40

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença parasitária amplamente disseminada na maioria dos países da América Latina, e pode ser causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Este protozoário é um parasito intracelular obrigatório que desenvolveu mecanismos para subverter a atividade microbicida dos macrófagos, como a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). A quimioterapia ainda é um dos tratamentos mais efetivos para esta doença, entretanto, as drogas leishmanicidas disponíveis são, em geral, tóxicas, apresentam custo elevado e necessitam da utilização por longos períodos. Assim, o desenvolvimento de novos produtos naturais para o tratamento da leishmaniose se tornou prioridade. As toxinas ofídicas são fontes naturais de produtos bioativos com propriedades terapêuticas amplamente descritas na literatura. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a ação da crotalina (CTX), uma proteína dimérica e o principal componente do veneno de serpente da espécie *Crotalus durissus terrificus*, sobre a interação *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e macrófagos. A toxina diminuiu significativamente em 32,5% o crescimento de promastigotas na concentração de 1,2 µg/mL e 24,9% na concentração de 2,4 µg/mL após 96 horas de tratamento (IC₅₀ = 22,86 µg/mL). O teste colorimétrico (MTT) demonstrou que essa toxina não induziu efeito tóxico sobre macrófagos. Também foi observado que macrófagos tratados com CTX apresentaram um significativo aumento na capacidade de metabolizar o substrato MTT (média = 59,78% ± 3,31, mais elevado) quando comparados ao controle sem tratamento. Além disso, foi observado que os macrófagos tratados apresentaram intensa produção de ROS (média = 35,95% ± 2,76, mais elevado) comparado ao controle. Outro dado importante observado foi o fato de células hospedeiras infectadas e tratadas com CTX apresentarem um aumento significativo na capacidade fagocítica e na eliminação dos parasitas intracelulares, com aumento na produção de NO, aumento da área celular e a intensa produção de citocinas pró-inflamatórias, caracterizando o perfil M1 de ativação celular. Esta ativação teve como consequência a morte dos parasitas através da resposta do hospedeiro, diminuindo o número de parasitas após 48h de tratamento com 2,4 e 4,8 µg/mL de CTX, revertendo, assim, a ação anérgica promovida pela *L. amazonensis*. Portanto, a CTX promove um bom prognóstico para esta infecção, evidenciando a possibilidade desta substância atuar como possível alternativa de tratamento contra leishmaniose, especialmente em casos de infecções por espécies que induzem respostas anérgicas.

Palavras-chaves: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; crotoxina; *Crotalus durissus terrificus*, macrófago

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a parasitic disease widely spread in most countries of Latin America, and caused by different species of the genus *Leishmania*. This protozoan is an obligate intracellular parasite that developed mechanisms to subvert the microbicidal activity of macrophages, such as inhibition of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) production. The chemotherapy is one of the most effective treatments for this disease, although the antileishmanial drugs available are in general toxic, expensive and require long-term treatment. Thus, the development of new natural products to treat leishmaniasis has become a priority. Ophidian toxins are natural sources of bioactive products with therapeutic properties already described. Therefore, we considered analyze the activity of crotoxin (CTX), a dimeric protein and the main neurotoxic component of *Crotalus durissus terrificus* snake venom, against promastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* and macrophages. The toxin significantly decreasing of 32,5% on the growth of promastigotes at 1,2µg/mL and 24,9% at 4,8µg/mL after 96 hours of treatment (IC₅₀= 22,86µg/mL). The colorimetric assay (MTT) showed that this compound presented no cytotoxic effects against macrophages. Interestingly, CTX treated macrophages presented a significant higher capacity to metabolize the MTT substrate (mean= 59,78% ±3,31, higher) when compared with untreated control. It was observed that treated macrophages presented intense production of ROS (mean= 35,95% ±2,76, higher) when compared with untreated cells. Treated macrophages presented increased phagocytic activity and were capable to eliminate intracellular parasites. Besides that, these cells had it NO and pro-inflammatory cytokines production increased and morphological alteration that characterizes the M1 cellular activation profile. That activation culminates with the parasite elimination throughout host response, reverting the anergic action promoted by *L. amazonensis*, thereby leading to a good disease prognostic, evidencing that this compound could be a promising antileishmanial agent.

Keywords: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; Crotoxin; *Crotalus durissus terrificus*, macrophage

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um complexo de doenças que acometem milhões de pessoas em todo o mundo, sendo endêmica em 98 países. Estima-se que os casos desta doença atinjam por ano um total de 1,3 milhão de pessoas, sendo a maioria dos casos da forma cutânea ou mucocutânea (Who, 2013). A prevalência total indica que 12 milhões de pessoas possuem alguma forma da doença e cerca de 350 milhões vivem em áreas de risco (Desjeux, 2004). Esta doença pode ser causada por vinte espécies de protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania* e a transmissão ocorre através da picada de insetos hematófagos, conhecidos como flebotomíneo.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é caracterizada por um espectro de manifestações clínicas que se subdividem em lesões ulcerativas localizadas no local do repasto sanguíneo realizado pelo vetor, nomeada leishmaniose cutânea localizada (LCL); nódulos múltiplos não ulcerados, como na leishmaniose cutânea difusa (LCD); destruição da mucosa que ocorre na leishmaniose mucocutânea (LMC); e um perfil que se enquadra entre as manifestações de LMC e LCD chamada leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB). Diversas espécies de *Leishmania* são causadoras da LTA, cada uma é conhecida por estimular um perfil de resposta no hospedeiro. O espectro imunopatológico da leishmaniose se apresenta com a produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β , que estão relacionadas com o favorecimento da replicação do parasito, assim como a IL-10 tem o papel de contrabalancear a ação do INF- γ e TNF- α durante a reação inflamatória. Entretanto, a forma clínica da doença está relacionada aos níveis de produção de cada citocina, como, por exemplo, a LMC apresenta altas taxas de produção de citocinas pró-inflamatórias e baixa produção de IL-10 o que acarreta em uma resposta inflamatória exacerbada (McGwire & Satoskar, 2014; Silveira *et al.*, 2004, 2009).

1.1 CLASSIFICAÇÃO

No Brasil sete espécies causadoras de leishmaniose são reconhecidas, sendo uma espécie do subgênero *Leishmania* e 6 espécies do subgênero *Viannia*. As três principais espécies são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *guyanensi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Nas regiões Norte e Nordeste foram identificadas as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L.(V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* (Brasil, 2010)

1.2 MORFOLOGIA

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório das células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), com duas formas evolutivas: promastigota e amastigota (Figura 1). A forma promastigota é encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, representando a forma alongada do protozoário com cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo livre a partir da porção anterior da célula; são extracelulares e móveis. A forma amastigota, encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, apresenta forma oval e com flagelo curto interiorizado na bolsa flagelar; é intracelular e são pouco móveis (Castellano, 2005).

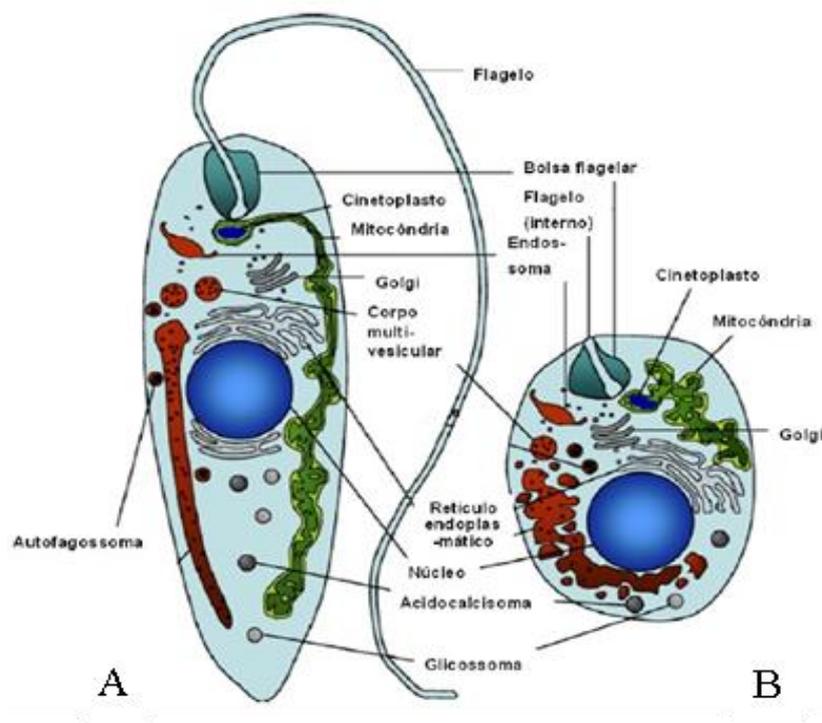


Figura 1. Desenho esquemático da forma promastigota (A) e da forma amastigota (B) (Fonte: Besteiro *et al.*, (2007) – Modificado).

1.3 CICLO BIOLÓGICO

A *Leishmania* apresenta ciclo evolutivo heteroxênico (digenético), composto de duas fases: uma extracelular dentro do hospedeiro invertebrado (flebótomo) e uma fase intracelular dentro do hospedeiro vertebrado.

Após ingerir sangue do hospedeiro vertebrado contendo formas amastigotas, os vetores albergam estas formas evolutivas no seu trato digestivo no qual, após a digestão do sangue, transformam-se em promastigotas procíclicas. Essas formas extracelulares, altamente

replicativas e não infectivas diferenciam-se em promastigotas metacíclicas com alta capacidade de infecção, através de um processo chamado de metaciclogênese. Após esse processo, as formas promastigotas saem das células intestinais e migram em direção ao aparelho bucal do inseto vetor (Bañuls *et al.*, 2007).

As promastigotas metacíclicas são liberadas juntamente com a saliva do inseto, no momento em que as fêmeas infectadas realizam um novo repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado (Figura 2 – 1) (Brasil, 2010). Estas formas resistem à ação lítica do complemento e são rapidamente fagocitadas por células do SMF, como neutrófilos e monócitos que são atraídos para o local da inoculação por intensa reação inflamatória (Figura 2 – 2) (Neuber, 2008).

No hospedeiro vertebrado, ocorre a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas, altamente infectivas e responsáveis pelo desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero (Figura 2 – 3) (Bañuls *et al.*, 2007). As formas amastigotas se multiplicam no interior das células fagocíticas até sua ruptura, ficando livres na circulação e infectando novas células (Figura 2 – 4), além de poderem ser ingeridas novamente por vetores em novo repasto sanguíneo (Figura 2 – 5), mantendo assim o ciclo com o homem como hospedeiro e os animais, muitas vezes domésticos, como reservatórios (Figura 2 - 6) (Reithinger, *et al.*, 2007; Sakthianandeswaren *et al.*, 2009).

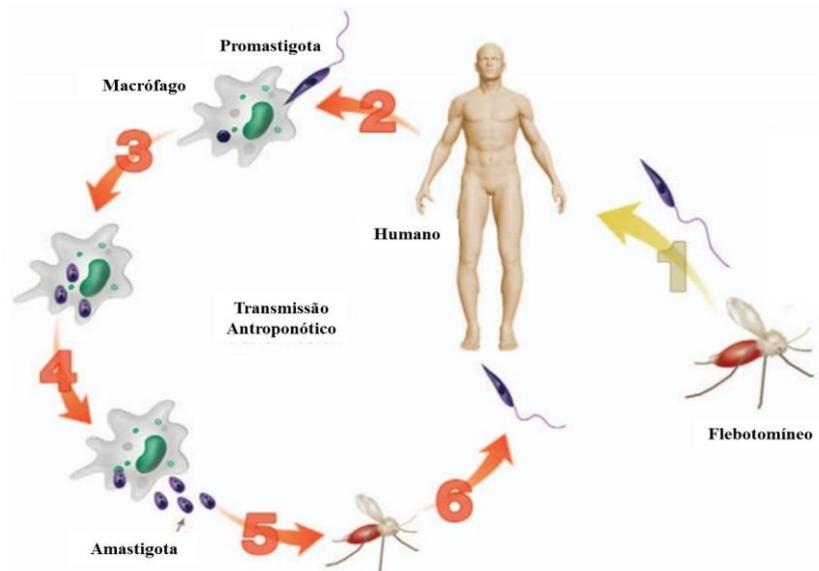


Figura 2. Ciclo biológico de parasitas do gênero *Leishmania*. Fonte: (Kumar & Engwerda, 2014) modificado.

1.4 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Por conta da complexidade e diversidade biológica do parasito, vetores e dos

hospedeiros, a leishmaniose apresenta um grande espectro de manifestações clínicas. Por isso, não sendo considerada uma simples doença, mas sim, um complexo de doenças que se apresentam de diferentes formas (Antoine *et al.*, 2004).

As manifestações da leishmaniose apresentam diferenças marcantes na gravidade e impacto na saúde, que se encaixam dentro de duas categorias amplas: Leishmaniose visceral e Leishmaniose tegumentar americana (LTA) (Murray *et al.*, 2005). A LTA ainda se subdivide em diversas formas clínicas, dependendo da espécie envolvida na infecção.

Nos seres humanos, a LTA pode ser subclínica, ou apresentar manifestações que vão desde lesões cutâneas localizadas, disseminadas ou difusas a lesões mucocutâneas agressivas e mutilantes (Gontijo & Carvalho, 2003).

As principais manifestações da leishmaniose tegumentar americana são: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL); Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) e Leishmaniose Mucocutânea (LMC).

A LCL é a forma menos grave da doença sendo causada por várias espécies, como *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis* e *Leishmania braziliensis* em várias regiões da América Central e do Sul (Goto & Lindoso, 2012). A LCL inicia-se com uma área de vermelhidão em torno da região da picada que aumenta de tamanho. Após 3-4 semanas pode se observar úlceras planas e margens elevadas em áreas da pele (Figura 3-A) que normalmente estão descobertas, tais como as mãos, face, ou parte inferior das pernas. A incubação pode levar dias ou até mesmo anos, em situações mais raras. Na fase mais grave da doença, nódulos queratóides podem se desenvolver podendo ser confundida com neoplasias (Neuber, 2008).

A LMC é a forma mais grave da LTA, que pode evoluir para lesões traumáticas, podendo levar meses ou anos após as lesões primárias, para se manifestar. É uma infecção decorrente da destruição local crônica do tecido nasal (Figura 3-B), boca e oro e nasofaringe e pálpebras, que podem progredir afetando a função respiratória e dificultando a nutrição (Oliveira & Brodskyn, 2012). A doença é geralmente refratária à quimioterapia com os antimoniais e os pacientes podem morrer de superinfecções secundárias e desnutrição (Calvopina *et al.*, 2004).

A LCD caracteriza-se pela presença de lesões disseminadas em diversas regiões do corpo (Figura 3-C), contendo macrófagos intensamente parasitados, sendo associado à fraca resposta celular do hospedeiro. Geralmente ocorre em indivíduos anérgicos ou que foram tratados contra leishmaniose visceral (Ashford, 2000; Grevelink & Lerner, 1996).

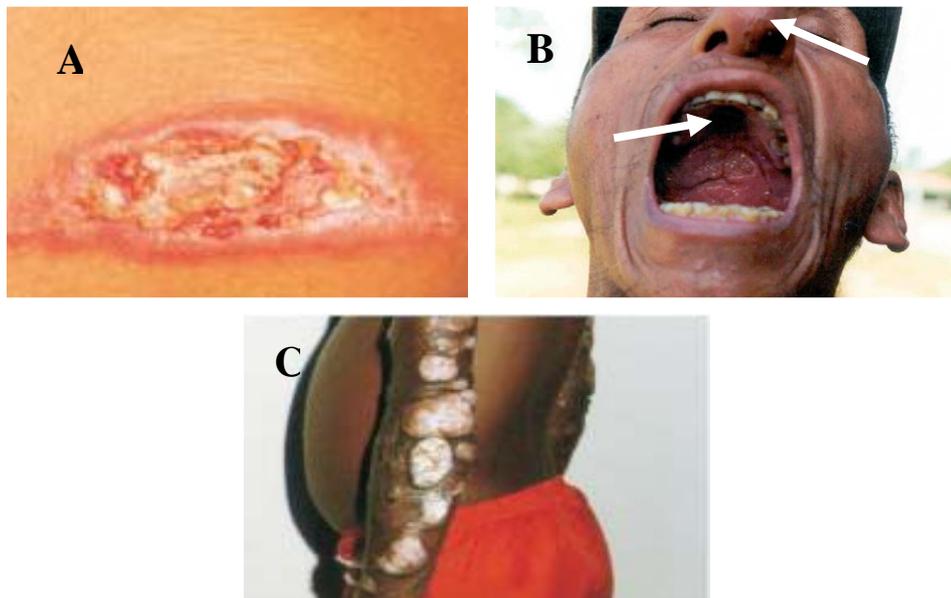


Figura 3. Espectro clínico da leishmaniose tegumentar americana.

A- Lesão de LCL, causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, presença de grande infiltrado de células e abundantes parasitos nas bordas. B – LMC causada por *L. braziliensis*, pode-se observar lesões nas mucosas nasais e do palato (setas). C - LCD causada por *L. amazonensis*, com típicas lesões cutâneas nodulares com grande quantidade de macrófagos e parasitos. FONTE: (Reithinger, *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2004).

1.4.1 Tratamento

No Brasil foram utilizados pela primeira vez em 1913, por Gaspar Vianna, os compostos conhecidos como antimoniais (sob forma de sais trivalentes) no tratamento da LT. Na LV, a droga foi usada somente dois anos após, na Itália. Na década de 40, os derivados pentavalentes (Sb+5) foram introduzidos, e desde então, estas tem sido as drogas de primeira escolha no tratamento da leishmaniose (Brasil, 2006).

A OMS e o centro de controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América estão utilizando nos últimos anos doses elevadas de antimoniais, devido ao aparecimento de resistência do parasito a essas drogas, principalmente em países como Índia, Quênia e Sudão (Brasil, 2006). Os efeitos colaterais mais frequentes no organismo humano desse composto são: cefaleia, náuseas, vômitos, febre, mialgia e artralgia. Outros efeitos mais graves são: toxicidade cardíaca, renal e hepática (García-Almagro, 2005). Além da toxicidade, o elevado custo, dificuldade de administração da droga e aumento da morbidade ainda são limitações para

o uso dessa droga no tratamento da leishmaniose (Mitropoulos *et al.*, 2010).

Quando ocorre resistência ao tratamento com antimônio pentavalente ou este não demonstra resultados satisfatórios, empregam-se drogas de segunda escolha como anfotericina B e pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina) (Marzochi *et al.*, 2010).

Anfotericina B é a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente, atuando nas formas promastigotas e amastigotas do parasita, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Seu mecanismo de ação se dá através da ligação preferencial com ésteres (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática da *Leishmania* (Brasil, 2006). Os efeitos colaterais mais comuns incluem náuseas, vômitos, febre, hipopotassemia, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas. A toxicidade cardíaca e renal, além de sua aplicação via endovenosa e os grandes períodos de hospitalização requeridos impedem seu uso fora do ambiente hospitalar (Richard & Werbovetz, 2010).

Fármacos como o alopurinol, compostos azóis, paramomicina e miltefosina, são boas opções alternativas ao uso dos antimoniais pentavalentes (Mitropoulos *et al.*, 2010). Sendo a miltefosina (hexadecilfosfocolina) a droga mais recente utilizada no combate às leishmanioses (Rath *et al.*, 2003). A miltefosina é capaz de ativar de macrófagos de camundongos infectados por *Leishmania* spp. além de inibir a síntese de lipídeos destes protozoários (Sindermann *et al.*, 2004).

O sucesso para a cura desta protozoose depende do tratamento correto, da resposta imunológica do paciente, da cronicidade das lesões, além de outros aspectos. O critério de cura considerado pelo Ministério da Saúde é o clínico, baseado na completa cicatrização das lesões, que deve acontecer até três meses depois do tratamento. Caso não ocorra o desfecho esperado, o caso é considerado como recidiva e então um novo tratamento é iniciado (Brasil, 2010).

A alta toxicidade, resistência à droga, modo de administração, elevado custo e problemas operacionais, são as principais desvantagens apresentadas pelas formulações atualmente disponíveis para o tratamento da leishmaniose. Representando assim, um obstáculo para um tratamento adequado dos casos da doença (Basano & Camargo, 2004).

Estudos químicos e imuno-farmacológicos *in vitro* têm sido empregados com o objetivo de encontrar novos compostos menos citotóxicos, e que sejam economicamente viáveis para o tratamento da leishmaniose. Neste contexto, o uso de produtos naturais, como extratos de plantas e compostos derivados, além de peçonhas e secreções animais, podem constituir potenciais agentes medicinais. Atualmente, os venenos têm sido reconhecidos como uma importante fonte de compostos bioativos e contribuído para o desenvolvimento de novos medicamentos no combate a diferentes enfermidades humanas (Mayer *et al.*, 2011; Peichoto *et*

al., 2011).

1.5 CÉLULA HOSPEDEIRA E A INTERAÇÃO COM O PARASITO

O sistema mononuclear fagocitário (SMF) responsabiliza-se por grande parte da imunidade celular, atuando na defesa contra microrganismos, incluindo bactérias, fungos, vírus, parasitas e corpos estranhos, bem como remoção de células mortas, partículas inaladas, entre outros (Weinberg, 2009).

Os macrófagos são originados a partir de monócitos e desempenham função de defesa inata do organismo. Comportam-se como células primárias que fagocitam, reconhecem e destroem células mortas e patógenos invasores (Maity *et al.*, 2009; Robinson *et al.*, 2004), através de receptores de superfície que auxiliam no reconhecimento de antígenos (Gruenheid & Finlay, 2003).

Ao entrar em contato com microrganismos, a célula hospedeira sofre algumas alterações morfológicas adquirindo características de célula ativada, como complexo de Golgi bem desenvolvido, aumento do número de lisossomos, além do retículo endoplasmático bem evidente. Junto com essas alterações, pode ser observado o rearranjo do citoesqueleto o que auxilia nos processos de fagocitose (Patel & Harrison, 2008; Smit *et al.*, 2008).

Já com relação à *Leishmania*, a mesma apresenta algumas moléculas de superfície como o lipofosfoliglicano (LPG) e a glicoproteína 63 (gp63) (Mosser & Brittingham, 1997). O LPG inibe a formação do complexo de ataque à membrana, derivada do sistema complemento, além de atrasar a fusão do fagossomo ao lisossomo. Já a gp63 cliva fragmentos C3b em suas formas inativas C3bi, que opsonizam os parasitos para serem reconhecidos pelos receptores de complemento CR1 e CR3, facilitando a fagocitose (Pimenta *et al.*, 1994; Sacks & Sher, 2002), além de inibir a atividade de hidrolases lisossomais, que evita a destruição dos parasitos intracelulares (Zambrano-Villa *et al.*, 2002).

Os macrófagos depois de ativados produzem citocinas como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α que estimulam a resposta inflamatória, porém a expressão destas citocinas varia de acordo com a resposta do hospedeiro às diferentes espécies de *Leishmania* (Reithinger *et al.*, 2007).

Após estímulo do agente infeccioso, os macrófagos produzem uma série de produtos citotóxicos como espécies reativas de oxigênio (ROS), ânions superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot). A produção desses compostos caracteriza o chamado “burst oxidativo”, que irá auxiliar a célula a destruir o parasito (Dunand *et al.*, 2006).

A via utilizada para auxiliar o “burst oxidativo” é a da NADPH oxidase, uma enzima distribuída pela membrana do fagossomo e citosol, que após estímulo forma um o complexo que reduz o O_2 em ânions superóxidos (O_2^-), que são convertidos em H_2O_2 por meio da enzima superóxido dismutase (SOD) ou espontaneamente (Oliveira *et al.*, 2006).

A produção de alguns radicais intermediários, como o óxido nítrico (NO) que ocorre através da ativação da Oxido Nítrico Sintase induzida (iNOS), que irá converter a L-arginina em NO e L-citrulina, é observada nos macrófagos ativados. A iNOS, é uma enzima que está ausente em sua forma ativa em macrófagos não ativados e após estímulo com LPS e IFN- γ torna-se ativada (Hortelano *et al.*, 2003).

1.6 PERFIL DE ATIVAÇÃO MACROFÁGICA

Desde a sua descrição em 1905 por Metchnikoff, os macrófagos estão relacionados à destruição de patógeno, principalmente através da secreção de fatores inflamatórios que levariam a destruição do antígeno intracelular (Liu *et al.*, 2014; Mosser, 2003). Estas células são derivadas de precursores mielóides da medula óssea e são muito importantes no processo inflamatório do organismo. Recentemente foi descrito que macrófagos podem apresentar diferentes fenótipos após serem recrutados, que irão depender de quais estímulos foram utilizados e o local para o qual o macrófago realizou a migração (Bashir *et al.*, 2016; Xuan *et al.*, 2015).

Macrófagos, que anteriormente eram simplesmente chamados de “ativados”, atualmente apresentam dois principais perfis: ativados classicamente ou M1 e macrófagos ativados alternativamente ou M2 (Mosser, 2003). Há ainda autores que defendem que a classificação M1 e M2 de ativação macrofágica são apenas extremos de um espectro de ativação que depende de estímulos específicos para o direcionamento da ação celular (Jablonski *et al.*, 2015).

Quanto as suas características, os macrófagos M1 são células efetoras durante a resposta imune do tipo Th1 e são diferenciadas a este perfil por estímulos de ativação como a presença de INF- γ e lipolissacarídeo (LPS) (Mosser, 2003). Estas células apresentam marcadores que as distinguem dos demais perfis, como a elevada produção de citocinas IL-12, IL-23, IL-6, TNF- α e substâncias microbidas como NO e espécies reativas de oxigênio (ROS), além de alterações morfológicas como o espraiamento celular e a formação de projeções citoplasmáticas, fornecendo a capacidade de resistência contra parasitas intracelulares e células tumorais (Cassado, 2011; Xuan *et al.*, 2015).

Em contraste, macrófagos M2 são ativados durante a resposta linfocitária Th2 sendo

estimulados por IL-4, com o objetivo de reparar o tecido e a cicatrização (Cassado, 2011). Estes macrófagos são geralmente caracterizados pela alta produção de IL-10 e a diminuída produção de IL-12 e IL-23, com grande quantidade de receptores para manose e galactose, e estão relacionados à progressão tumoral. Juntamente a estes fatores, macrófagos M2 apresentam baixa ou nenhuma produção de NO e ROS, evidenciando sua reduzida capacidade microbicida (Figura 4) (Bashir *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2014).

O parasito *L. amazonensis* é conhecido como indutor da resposta imune do tipo Th2, levando a diferenciação de macrófagos M2, o que permite a proliferação eficaz do microrganismo e o estabelecimento da infecção (Bashir *et al.*, 2016). Acredita-se que a variação dos níveis de patogenicidade do parasito é responsável pela variabilidade de formas clínicas que os pacientes apresentam quando infectado por este microrganismo (Pereira & Alves, 2008; Podinovskaia & Descoteaux, 2015; Reithinger *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2009).

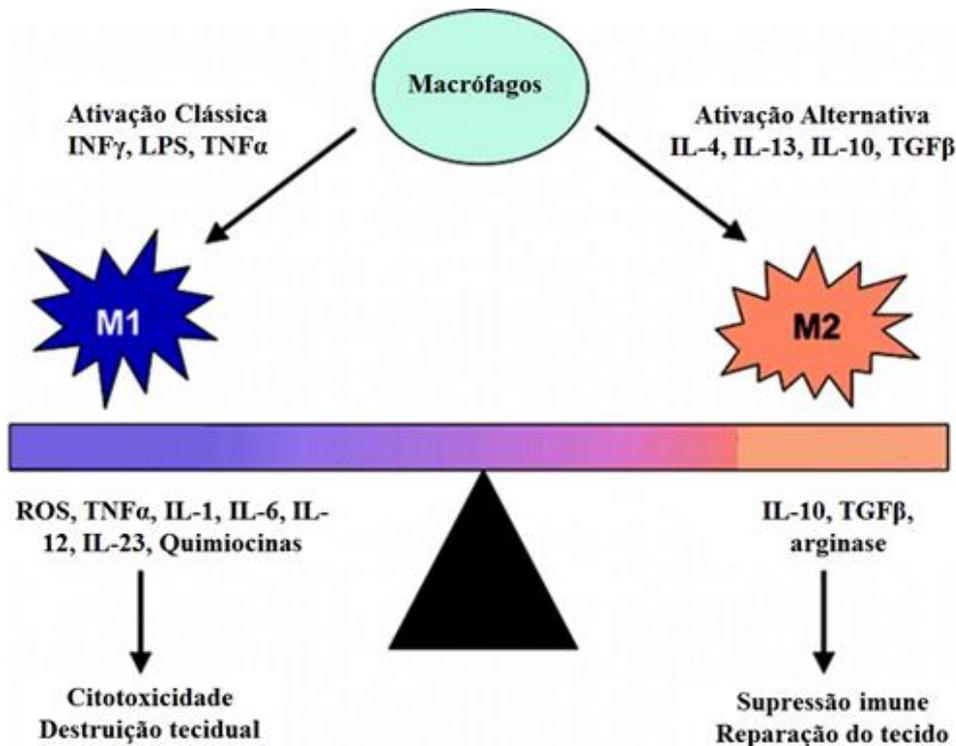


Figura 4. Representação esquemática da polarização da ativação macrofágica após diferentes estímulos, demonstrando o equilíbrio na resposta imunológica. Fonte Laskin (2010) – Modificado.

1.7 FORMAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS E PRODUÇÃO DE PGE2

Os corpos lipídicos (CL) são organelas que apresentam como função o armazenamento e o processamento de lipídios. Eles são compostos de lipídios neutros, principalmente

triglicerídeos e colesterol, e dependendo da fase metabólica, podem apresentar também enzimas que atuam na síntese ou degradação lipídica. Os CLs estão associados aos imunomoduladores lipídicos como a prostaglandina E2 (PGE2) e cicloxigenases (COX). Estes eicosanoides são encontrados comumente no interior de CL e estão envolvidos nos sinais inflamatórios como o rubor, devido à vasodilatação; suor, consequência da maior permeabilidade vascular; dor, através da ativação dos receptores nervosos; calor, atuando como agente pirogênico; e por fim a perda de função (Araújo-Santos *et al.*, 2014; Furtado *et al.*, 2014; Meester *et al.*, 2011).

A PGE2 é um eicosanoide derivado da oxidação do ácido araquidônico e apresenta diversas funções na homeostase do organismo, principalmente na resposta inflamatória ligadas à receptores Toll-like e citocinas pró-inflamatórias. A produção de PGE2 está associada às COX que se apresentam em duas isoformas COX-1 e COX-2 (Rodriguez *et al.*, 2013). A primeira isoforma está relacionada com a estimulação da agregação plaquetária e na atuação das plaquetas em resposta a uma lesão tecidual, enquanto que a segunda isoforma atua inibindo a agregação plaquetária e promovendo a vasodilatação (Dennis & Norris, 2015).

A produção de PGE2 e o acúmulo de CL estão positivamente correlacionadas em macrófagos que atuam no processo infeccioso. Porém, a atuação dos CL na interação das células hospedeiras com patógenos endocitados também pode gerar vantagem ao parasito, uma vez que este pode utilizá-lo como fonte de energia e na manutenção da infecção (Rabhi *et al.*, 2016).

Durante infecção por *Leishmania*, a produção de PGE2 favorece o crescimento parasitário em macrófagos, principalmente pelo aumento de IL-10 e TGF- β , e na redução da produção de NO por estas células. Entretanto, é importante determinar a origem do acúmulo de CL, seja do parasito ou da célula hospedeira, para as propriedades fisiológicas desta organela possam ser direcionadas em favor da eliminação do patógeno (Araújo-Santos *et al.*, 2014; Arcanjo *et al.*, 2015; Rabhi *et al.*, 2016).

1.8 CROTOXINA DERIVADA DE VENENO DE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS*

As serpentes são animais vertebrados pertencentes ao grupo dos répteis e podem ser divididas em peçonhentas e não peçonhentas (Pinho & Pereira, 2001).

As peçonhas das serpentes são fontes de substâncias bioativas com diversas atividades farmacológicas. Esta mistura complexa de componentes tóxicos e não tóxicos incluem um grande número de enzimas, tais como fosfolipases (PLA₂), hiuronidases, L- aminoácido oxidases (LAAO), esterases, 5' – nucleotidases, NAD nucleosidades, metaloproteases e

serinoproteases (cerca de 90% dos constituintes da peçonha) (Stocker, 1990). Entre os componentes enzimáticos tóxicos, os que possuem destaque são: as fosfolipases A₂ e as LAAO's, por apresentar potencial citotóxico (Torres *et al.*, 2010).

Os constituintes do veneno de serpente podem apresentar diferentes atividades fisiológicas, hematológicas e neurotransmissoras no homem. Estudos sobre estes fatores têm contribuído para a descoberta de vários mecanismos moleculares envolvidos no processo fisiológico e no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de doenças cardiovasculares e hematológicas (Kini, 2006).

A cascavel sul americana (*Crotalus durissus terrificus*), possui uma ampla distribuição geográfica. Habitando nos cerrados do Brasil central, nos campos e áreas abertas da região Norte, Sul e Sudeste e nas regiões áridas e semi-áridas da região Nordeste (Melgarejo, 2003). O estudo da ação do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) é especialmente relevante, por este gênero ser responsável pelo alto índice de óbitos em acidentes ofídicos e seu veneno possuir atividade miotóxica, neurotóxica e coagulante, que resulta em insuficiência respiratória, insuficiência renal aguda e paralisias musculares (Araújo *et al.*, 2003).

O veneno crotálico possui substâncias que são extremamente complexas, compostas por peptídeos, enzimas e proteínas já identificadas como: convulxina, crotoxina, giroxina e crotamina (Brasil, 2001).

A crotoxina (CTX), é a principal neurotoxina presente no VCdt. Representa cerca de 60% do peso total do veneno bruto seco. Por apresentar abundância neste veneno e relativa facilidade de purificação, a CTX tornou-se a primeira neurotoxina animal a ser cristalizada e purificada, tornando-se uma das toxinas mais pesquisada e estudada (Abe *et al.*, 1977).

Apesar de apresentar ação neurotóxica, a CTX é capaz de induzir diversos efeitos farmacológicos não associados à neurotoxicidade como, por exemplo, analgesia, ação anti-inflamatória e imunomodulatória (Zambelli *et al.*, 2016).

A CTX é um composto heterodimérico, formado por uma associação não covalente de duas subunidades, uma é básica, chamada de fosfolipase A₂ (PLA₂) e outra ácida chamada de crotapotina (Lorenzetti, 2006). Estudos da atividade tóxica da CTX e de suas frações isoladas demonstram que a PLA₂ possui toxicidade e uma ação enzimática *in vivo* muito menor que a CTX. Enquanto que a crotapotina não possui ação tóxica. Contudo, estudos indicam que esta última, é considerada a molécula carreadora da PLA₂ para seu receptor na membrana celular. Na superfície alvo, ocorre a dissociação das 2 subunidades seguida da ação efetora da PLA₂. Os resultados desses estudos mostram então que a interação entre as 2 subunidades é de fundamental importância para a alta toxicidade da CTX (Almeida *et al.*, 2015; Donato *et al.*,

1996).

Recentemente, foi demonstrado que a CTX, particularmente o, a PLA₂ é capaz de atuar no processo de cicatrização, através da imunomodulação da produção de citocinas (Samy *et al.*, 2016), e ainda é responsável pela ação inibitória do veneno sobre as funções dos macrófagos (Sampaio *et al.*, 2006a). Além destes resultados, Sousa e Silva, *et al.* (1996) realizaram estudos que demonstraram que os venenos crotálicos podem exercer efeito anti-inflamatório em macrófagos previamente ativados ou residentes. Após tratamento realizado como VCdt, foi observado que o espraçamento dos macrófagos e as funções fagocíticas são comprometidas, no entanto, foi verificada uma alta produção de NO e de espécies reativas de oxigênio, sugerindo assim que, este veneno é capaz de modular diferentes atividades realizadas pela mesma célula.

Estudos mais recentes mostram a aplicação deste efeito imunodulador da CTX no processo inflamatório observado no tratamento de doenças crônicas (Almeida *et al.*, 2015). A CTX ainda se mostra eficaz quando associado a outros medicamentos no tratamento do câncer, inibindo as propriedades tumorais e sensibilizando as células para a ação de substâncias já estabelecidas no tratamento da doença (Wang *et al.*, 2014, 2012).

A pesquisa com o VCdt em células de rim de macaco (VERO) tratadas com diferentes concentrações do veneno e infectadas com o vírus do sarampo, demonstrou um efeito inibidor da adsorção do vírus às células (Petricevich & Mendonça, 2003). Estudos realizados por Zieler *et al.* (2001) demonstraram que a PLA₂ apresenta inúmeras ações, entre elas: bactericida, anti-plasmoidal, além de ação anti-leishmanicida.

Poucos estudos foram realizados sobre a ação da VCdt em *Leishmania*, dentre eles Passero, *et al.* (2007) demonstraram que este veneno apresentou atividade leishmanicida duas vezes mais potente quando comparado a ação de venenos oriundos de outras serpentes, sem causar danos às células hospedeiras.

Assim, considerando a importância central do macrófago como célula hospedeira desses parasitas e a ação estimulatória da CTX sobre a capacidade secretória tanto de macrófagos pró-inflamatórios, quanto anti-inflamatórios, o estudo da ação desta toxina sobre macrófagos infectados com *L. amazonensis*, pode auxiliar na descoberta de novos medicamentos e em novas perspectivas de conduta terapêutica contra a leishmaniose tegumentar, uma doença de elevada incidência na região Amazônica e, portanto, um sério problema de saúde pública.

1.9 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação *in vitro* da CTX durante a infecção por *L. amazonensis*.

1.10 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a ação leishmanicida da CTX;
- Avaliar as alterações morfológicas durante a interação com *L. amazonensis* e após o tratamento com CTX;
- Analisar ação microbicida de macrófagos murinos tratados com CTX;
- Avaliar a formação de corpos lipídicos e a produção de prostaglandina E2 em macrófagos infectados e tratados com CTX;
- Avaliar o perfil de citocinas produzidos por macrófagos infectados com *Leishmania* e tratados com CTX;
- Determinar o perfil de ativação de macrófagos infectados e tratados com CTX.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DE CROTOXINA (CTX)

A crotóxina foi cedida pela Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni do laboratório de fisiopatologia do Instituto Butantan – São Paulo. A concentração estoque (2,3 mg/mL - foi obtida em solução de purificação conforme descrito por Silva *et al.*(2013).

2.2 CULTIVO E MANUNTENÇÃO DO PARASITO

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (Cepa MHOM26361) nas fases logarítmica (até 4 dias de cultivo) e estacionária (a partir de 5 dias em cultura) foram obtidas em meio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) provenientes do Programa de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, e mantidas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) em estufa B.O.D (*Biological Oxygen Demand*) à 27°C.

2.2.1 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS

Macrófagos peritoneais foram obtidos a partir de camundongos albinos (BALB/c). Os animais foram anestesiados e eutanasiados para a coleta dos macrófagos através da lavagem da cavidade peritoneal com solução de Hank's estéril, utilizando agulhas estéreis e seringas. O material aspirado foi concentrado por centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C. Os macrófagos foram transferidos para garrafas ou placas de cultura de 24 poços e incubados a 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂, durante 1 hora para adesão.

Após esse período foi feita lavagem com solução salina de fosfato estéril (PBS) pH 7.2 para remoção de células não aderentes e, em seguida, adicionado meio DMEM suplementado com 10% de SBF. Os animais foram sacrificados de acordo com as normas do Comitê de Ética (processo n° BIO053-12 CEPAE/ICB/UFPA) e acondicionados em recipientes plásticos apropriados e despejados em contêineres para coleta seletiva de material biológico.

2.3 PREPARO DA MATRIZ TRIDIMENSIONAL DE COLÁGENO TIPO I

Para o preparo da matriz, 566 µl de colágeno tipo I derivado de cauda de rato (1,7 mg/mL, Gibco®) foram adicionados em tubo cônico, mantido em gelo e adicionado 100 µl de meio de cultura DMEM 10x e 100 µl de tampão de reconstituição (NaHCO₂ 0,26 M, HEPES 0,2 M). Foi utilizado NaOH 0,1 M para ajustar o pH (7.4), em seguida, foram adicionados 234

μL de PBS e homogeneizados suavemente para evitar formação de bolhas. A preparação foi sempre mantida em gelo. A partir dessa preparação foram adicionados 150 μL em poços provenientes de placas cultura. As placas foram incubadas a 37°C, por 30 min, para a polimerização do colágeno. Após este período foi preparado uma segunda camada de matriz contendo 566 μL de colágeno, 100 μL de meio DMEM 10x e 100 μL de tampão RB 10x. Também foi adicionado 234 μL de PBS contendo a concentração de 5×10^6 macrófagos peritoneais murinos. A solução foi homogeneizada suavemente e foi adicionado 200 μL da mesma sobre o gel polimerizado anteriormente. As células foram incubadas a 37°C por um período de 30 min para a polimerização do colágeno. Após este período, foi adicionado 1 mL de meio DMEM 1x com 10% de SBF às células e mantidas a 37° C por 24h.

2.4 AÇÃO DA CTX SOBRE MACRÓFAGOS MURINOS

2.4.1 Viabilidade celular

O MTT é um sal hidrossolúvel que é convertido em cristais de formazan hidrofóbicos pelas desidrogenases mitocondriais. Estes cristais são impermeáveis a membrana celular, onde se acumulam nas células vivas, podendo ser diluídos em DMSO (Fotakis & Timbrell, 2006). Desta forma, macrófagos foram cultivados como descrito no item 3.2.1, em placas de 24 poços e submetidos ao tratamento com concentrações de 0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8 e 9,6 $\mu\text{g/mL}$ de CTX. As células foram incubadas por 48 horas em meio DMEM e 10% SBF. Após este período, o sobrenadante foi retirado e as células lavadas com PBS. Logo após a lavagem, foi adicionado 0,5 mg/mL MTT diluído em PBS sendo, posteriormente, incubados à 37°C em atmosfera contendo 5% de CO_2 por 3 horas. Após o término da incubação, foi retirado o sobrenadante, lavado uma vez com PBS e adicionado 200 μL DMSO em cada poço para solubilização dos cristais de formazan e a placa foi incubada em agitação por 10 minutos. Posteriormente, a solução resultante foi lida por espectrofotometria a 570 nm. Como controle positivo, as células foram mortas com solução de 10% de formol em PBS.

2.4.2 Produção de ROS

Após 24 e 48h de tratamento nas concentrações de 0,3 a 9,6 $\mu\text{g/mL}$ de CTX, as células foram lavadas com PBS e incubadas com CellRox Green[®] (Life Technologies[™]) na concentração de 5 μM por 30 min em estufa a 37° C em atmosfera de 5% CO_2 . Em seguida a cultura foi novamente lavada com PBS e analisada em citômetro de fluxo FACsCanto II (BD[®])

e a intensidade de fluorescência foi calculada utilizando o software WinMDi.

2.5 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

2.5.1 Atividade antipromastigota

Os parasitos na fase logarítmica foram adicionados aos poços de cultura em uma concentração de 1×10^6 /mL. A CTX foi adicionada em concentrações de 0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8 e 9,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em placas de 24 poços. Foram retiradas alíquotas para contagem em câmara de Neubauer nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h após a adição da CTX. A contagem foi realizada em microscópio óptico Olympus BX41 para comparação do crescimento de parasitos tratados em diferentes concentrações da toxina em relação aos parasitos não tratados. Em todos os experimentos foi utilizado controle sem adição da CTX. Todos os testes foram realizados em triplicata. Como controle positivo foi utilizado Anfotericina B[®] (0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

2.5.2 Atividade anti-amastigota

Os macrófagos peritoneais de camundongos utilizados no ensaio foram obtidos como descrito no item 3.2.1. Para observar o efeito da CTX sobre as formas amastigotas no interior da célula hospedeira, os parasitos obtidos na fase estacionária de crescimento foram mantidos em contato com macrófagos na proporção de 10 parasitos por célula hospedeira, durante 3 horas à temperatura de 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

As células infectadas foram, posteriormente, tratadas com a CTX em concentrações de 2,4 e 4,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 e 48 horas. Após este período, as lamínulas contendo os macrófagos infectados foram lavadas com PBS pH 7,2 a temperatura ambiente, e fixadas com formaldeído 4% por 30 minutos. O fixador foi removido e as células lavadas com PBS e em seguida, as células foram coradas com Giemsa por 1h. Após este tempo, as lamínulas foram lavadas com água destilada e submetidas à desidratação em soluções contendo acetona e xilol em proporções crescentes até a adição de xilol puro. Ao final, as lamínulas foram montadas sobre lâmina de vidro utilizando *Entellan*® como meio de montagem e analisadas em microscópio óptico de campo claro Olympus BX41.

Foram contados 200 macrófagos por lamínula e o resultado foi demonstrado como índice fagocítico e de sobrevivência, o qual foi calculado da seguinte forma: [porcentagem de macrófagos com parasitas fagocitados] x [média do número de parasitas fagocitados por cada macrófago] e o índice de seletividade foi obtido através da razão do IC₅₀ de macrófagos tratados pelo IC₅₀ de amastigotas intracelulares.

2.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS APÓS TRATAMENTO COM CTX

2.6.1 Produção de Óxido Nítrico (NO) em macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*

Para a dosagem de NO, macrófagos infectados foram tratados nas concentrações de 2,4 e 4,8 µg/mL o sobrenadante da cultura foi coletado e o procedimento foi realizado utilizando-se o método de Griess, que consiste em adicionar 50 µL do reagente de Griess (Sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e Naphtylenediamina a 0,1 % em água destilada) a 50 µL do sobrenadante dos macrófagos tratados ou não com CTX, em diferentes períodos. A leitura foi feita por espectrofotometria sobre um comprimento de onda de 570 nm, e a concentração de nitrito foi expressa em µM de acordo com a curva padrão estabelecida.

2.6.2 Produção de prostaglandina E2 (PGE2) em macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*

Para avaliar a produção do sobrenadante de macrófagos infectados e posteriormente tratados com 2,4 e 4,8 µg/mL de CTX foi coletado 24 e 48h. Foi realizada dosagem de PGE2 utilizando o ensaio imunoenzimático Prostaglandin E2 competitive Biotrak[®] (GE Healthcare) e seguindo as instruções do fabricante. O resultado foi lido por espectrofotometria em um comprimento de onda de 450nm.

2.6.3 Detecção de corpos lipídicos em macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*

Os corpos lipídicos intracelulares apresentam como característica a presença de lipídios neutros em grande quantidade, sendo a sua dosagem possível através de um fluoróforo lipofílico (Bodipy[®] 493/503) por citometria de fluxo. Para a quantificação de corpos lipídicos em macrófagos infectados e posteriormente tratados com CTX, estas células foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* como descrito no item 3.6.2. Após 24h de tratamento na concentração de 2,4 µg/mL de CTX, o sobrenadante foi coletado e a cultura foi lavada com PBS, pH 7,2. As células foram incubadas com Bodipy[®] 493/503 (Molecular Probes Invitrogen[®]) na concentração de 10 µg/mL em PBS por 20 minutos, na ausência de luz. Após esta incubação, a cultura foi lavada e as células raspadas com auxílio de espátula de silicone, seguida da análise em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD[™] Bioscience). Os resultados

foram analisados utilizando o software WinMDI 2.9.

2.6.4 Quantificação de citocinas em macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*

A dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, INF- γ , TNF, IL17A, IL-10 foi realizada a partir dos sobrenadantes de culturas de macrófagos infectados após o tratamento com CTX nas concentrações de 2,4 e 4,8 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas. Foi utilizado o kit BD Cytometric bead array (BD™ Bioscience), seguindo instruções do fabricante e analisados em citômetro de fluxo BD FACSCanto II. Os dados foram obtidos utilizando o software FACSDiva (BD Biosciences, USA) e a análise foi realizada utilizando software FCAP Array 3.0. Os resultados foram expressos em pg/mL calculados a partir da curva padrão.

2.6.5 Alterações morfológicas em macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*

a. Área celular

Análise das alterações na área celular foi realizada a partir de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e, posteriormente, tratados com 2,4 e 4,8 $\mu\text{g/mL}$ de CTX por 24h e 48h. As células infectadas foram processadas e coradas como no item 3.6.2. A medida e a análise das áreas foram realizadas usando o software ImageJ (National Institute of Health) como descrito por Sokol *et al.* (1987). Resumidamente, a medida da área foi realizada em 100 células de cada grupo experimental a partir de imagens obtidas por microscopia de campo claro com o auxílio de um microscópio Carl Zeiss Axiophot A1, em aumento de 1000x.

b. Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Macrófagos cultivados em matriz extracelular foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e, posteriormente, tratados com 2,4 e 4,8 $\mu\text{g/mL}$ de CTX por 2 horas e 30min para garantir a visualização da adesão do parasito à célula hospedeira. Após o tratamento, as células foram fixadas em solução de 2,5 % de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após a fixação, as células foram lavadas e pós-fixadas com solução contendo 1% tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio por 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada desidratação em série etanólica (Merck) crescente 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 - EMITECH) usando CO₂. O material foi fixado em suporte apropriado e metalizado com uma fina camada de ouro de aproximadamente 2 nm de espessura, usando o aparelho *Emitech K550-England*. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura LEO 1450VP.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando o GraphPad Prism 6. O teste usado foi a análise de variância, ANOVA e Teste t de Student, considerando significantes resultados com $p < 0,05$. Para o cálculo de IC50, foi utilizado o teste de regressão linear com auxílio do programa Microsoft Excel (2007).

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS TRATADOS COM CTX

Para avaliar a ação citotóxica da CTX nas células hospedeiras foi realizado o teste de MTT que tem como objetivo determinar a atividade mitocondrial das células, uma vez que as células não viáveis não metabolizam o MTT, enquanto que as células vivas formam uma solução colorimétrica lida por espectrofotometria. Os resultados obtidos mostraram que não foi observado citotoxicidade da CTX em macrófagos peritoneais nas concentrações de 0,3 a 9,6 $\mu\text{g/mL}$ após 48h de tratamento ($\text{IC}_{50} = 111,20 \mu\text{g/mL}$). Porém, foi observado que nas concentrações de 1,2; 2,4 e 4,8 $\mu\text{g/mL}$, os macrófagos tratados apresentaram uma maior atividade mitocondrial em comparação às células não tratadas (Figura 5).

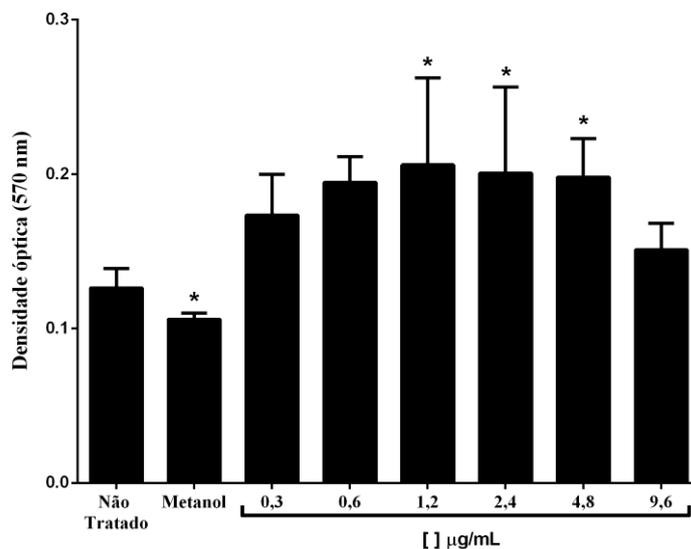


Figura 5. Viabilidade celular através do método MTT em macrófagos tratados com CTX por 48h. * $p < 0,05$. Notar o aumento da atividade mitocondrial após o tratamento.

3.2 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ROS POR MACRÓFAGOS TRATADOS COM CTX.

A produção de ROS por macrófagos é um importante mecanismo de combate a patógenos intracelulares, desta forma foi analisada a relação do tratamento com a CTX e a produção de ROS por macrófagos peritoneais. Através dos resultados obtidos por citometria de fluxo foi possível observar um aumento significativo na produção destes radicais em células tratadas com 2,4 e 4,8 $\mu\text{g/mL}$ de CTX após 24h (Figura 6A). Entretanto, após 48h de tratamento, não foi possível observar diferença significativa na produção de ROS entre as células tratadas

e o controle sem tratamento (Figura 6B). Porém foi possível observar uma diminuição na produção destes radicais na concentração de 9,6 $\mu\text{g/mL}$ após 48h de tratamento (Figura 6B).

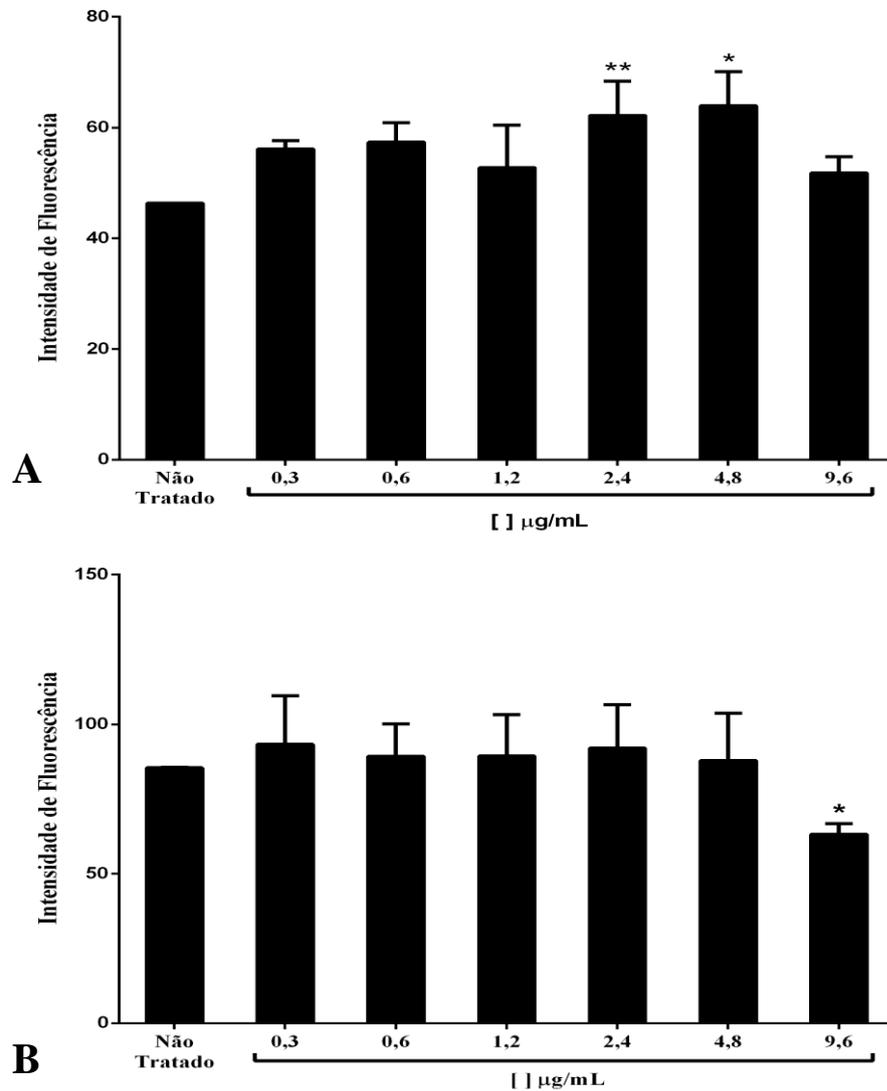


Figura 6. Gráfico da análise da produção de ROS em macrófagos tratados por 24 e 48h. A – Intensidade de fluorescência de células tratadas por 24h com CTX. B – Intensidade de fluorescência de células tratadas por 48h. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA DE CTX

Os parasitos tratados com CTX por 24, 48, 72 e 96h nas concentrações de 1,2 – 4,8 $\mu\text{g/mL}$ foram contadas em câmara de Neubauer para se determinar a ação tóxica desta substância sobre formas promastigotas. Foi observado que após 96 h de tratamento, foi possível observar uma redução de aproximadamente 32% no número de parasitos na concentração de 1,2 $\mu\text{g/mL}$ e apresentando um IC_{50} de 22,86 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7).

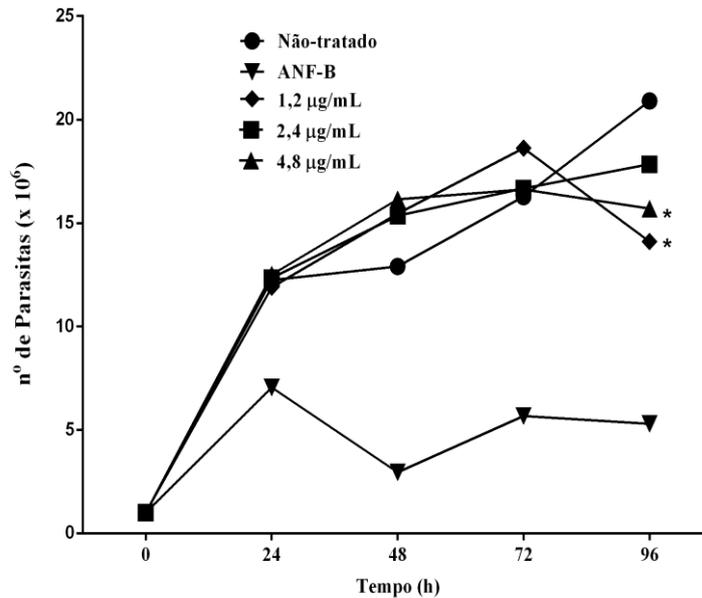


Figura 7. Atividade antipromastigota de CTX após 96 horas de tratamento. Observa-se a diferença significativa no crescimento entre as promastigotas não tratadas e os parasitas tratados com 1,2 e 4,8 µg/mL. * $p < 0,05$; ANF-B – tratados com anfotericina B[®] a 0,8 µg/mL.

3.4 ATIVIDADE ANTIAMASTIGOTA

Para analisar se a CTX estimula a fagocitose de *L. amazonensis* por macrófagos murinos, o índice fagocítico foi calculado através das culturas de macrófagos infectados com o parasito e tratados com CTX nas concentrações de 2,4 e 4,8 µg/mL por 24 horas. O tratamento das células com 2,4 µg/mL resultou no aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos (2,85 vezes maior, $\pm 0,01$) quando comparada ao grupo controle não tratado (Figura 8 A1-A3). Entretanto, com a continuidade do tratamento com CTX por 48h, nas mesmas concentrações citadas, os macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com CTX, foram capazes de eliminar as amastigotas intracelulares, uma vez que o índice de sobrevivência dos parasitos foi reduzido significativamente apresentando IC₅₀ de 2,28 µg/mL (4,0 vezes menor, $\pm 2,47$, quando tratado com 2,4 µg/mL; e 5,33 vezes menor, $\pm 0,29$, quando tratado com 4,8 µg/mL) quando comparado às células hospedeiras que estavam infectadas, porém não foram tratadas, apresentando um índice de seletividade (SI) de 48 (Figura 8 B1-B3).

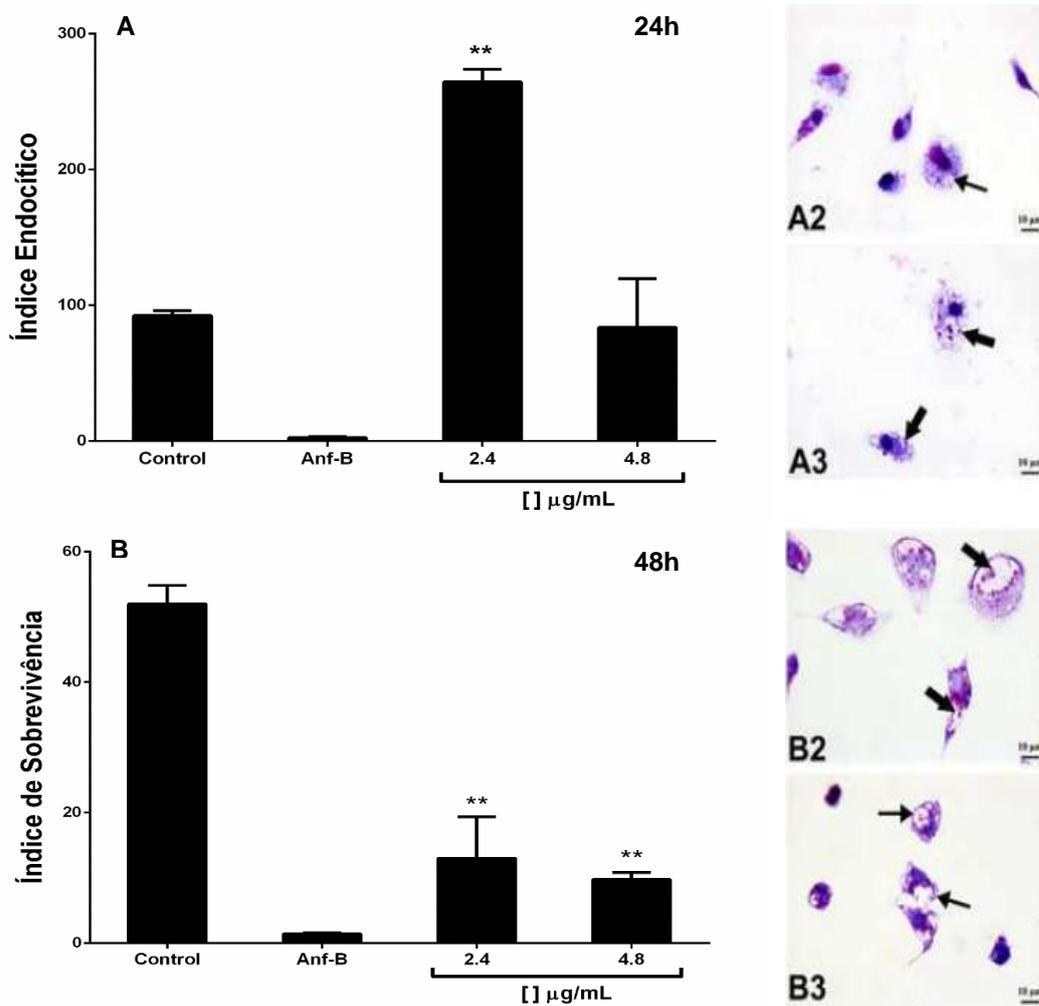


Figura 8. Macrófagos foram infectados com *L. amazonensis* e tratados com CTX por 24h (A) e 48h (B). A1: Índice fagocítico de células hospedeiras que foram tratadas com CTX por 24h. Notar a diferença significativa na fagocitose após o tratamento com 2,4 $\mu\text{g/mL}$ de CTX. A2 e A3: Coloração por Giemsa de macrófagos infectados (CTL) e macrófagos infectados e tratados com 2,4 $\mu\text{g/mL}$ de CTX, respectivamente. Notar a grande quantidade de parasitas no interior dos macrófagos (setas). B1: Índice de sobrevivência de parasitos após tratamento com CTX por 48h. B2 e B3: Coloração por Giemsa de macrófagos infectados (CTL) e macrófagos infectados e tratados com 2,4 $\mu\text{g/mL}$ de CTX, respectivamente. ** $p < 0,01$.

3.5 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

3.5.1 Área celular

Após a infecção dos macrófagos com promastigotas de *L. amazonensis* e o tratamento com CTX na concentração de 2,4 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas, foi possível observar um aumento significativo da área celular em macrófagos tratados (1,21 vezes maior, $\pm 0,91$) quando comparados àqueles infectados, porém sem tratamento com CTX (Figura 9).

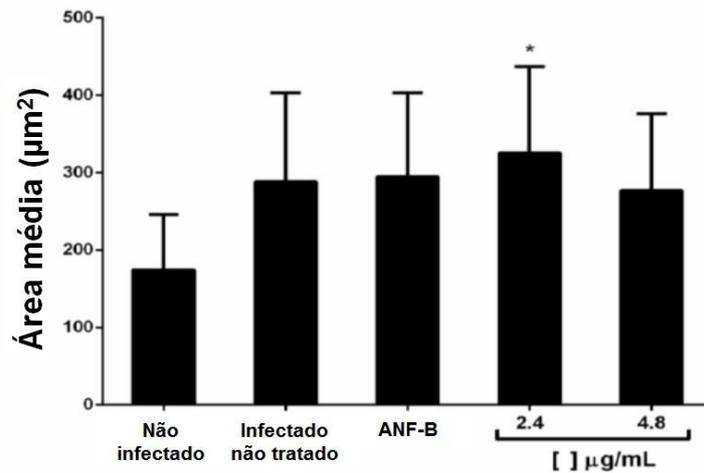


Figura 9. Análise morfométrica demonstrando o aumento significativo da área média de macrófagos após a infecção com *L. amazonensis* e tratamento com 2,4 µg/mL de CTX. * $p < 0,05$.

3.5.2 Morfologia de formas promastigotas e macrófagos por MEV em matriz de colágeno

Ao analisar a interação após o tratamento com CTX, foi observado também como estas células se comportariam quando co-cultivadas em ambiente que mimetizasse as condições próximas às encontradas *in vivo*. Assim, foi realizada a co-cultura de *L. amazonensis* e macrófagos peritoneais e tratados com 2,4 e 4,8 µg/mL por 2 h e 30 min. É possível observar que nos grupos tratados com 2,4 (Figura 10B) e 4,8 µg/mL (Figura 10C) da CTX, aparentemente ocorre uma maior concentração de parasitos interagindo com os macrófagos, quando comparados ao grupo controle que não recebeu tratamento (Figura 10A).

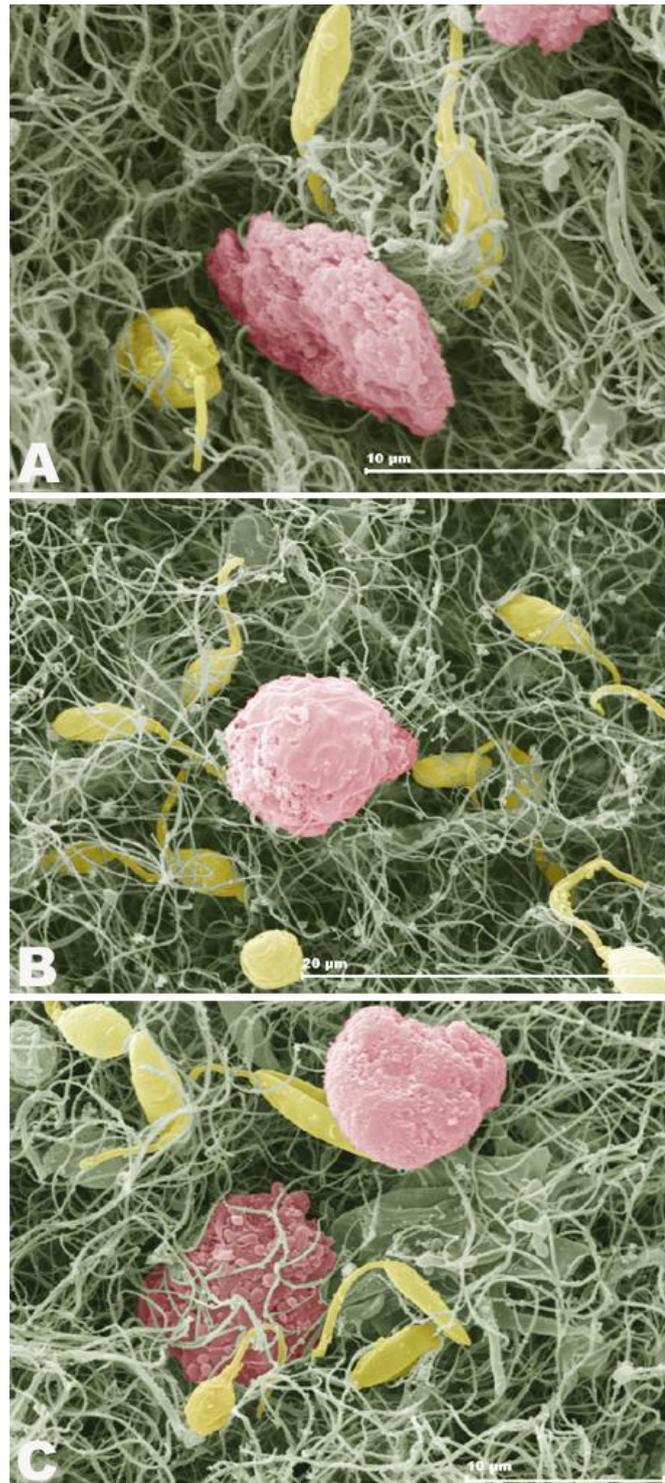


Figura 10. Microscopia Eletrônica de Varredura de co-cultivo em matriz de colágeno de *L. amazonensis* e macrófagos peritoneais murinos pelo período de 2h e 30 min. **A** – Co-cultura controle, não tratada com CTX. **B** – Interação tratada com 2,4 µg/mL de CTX. **C** – Células tratadas com 4,8 µg/mL de CTX. Notar o grande número de promastigotas interagindo com macrófagos em **B** e **C**.

3.6 PERFIL DE ATIVAÇÃO MACROFÁGICA

3.6.1 Produção de NO

A produção de NO também foi analisada em macrófagos infectados, uma vez que é conhecido na literatura que *L. amazonensis* apresenta um efeito inibitório na produção de NO em macrófagos. No grupo controle positivo, os macrófagos foram estimulados com LPS (2 µg/mL). Porém, foi possível observar que a CTX foi capaz de reverter o efeito inibitório causado pelo parasito nas concentrações de 2,4 e 4,8 µg/mL após 24 h de tratamento, com o aumento significativo da produção de NO nestas células (1,17 vezes maior, $\pm 0,12$ quando tratado com 2,4 µg/mL e 1,41 vezes maior, $\pm 0,23$ quando tratado com 4,8 µg/mL, respectivamente) comparado ao grupo controle que foi infectado, porém não foi tratado com CTX (Figura 11).

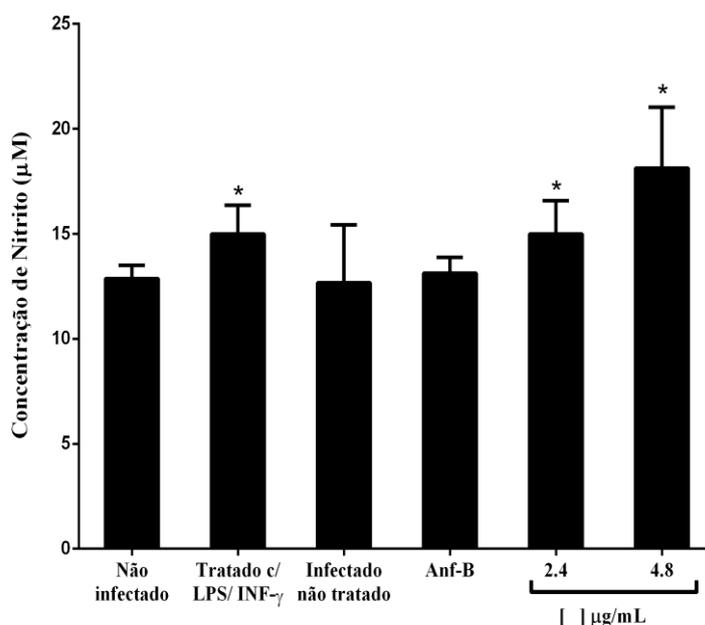


Figura 11. Concentração de nitrito em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com CTX. É possível observar uma concentração elevada de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos tratados com 2,4 e 4,8 µg/mL de CTX quando comparados aos grupos controles negativos. LPS e INF- γ foram utilizados como controles positivos. * $p < 0,05$.

3.6.2 Perfil de citocinas

A secreção de citocinas por macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com CTX foi analisada usando o sobrenadante das culturas. Os resultados obtidos por citometria de fluxo mostraram um aumento significativo das citocinas IL-6 e TNF- α em macrófagos tratados com 2,4 µg/mL (5,5 vezes maior para IL-6 e 6,9 vezes maior para TNF- α) e 4,8 µg/mL (6,4

vezes maior para IL-6; e 7,1 vezes maior para TNF- α) quando comparados às células do grupo controle infectados, porém sem o tratamento com CTX (Figura 12A e 12B).

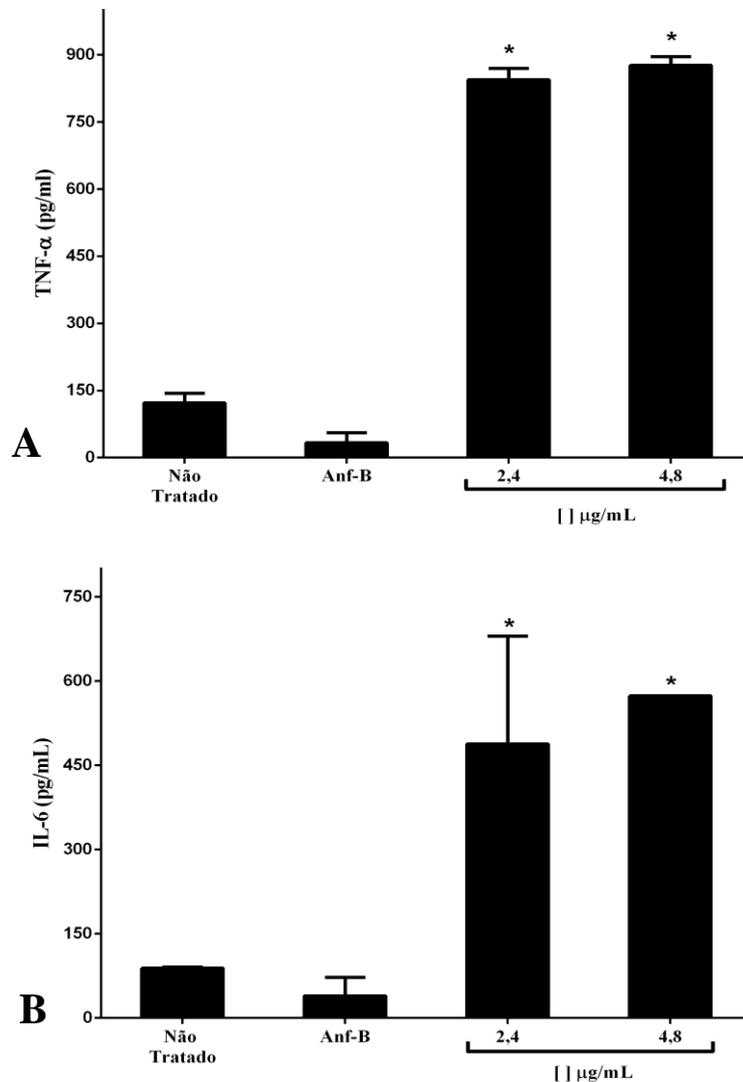


Figura 12 – Concentração de citocinas em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com CTX. Notar o aumento da produção de citocinas por macrófagos infectados após o tratamento nas concentrações de 2,4 e 4,8 μ g/mL de CTX por 24 horas. (A) Dosagem de TNF- α . (B) Dosagem de IL-6. **Anf-B** – Anfotericina B como controle de tratamento. * $p < 0,05$.

3.6.3 Produção de Prostaglandina E2 (PGE2)

Para avaliar a ação da CTX na estimulação do processo inflamatório, foi realizada a dosagem de PGE2 no sobrenadante das culturas infectadas com *L. amazonensis* e tratadas com 2,4 e 4,8 μ g/mL de CTX por 48h. A figura 13 demonstra a concentração de PGE2 nos grupos experimentais e é possível observar que nos grupos tratados com CTX ocorre um aumento significativo da produção deste eicosanoide, quando comparado à cultura infectada, porém sem

o tratamento com a toxina. Como controle positivo para a estimulação da resposta inflamatória, foram utilizados LPS e INF- γ , que também apresentaram grande produção de PGE2.

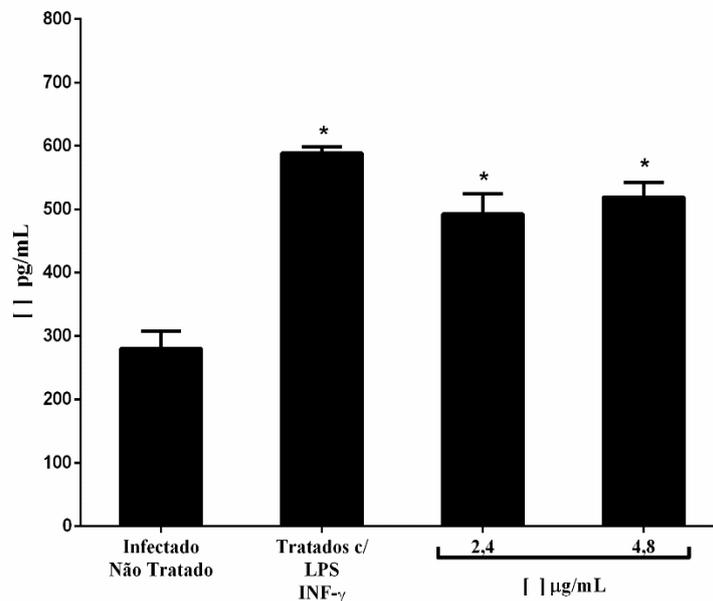


Figura 12. Gráfico da produção de PGE2 no sobrenadante de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com CTX por 48h. Notar o aumento significativo tanto no tratamento com 2,4 μ g/mL quanto em 4,8 μ g/mL. * $p < 0,05$.

3.6.4 Formação de corpos lipídicos

Uma vez que produção de PGE2 se apresentou aumentada após o tratamento com CTX, foi analisado se esta toxina estimulava a produção de corpos lipídicos durante os momentos iniciais da interação macrófago-*Leishmania* e também em sua menor concentração efetiva. Assim, foi avaliado a partir da intensidade de fluorescência, obtida por citometria de fluxo, a formação destas organelas durante a interação parasita-célula hospedeira utilizando o período e a concentração na qual a CTX apresentou resultados mais significativo ao decorrer do trabalho, isto é, após 24 horas de tratamento e utilizando 2,4 μ g/mL da toxina. Foi observado que esta substância é capaz de induzir o aumento significativo na formação dos corpos lipídicos nas células infectadas com *L. amazonensis*. Como controle para o tratamento, foi utilizada anfotericina B, a qual não se mostrou eficaz em estimular a formação desta organela (Figura 14).

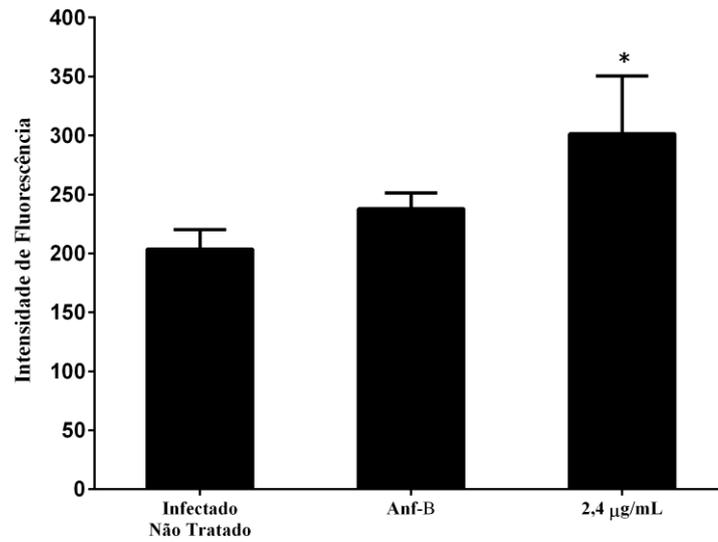


Figura 13. Gráfico da intensidade fluorescência por citometria de fluxo que representa a formação de corpos lipídicos durante a interação macrófago – *Leishmania*. Notar o aumento significativo da formação de organelas lipídicas no grupo tratado com CTX. * $p < 0,05$.

4 DISCUSSÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa negligenciada e as terapias atuais para o combate à doença apresentam diversas desvantagens, como a alta toxicidade e o aumento de casos de resistência pelos parasitas a estas substâncias dificultando o tratamento e levando ao mau prognóstico da doença (Adade *et al.*, 2014).

Durante a infecção pelo protozoário *Leishmania*, os macrófagos e os neutrófilos são rapidamente recrutados ao local da infecção. Durante a resposta inflamatória inicial, os neutrófilos são as primeiras células a responderem à infecção, seguidos dos macrófagos, consideradas a célula hospedeira ideal para o desenvolvimento do parasito. Os neutrófilos infectados sofrem apoptose, induzindo a sua fagocitose pelos macrófagos e transferindo o protozoário posteriormente a esta célula (Podinovskaia & Descoteaux, 2015). Desta forma, a investigação de novas substâncias que apresentem potencial para aprimorar a capacidade destes macrófagos em eliminar os parasitos através da modulação da resposta imune e, ainda induzir a produção de agentes microbicidas, que são muito importantes para o controle da sobrevivência destes protozoários intracelulares.

Diversas substâncias derivadas de animais são sugeridas como alternativas para o tratamento da leishmaniose. Dentre estes componentes, as toxinas originadas de animais como escorpiões, aranhas, abelhas e principalmente de serpentes, são conhecidas por apresentarem potentes agentes medicinais (Adade *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2015; Bhattacharya *et al.*, 2013; Borges *et al.*, 2006). Dentre estes agentes, podemos destacar a crotoxina, que é o principal agente neurotóxico do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. Apesar do potencial terapêutico destas substâncias, poucos trabalhos na literatura descrevem o uso da CTX no combate ao protozoário *Leishmania* ou durante a interação com a sua célula hospedeira.

No presente trabalho foi possível observar que ao se utilizar baixas concentrações de CTX em macrófagos peritoneais de camundongos, os mesmos não apresentaram dano celular apesar da CTX, quando presente no veneno bruto de serpentes, promover efeitos neurotóxicos. Passero *et al.* (2007) ao utilizarem a CTX derivada de *C. d. cascavella*, também observaram que esta substância não apresentava ação tóxica em macrófagos J774 em concentrações de até 100 µg/poço. Entretanto, Han *et al.* (2014), estudando os efeitos da CTX derivadas de *C. d. terrificus* sobre células humanas de carcinoma pulmonar, mostraram que a toxicidade foi dose dependente e maior com o decorrer do tempo de tratamento, porém em baixas concentrações não apresentaram alterações, similar ao encontrado no presente estudo. Estas observações são evidências da capacidade da CTX em atuar de diferentes formas de acordo com a célula alvo e

a concentração utilizada.

Durante a análise da atividade mitocondrial pelo método de MTT, foi observada uma interessante alteração no metabolismo da mitocôndria nas células tratadas com CTX, onde estas apresentaram um aumento significativo na formação de cristais de formazana, indicando elevada atividade nesta organela. Para avaliar se esta alteração mitocondrial nas células tratadas poderia estar influenciando em algum processo microbicida do macrófago, foi realizada a quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) após o tratamento com CTX. O resultado obtido foi interessante, uma vez que as células tratadas por 24h com CTX, apresentaram um aumento significativo na produção de ROS. Entretanto, após 48h de tratamento, não foi observada diferença, e ainda foi possível detectar que utilizando a maior concentração de CTX, houve uma diminuição da produção de ROS pelas células. Sabendo que estas moléculas atuam de forma determinante no estresse oxidativo, este resultado indica que a CTX está estimulando a ação microbicida do macrófago, porém, após o tratamento prolongado e uma dosagem elevada, ocorre um *feedback* negativo, diminuindo a concentração de ROS produzido por esta célula.

Resultados semelhantes obtidos por Costa *et al.* (2013) demonstraram que houve um aumento na produção de H₂O₂ em macrófagos co-cultivados com células cancerígenas e tratados com CTX de *Cdt.* Paiva *et al.* (2011), utilizando uma fração do veneno da serpente *Bothrops atrox*, também observaram que esta foi capaz de induzir a produção de H₂O₂ em polimorfonucleares de sangue periférico humano, aumentando a sua capacidade microbicida frente aos patógenos. Assim como Bhattacharya *et al.* (2013), ao estudarem o efeito imunomodulador *ex vivo* do veneno bruto da serpente *Bungarus caeruleus* em esplenócitos de camundongos, observaram um grande aumento da produção de ROS nestas células após o tratamento do animal. Estas pesquisas indicam o elevado potencial imunomodulador das substâncias derivadas de venenos de serpentes, como a CTX, especialmente no combate a doenças infecciosas anérgicas.

Como foi observado no presente estudo, a CTX apresenta uma participação importante na modulação da resposta microbicida do macrófago, e por esta razão também foi analisada a ação desta toxina sobre o protozoário *Leishmania*, avaliando a sua taxa de crescimento em formas promastigotas, que foram tratadas com CTX por quatro dias, e amastigotas após a interação com macrófagos e tratados por 48h. Como resultado foi observado que esta substância reduziu o crescimento em 32% de promastigotas, apresentando um IC₅₀ de 22,86 µg/mL. Também foi observado que a capacidade do macrófago em eliminar as amastigotas intracelulares foi aumentada em quase três vezes após o tratamento com CTX (IC₅₀ = 2,28

µg/mL) apresentando um índice de seletividade > 1 , indicando que a toxina atua seletivamente contra as formas promastigotas. Estes resultados podem ser comparados aos de Passero *et al.* (2007) que, utilizando CTX derivada de *C. d. cascavella*, não observaram resultados expressivos ao realizar o tratamento em promastigotas de *L. amazonensis*, apresentando um IC₅₀ muito elevado (99,80 µg/mL), porém, ao utilizar o veneno bruto de *C. d. terrificus*, o mesmo apresentou uma potente atividade leishmanicida, com o IC₅₀ de 4,7 µg/mL, indicando que a fonte de obtenção da CTX é um fator importante a ser considerado para avaliação da atividade leishmanicida.

Outros estudos demonstraram ação leishmanicida de componentes do veneno bruto de serpentes, como o trabalho de Nunes *et al.* (2013), que ao testarem a PLA2 derivada do veneno da serpente *Bothrops pauloensis* observaram que esta substância apresentava tanto uma ação antipromastigota (IC₅₀ 58.7 µg/mL), quanto a capacidade de eliminar amastigotas axênicas. Entretanto, a PLA2 apresentou-se tóxica aos macrófagos peritoneais com um IC₅₀ de 5,6 µg/mL da toxina, o que inviabiliza a utilização desta substância em estudos *in vivo* na concentração que apresente atividade leishmanicida. Por outro lado, Adade *et al.* (2014) observaram que a crovirina, uma proteína componente do veneno de *Crotalus viridis viridis* conseguiu inibir o crescimento de amastigotas de *L. amazonensis*, no interior de macrófagos, com um IC₅₀ de 1,05 µg/mL, porém esta mesma proteína não apresentou ação inibitória sobre o crescimento de promastigotas deste protozoário.

Estes estudos evidenciam que, apesar de outras toxinas apresentarem ação leishmanicida, algumas ainda são muito tóxicas à célula do hospedeiro, ou atuam somente sobre uma das formas evolutivas do parasita, enquanto que a CTX derivada de *Cdt*, no presente estudo, não demonstrou ação citotóxica e apresentou ação leishmanicida em ambas as formas do protozoário. Outro aspecto importante avaliado neste trabalho foram as alterações morfológicas que a CTX promoveu nos macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Dentre estas alterações, foi observado que macrófagos tratados com CTX por 24 horas apresentaram um espriamento celular 1,21 vezes maior quando comparados àqueles não tratados, sugerindo alteração em sua morfologia, indicativa de ativação celular. Sampaio *et al.* (2006) demonstraram que ao tratar macrófagos de ratos com CTX derivada de *Cdt* foi possível observar um aumento de projeções citoplasmáticas quando comparado a macrófagos residentes não tratados. Os autores ainda sugerem que estas alterações podem estar relacionadas ao aumento da capacidade fagocítica do macrófago após o tratamento com CTX.

Este aumento da fagocitose foi observado no presente trabalho através da interação dos macrófagos murinos com promastigotas de *L. amazonensis*, tratados por 24 horas com CTX.

Ao avaliar os resultados, foi possível observar que a CTX aumentou cerca de três vezes a capacidade dos macrófagos fagocitarem os parasitas em relação àquelas células não tratadas. Por outro lado, outros autores observaram uma ação inibitória da CTX (Sampaio *et al.*, 2003, 2006a, 2006b). Entretanto, vale ressaltar que estes estudos avaliaram a ação da CTX em macrófagos residentes, ou seja, células que não entraram em contato com patógenos ou outras células.

Assim, é possível inferir que, ao incubar macrófagos com parasitos, possam ocorrer ativação de vias distintas que deflagraram ações fagocíticas e microbidas, levando a um aumento da capacidade fagocítica e consequente eliminação dos mesmos. Diferentes receptores podem estar relacionados ao processo de fagocitose de patógenos e estes podem ser modulados de acordo com as condições inflamatórias da célula (Podinovskaia & Descoteaux, 2015; Ueno & Wilson, 2012).

Setubal *et al.* (2011), usando o veneno bruto e toxinas obtidas de *Bothrops alternatus*, demonstraram aumento na capacidade fagocítica de macrófagos tratados ao interagirem estas células com zymosan. Resultados similares foram encontrados por Furtado *et al.* (2014) quando macrófagos J774A.1 foram tratados com PLA2 extraída do veneno de *Bothrops atrox* que também apresentaram aumento na atividade fagocítica de partículas de zymosan. Entretanto, Macedo *et al.* (2015) ao estudarem os efeitos da crotamina, derivada do veneno bruto de *Cdt*, não observaram nenhum efeito leishmanicida após o tratamento de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* com até 100 µg/mL da substância. Estes fatos demonstram que a alta capacidade dos macrófagos fagocitarem os parasitos, induzida pela CTX, observada neste trabalho após 24 horas, e a destruição destas amastigotas após 48 horas de tratamento, pode estar relacionada a uma efetiva resposta imune do hospedeiro.

A interação inicial entre a célula hospedeira e promastigotas de *L. amazonensis* também foi avaliada neste trabalho. Para isto os macrófagos foram cultivados em matriz extracelular de colágeno e incubados com promastigotas de *Leishmania* por um curto período, para demonstrar os momentos iniciais do processo de interação. Foi observado que em culturas tratadas com CTX a quantidade de promastigotas interagindo com as células foi aparentemente maior quando comparado ao controle sem tratamento. Petropolis *et al.* (2014) demonstraram que a interação macrófago-*Leishmania* através de uma matriz de colágeno tipo I é capaz de aproximar da escala real, a infecção pelo parasita. Estes autores ainda demonstraram que a presença do macrófago nesta matriz estimula a migração dos protozoários, diminuindo em até 50% do tempo de migração das promastigotas.

Estudos demonstram que os parasitas da espécie *L. amazonensis* apresentam a

capacidade de suprimir a resposta microbicida da sua célula hospedeira (Balestieri *et al.*, 2002; Pereira & Alves, 2008). Entretanto, no presente trabalho, a CTX conseguiu reverter este processo anérgico provocado pelo protozoário, através das alterações observadas na morfologia, na capacidade de fagocitose e na eliminação de parasitas intracelulares pela célula hospedeira. Para entender de que forma a CTX foi capaz de modular a resposta imune do hospedeiro, foram analisadas a produção de óxido nítrico (NO), citocinas, prostaglandina E2 (PGE2) e a formação de corpos lipídicos.

Após o tratamento das células infectadas com *L. amazonensis*, foi observado o aumento significativo da produção de NO após 24 horas da administração de CTX, indicando a reversão da ação inibitória que a *L. amazonensis* exerce sobre macrófagos. Faiad (2012) demonstrou que a produção de NO por macrófagos derivados de ratos tratados com CTX, foi 77% maior quando comparados à produção por células de animais que não receberam o tratamento. Resultados similares foram observados por Costa *et al.* (2013), ao utilizarem a CTX como imunomodulador no combate a células cancerígenas. Estes autores observaram um aumento de 28% na produção de NO em comparação à co-cultura não tratada. Estes resultados demonstram a dualidade da ação da CTX sobre macrófagos durante a resposta imunológica.

Ao observar o perfil de citocinas produzidas pelas células infectadas com *L. amazonensis* e, posteriormente, tratadas com CTX, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o tratamento estimulou a produção das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α . A IL-6 está principalmente associada ao desenvolvimento e a multiplicação de células T_h17, as quais irão produzir IL-17 que é um importante fator recrutador de polimorfo-nucleares para o local da infecção (Mosser & Edwards, 2009). Enquanto que o TNF- α indica a ativação da célula, geralmente através de receptores Toll-like e está associado à produção de INF- γ (Liu *et al.*, 2014; Mosser, 2003).

A modulação da resposta do macrófago no combate à *Leishmania*, provocada pela CTX, indica um perfil de ativação clássica *M1* desta célula, que é caracterizada pelo aumento da produção de NO e ROS, além de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e o TNF- α que foram observadas neste estudo (Cassado *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014). Além das alterações bioquímicas, as mudanças morfológicas, características do perfil *M1* de ativação, como o espriamento celular e o aumento de projeções citoplasmáticas se tornam evidentes nestas células (Cassado *et al.*, 2011).

Outros fatores relacionados à imunomodulação do macrófago provocada pela CTX foram avaliados neste trabalho, como a produção de PGE2 e a formação de corpos lipídicos pelas células infectadas com *L. amazonensis*. Foi observado que após o tratamento, as células

infectadas com o parasito apresentaram aumento significativo na produção de PGE2, tal qual foi observado no grupo controle positivo, onde foram utilizados LPS e INF- γ . Resultados similares foram obtidos por Moreira et al., 2008 que ao utilizarem PLA2, derivada de *Cdt*, em macrófagos peritoneais, também observaram aumento na produção de PGE2. Estes resultados demonstram a capacidade da CTX de estimular a reação inflamatória do macrófago, o que é benéfico no combate à infecção por *L. amazonensis*.

A produção de PGE2 está intrinsicamente ligada à formação de corpos lipídicos, uma vez que, no interior destas organelas a PLA2 atua na via metabólica do ácido araquidônico que, através de enzimas como a ciclooxigenase (COX), formam eicosanoides como a PGE2 que vão ser liberadas para atuar na resposta inflamatória (Araújo-Santos *et al.*, 2014; Rodriguez *et al.*, 2013). Neste estudo foi observado que macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com CTX foram capazes de produzir mais corpos lipídicos quando comparados àqueles infectados, porém que não receberam o tratamento. Este aumento na formação de corpos lipídicos indica que a CTX estimula o metabolismo inflamatório do macrófago, fornecendo mecanismos microbicidas para a resposta imune. Furtado *et al.* (2014) ao estudarem o efeito da PLA2 derivada de serpente *Bothrops atrox* observaram que após o tratamento de macrófagos, que haviam realizado fagocitose, a produção de corpos lipídicos aumentou significativamente em comparação àqueles que não haviam recebido o tratamento.

Desta forma, os resultados aqui apresentados mostraram que a CTX consegue reverter a ação inibitória do protozoário *Leishmania*, estimulando a célula hospedeira a eliminar o parasito através de mecanismos microbicidas. Portanto, CTX parece apresentar um grande potencial terapêutico no combate à leishmaniose, principalmente quando causada por *L. amazonensis*, que é responsável pelo perfil clínico da doença mais desafiador às terapias atuais.

5 CONCLUSÃO

- A CTX demonstrou atividade antipromastigota e anti-amastigota;
- Macrófagos tratados com CTX apresentaram alta atividade mitocondrial com produção elevada de ROS;
- A CTX estimulou o espraio celular em macrófagos infectados com *L. amazonensis*;
- Os macrófagos tratados com CTX apresentaram aumento na capacidade fagocítica durante a interação com *L. amazonensis*;
- A CTX foi capaz de reverter a inibição da produção de NO em macrófagos infectados com *L. amazonensis*;
- Durante a interação em matriz extracelular, macrófagos tratados com CTX apresentaram maior interação com promastigotas de *L. amazonensis*.
- A CTX estimulou a produção de citocinas inflamatórias em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, indicando mais uma evidência da capacidade desta toxina em reverter os efeitos inibitórios provocados pelo parasita.
- Macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com CTX apresentaram aumento na produção de PGE2 e aumento na formação de corpos lipídicos, indicando a ativação do perfil inflamatório desta célula.
- A CTX foi capaz de promover a polarização dos macrófagos a um perfil M1, caracterizado pela ação inflamatória, demonstrando que esta substância apresenta um potencial terapêutico para doenças anérgicas como a leishmaniose tegumentar causada por *L. amazonensis*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T.; ALEMÁ, S.; MILEDI, R. Isolation and characterization of presynaptically acting neurotoxins from the venom of *Bungarus* snakes. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. **80**, n. 1, p. 1–12, 1977.
- ADADE, C. M.; CARVALHO, A. L. O.; TOMAZ, M. A.; COSTA, T. F. R.; GODINHO, J. L.; MELO, P. A.; LIMA, A. P. C. A.; RODRIGUES, J. C. F.; ZINGALI, R. B.; SOUTO-PADRÓN, T. *Crovirin*, a Snake Venom Cysteine-Rich Secretory Protein (CRISP) with Promising Activity against Trypanosomes and *Leishmania*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. **8**, n. 10, p. e3252, 2014.
- ADADE, C. M.; OLIVEIRA, I. R. S.; PAIS, J. A. R.; SOUTO-PADRÓN, T. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. **69**, p. 227–39, 2013.
- ALMEIDA, C. D. S.; ANDRADE-OLIVEIRA, V.; CÂMARA, N. O. S.; JACYSYN, J. F.; FAQUIM-MAURO, E. L. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* is able to down-modulate the acute intestinal inflammation in mice. **PLoS one**, v. **10**, n. 4, p. e0121427, 2015.
- ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; COURRET, N.; LANG, T. *Leishmania* spp.: On the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. **Advances in Parasitology**, 2004.
- ARAÚJO, F. A. A. .; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. . Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. *In: Animais Peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes*. 2a Ed. ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2003. .
- ARAÚJO-SANTOS, T.; RODRÍGUEZ, N. E.; PONTES, S. M.; DIXT, U. G.; ABÁNADES, D. R.; BOZZA, P. T.; WILSON, M. E.; BORGES, V. M. Role of prostaglandin F2 α production in lipid bodies from *Leishmania infantum chagasi*: insights on virulence. **The Journal of infectious diseases**, v. **210**, p. 1–11, 2014.
- ARCANJO, A. F.; LAROCQUE-DE-FREITAS, I. F.; ROCHA, J. D. B.; ZAMITH, D.; COSTA-DA-SILVA, A. C.; NUNES, M. P.; MESQUITA-SANTOS, F. P.; MORROT, A.; FILARDY, A. A.; MARIANO, M.; BANDEIRA-MELO, C.; DOSREIS, G. A.; DECOTE-RICARDO, D.; FREIRE-DE-LIMA, C. G. The PGE2/IL-10 Axis Determines Susceptibility of B-1 Cell-Derived Phagocytes (B-1CDP) to *Leishmania major* Infection. **Plos One**, v. **10**, n. 5, p. e0124888, 2015.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. **30**, n. 12-13, p. 1269–1281, 2000.
- BALESTIERI, F. M. P.; QUEIROZ, A. R. P.; SCAVONE, C.; COSTA, V. M. A.; BARRAL-NETTO, M.; ABRAHAMSOHN, I. D. A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes and Infection**, v. **4**, n. 1, p. 23–29, 2002.
- BAÑULS, A.-L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. p. 1–458, 2007.
- BASANO, S. DE A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico,

epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328–337, 2004.

BASHIR, S.; SHARMA, Y.; ELAHI, A.; KHAN, F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. **Inflammation Research**, v. 65, n. 1, p. 1–11, 2016.

BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R. A. M.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1063–1075, 2007.

BHATTACHARYA, S.; GHOSH, P.; DE, T.; GOMES, A.; GOMES, A.; DUNGDUNG, S. R. In vivo and in vitro antileishmanial activity of *Bungarus caeruleus* snake venom through alteration of immunomodulatory activity. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 126–133, 2013.

BORGES, A.; SILVA, S.; OP DEN CAMP, H. J. M.; VELASCO, E.; ALVAREZ, M.; ALFONZO, M. J. M.; JORQUERA, A.; SOUSA, L. DE; DELGADO, O. In vitro leishmanicidal activity of *Tityus discrepans* scorpion venom. **Parasitology research**, v. 99, n. 2, p. 167–73, 2006.

BRASIL. **Manual Vigilância Controle da Leishmaniose Visceral**. [s.l.: s.n.].

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Serie A. Normas e Manuais Técnicos. 2 ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2007. 180 p.** [s.l.: s.n.].

BRASIL, M. DA S. S. N. DE A. B. DE S. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. [s.l.: s.n.].

CALVOPINA, M.; ARMIJOS, R. X.; HASHIGUCHI, Y. Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: Current status of knowledge - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 7, p. 663–672, 2004.

CASSADO, A. D. A.; ALBUQUERQUE, J. A. T. DE; SARDINHA, L. R.; BUZZO, C. D. L.; FAUSTINO, L.; NASCIMENTO, R.; GHOSN, E. E. B.; LIMA, M. R. D.; ALVAREZ, J. M. M.; BORTOLUCI, K. R. Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e22141, 2011.

CASSADO, A. DOS A. **Heterogeneidade Dos Macrófagos**. [s.l.] Tese (Doutorado em Ciências) - São Paulo, Universidade de São Paulo, 2011.

CASTELLANO, L. R. C. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão Anti-*Leishmania* immune response and evasion mechanisms. **Parasite**, 2005.

COSTA, E. S.; FAIAD, O. J.; LANDGRAF, R. G.; FERREIRA, A. K.; BRIGATTE, P.; CURI, R.; CURY, Y.; SAMPAIO, S. C. Involvement of formyl peptide receptors in the stimulatory effect of crotoxin on macrophages co-cultivated with tumour cells. **Toxicon**, v. 74, p. 167–178, 2013.

DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 511–523, 2015.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DONATO, N. J.; MARTIN, C. A.; PEREZ, M.; NEWMAN, R. A.; VIDAL, J. C.; ETCHEVERRY, M. Regulation of epidermal growth factor receptor activity by crotoxin, a snake venom phospholipase A2 toxin: A novel growth inhibitory mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. **51**, n. 11, p. 1535–1543, 1996.

DUNAND, C.; CRÈVECOEUR, M.; PENEL, C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in. **New Phytologist**, 2006.

FAIAD, O. J. **Efeito da Crotoxina Sobre Função e o Metabolismo de Glicose e Glutamina de Macrófagos Durante a Progressão Tumoral**. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Ciências) - São Paulo, Universidade de São Paulo, 2012.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. **160**, n. 2, p. 171–177, 2006.

FURTADO, J. L.; OLIVEIRA, G. A.; PONTES, A. S.; SETÚBAL, S. D. S.; XAVIER, C. V.; LACOUTH-SILVA, F.; LIMA, B. F.; ZAQUEO, K. D.; KAYANO, A. M.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P. Activation of J77A.1 macrophages by three phospholipases A2 isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **BioMed Research International**, v. **2014**, n. i, p. 13, 2014.

GARCÍA-ALMAGRO, D. Leishmaniasis cutánea. **Revista Pediatría de Atención Primaria**, v. **96**, n. 1, p. 1–24, 2005.

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

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. **26**, n. 2, p. 293–307, 2012.

GREVELINK, S. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. **34**, n. 2, p. 257–272, 1996.

GRUENHEID, S.; FINLAY, B. B. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. **Nature**, v. **422**, n. 6933, p. 775–781, 2003.

HAN, R.; LIANG, H.; QIN, Z.; LIU, C. Crotoxin induces apoptosis and autophagy in human lung carcinoma cells in vitro via activation of the p38MAPK signaling pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. **35**, n. 10, p. 1323–1332, 2014.

HORTELANO, S.; TRAVÉS, P. G.; ZEINI, M.; ALVAREZ, A. M.; BOSCA, L. Sustained nitric oxide delivery delays nitric oxide-dependent apoptosis in macrophages: contribution to the physiological function of activated macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. **171**, n. 11, p. 6059–64, 2003.

JABLONSKI, K. A.; AMICI, S. A.; WEBB, L. M.; RUIZ-ROSADO, J. DE D.; POPOVICH, P. G.; PARTIDA-SANCHEZ, S.; GUERAU-DE-ARELLANO, M. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. **PloS one**, v. **10**, n. 12, p. e0145342, 2015.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, v. **397**, n. 3, p. 377–387, 2006.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational**

Immunology, v. 3, n. 3, p. e13, 2014.

LASKIN, D. L. Macrophages and Inflammatory Mediators in Chemical Toxicity: A Battle of Forces. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 8, p. 1376–1385, 2010.

LIU, Y.-C.; ZOU, X.-B.; CHAI, Y.-F.; YAO, Y.-M. Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 5, p. 520–529, 2014.

LORENZETTI, S. G. **Obtenção dos Sistemas Bioconjugados Crotoxina / PEBD-g-Phema E Crotoxina / PCL**. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Aplicações) - São Paulo, Universidade de São Paulo, 2006.

MACEDO, S. R. A.; BARROS, N. B. DE; FERREIRA, A. S.; MOREIRA-DILL, L. S.; CALDERON, L. A.; SOARES, A. M.; NICOLETE, R. Biodegradable Microparticles Containing Crotamine Isolated from *Crotalus durissus terrificus* Display Antileishmanial Activity in vitro. **Pharmacology**, v. 95, n. 1-2, p. 78–86, 2015.

MAITY, P. C.; BHATTACHARJEE, S.; MAJUMDAR, S.; SIL, A. K. Potentiation by cigarette smoke of macrophage function against *Leishmania donovani* infection. **Inflammation Research**, v. 58, n. 1, p. 22–29, 2009.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; SCHUBACH, A. O. **Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais**. 2a Edição ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ, A. D.; BERLINCK, R. G. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous system. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1790, n. 5, p. 283–308, 2011.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MEESTER, I.; ROSAS-TARACO, A. G.; SOLÍS-SOTO, J. M.; SALINAS-CARMONA, M. C. The roles of lipid droplets in human infectious disease. **Medicina Universitaria**, v. 13, n. 53, p. 207–216, 2011.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Editora Savier, 2003. p. 33–61.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 2, p. 309–322, 2010.

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; SOARES, A. M.; ZAMUNÉR, S. R.; PURGATTO, E.; TEIXEIRA, C. D. F. P. Secretory phospholipases A(2) isolated from *Bothrops asper* and from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E2 and D2 and expression of cyclooxygenases. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 52, n. 3, p. 428–39, 2008.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 2, p. 209–212, 2003.

MOSSER, D. M.; BRITTINGHAM, A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of

- subversion and exploitation. **Parasitology**, v. **115**, n. 07, p. 9–23, 1997.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Genetics**, v. **8**, n. 12, p. 958–969, 2009.
- MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. **366**, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.
- NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. **6**, n. 9, p. 754–765, 2008.
- NUNES, D. C. O.; FIGUEIRA, M. M. N. R.; LOPES, D. S.; SOUZA, D. L. N. DE; IZIDORO, L. F. M.; FERRO, E. A. V.; SOUZA, M. A.; RODRIGUES, R. S.; RODRIGUES, V. M.; YONEYAMA, K. A. G. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**, v. **140**, n. 07, p. 844–854, 2013.
- OLIVEIRA, C. C.; OLIVEIRA, S. M.; GODOY, L. M. F.; GABARDO, J.; BUCHI, D. DE F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **Journal of Infection**, v. **52**, n. 6, p. 420–432, 2006.
- OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontiers in Immunology**, v. **3**, n. June, p. 1–9, 2012.
- PAIVA, R. DE M. A.; FIGUEIREDO, R. DE F.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; BIANCHI, M. DE L. P.; RODRIGUES, K. C.; LUCARINI, R.; CAETANO, R. C.; PIETRO, R. C. L. R.; MARTINS, C. H. G.; ALBUQUERQUE, S. DE; SAMPAIO, S. V. Cell cycle arrest evidence, parasitocidal and bactericidal properties induced by l-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie**, v. **93**, n. 5, p. 941–947, 2011.
- PASSERO, L. F. D.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D.; TOYAMA, M. H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. **Parasitology Research**, v. **101**, n. 5, p. 1365–1371, 2007.
- PATEL, P. C.; HARRISON, R. E. Membrane Ruffles Capture C3bi-opsonized Particles in Activated Macrophages. **Molecular Biology of the Cell**, v. **19**, p. 4628–4639, 2008.
- PEICHOTO, M. E.; TAVARES, F. L.; DEKREY, G.; MACKESSY, S. P. A comparative study of the effects of venoms from five rear-fanged snake species on the growth of *Leishmania major*: Identification of a protein with inhibitory activity against the parasite. **Toxicon**, v. **58**, n. 1, p. 28–34, 2011.
- PEREIRA, B. A. S.; ALVES, C. R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, v. **158**, n. 4, p. 239–255, 2008.
- PETRICEVICH, V. L.; MENDONÇA, R. Z. Inhibitory potential of *Crotalus durissus terrificus* venom on measles virus growth. **Toxicon**, v. **42**, n. 2, p. 143–153, 2003.
- PETROPOLIS, D. B.; RODRIGUES, J. C. F.; VIANA, N. B.; PONTES, B.; PEREIRA, C. F. A.; SILVA-FILHO, F. C. *Leishmania amazonensis* promastigotes in 3D Collagen I culture: an *in vitro* physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions. **PeerJ**, v. **2**, p. e317, 2014.

PIMENTA, P. F.; SARAIVA, E. M.; ROWTON, E.; MODI, G. B.; GARRAWAY, L. A.; BEVERLEY, S. M.; TURCO, S. J.; SACKS, D. L. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. **91**, n. 19, p. 9155–9159, 1994.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. **47**, n. 1, p. 24–29, 2001.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future microbiology**, v. **10**, n. 1, p. 111–29, 2015.

RABHI, S.; RABHI, I.; TRENTIN, B.; PIQUEMAL, D.; REGNAULT, B.; GOYARD, S.; LANG, T.; DESCOTEAUX, A.; ENNINGA, J.; GUIZANI-TABBANE, L. Lipid Droplet Formation, Their Localization and Dynamics during *Leishmania major* Macrophage Infection. **Plos One**, v. **11**, n. 2, p. e0148640, 2016.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N. DE; MARZAL, C.; MEDICINA, I. DE; SÃO, T. DE; PAULO, U. D. S.; ENÉAS, A.; AGUIAR, D. C.; SP, S. P. Antimoniais Empregados No Tratamento Da Leishmaniose: Estado Da Arte. **Química Nova**, v. **26**, n. 4, p. 550–555, 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. **25**, n. 2, p. 203–11, 2007.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Review Cutaneous leishmaniasis. **Review Literature And Arts Of The Americas**, v. **7**, n. September, 2007.

RICHARD, J. V.; WERBOVETZ, K. A. New antileishmanial candidates and lead compounds. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. **14**, n. 4, p. 447–455, 2010.

ROBINSON, J. M.; OHIRA, T.; BADWEY, J. A. Regulation of the NADPH-oxidase complex of phagocytic leukocytes. Recent insights from structural biology, molecular genetics, and microscopy. **Histochemistry and Cell Biology**, v. **122**, n. 4, p. 293–304, 2004.

RODRIGUEZ, M.; DOMINGO, E.; MUNICIO, C.; ALVAREZ, Y.; HUGO, E.; FERNANDEZ, N.; SANCHEZ CRESPO, M. Polarization of the Innate Immune Response by Prostaglandin E2: A Puzzle of Receptors and Signals. **Molecular Pharmacology**, v. **85**, n. 1, p. 187–197, 2013.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature immunology**, v. **3**, n. 11, p. 1041–1047, 2002.

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

SAMPAIO, S. .; BRIGATTE, P.; SOUSA-E-SILVA, M. C. .; DOS-SANTOS, E. .; RANGEL-SANTOS, A. .; CURI, R.; CURY, Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon**, v. **41**, n. 7, p. 899–907, 2003.

SAMPAIO, S. C.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; BRIGATTE, P.; LANDGRAF, R. G.; SANTOS, E. C. DOS; CURI, R.; CURY, Y. Lipoxigenase-derived eicosanoids are involved in the

inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon**, v. **47**, n. 3, p. 313–321, 2006.

SAMPAIO, S. C.; SANTOS, M. F.; COSTA, E. P.; RANGEL-SANTOS, A. C.; CARNEIRO, S. M.; CURI, R.; CURY, Y. Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages. **Toxicon**, v. **47**, n. 8, p. 909–919, 2006.

SAMY, R. P.; SETHI, G.; LIM, L. H. K. **A brief update on potential molecular mechanisms underlying antimicrobial and wound-healing potency of snake venom molecules.** [s.l.] Elsevier Inc., 2016.

SETUBAL, S. S.; PONTES, A. S.; FURTADO, J. L.; KAYANO, A. M.; STÁBELI, R. G.; ZULIANI, J. P. Effect of *Bothrops alternatus* snake venom on macrophage phagocytosis and superoxide production: participation of protein kinase C. **Journal of Venomous**, v. **17**, n. 4, p. 430–441, 2011.

SILVA, N. G.; SAMPAIO, S. C.; GONÇALVES, L. R. C. Inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom on chronic edema induced by injection of bacillus Calmette-Guérin into the footpad of mice. **Toxicon**, v. **63**, p. 98–103, 2013.

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. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. **99**, n. 3, p. 239–251, 2004.

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.

SINDERMANN, H.; CROFT, S. L.; ENGEL, K. R.; BOMMER, W.; EIBL, H. J.; UNGER, C.; ENGEL, J. Miltefosine (Impavido): The first oral treatment against leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. **193**, n. 4, p. 173–180, 2004.

SMIT, E.; PRETORIUS, E.; ANDERSON, R.; OOMMEN, J.; POTJO, M. Differentiation of human monocytes in vitro following exposure to Canova in the absence of cytokines. **Ultrastructural pathology**, v. **32**, n. 4, p. 147–52, 2008.

SOKOL, R. J.; HUDSON, G.; JAMES, N. T.; FROST, I. J.; WALES, J. Human macrophage development: a morphometric study. **Journal of anatomy**, v. **151**, p. 27–35, 1987.

SOUSA E SILVA, M. C. C.; GONÇALVES, L. R. C.; MARIANO, M. The venom of South. **Mediators of Inflammation**, v. **23**, p. 18–23, 1996.

STOCKER, K. Composition of snake venoms. *In*: **Medical Use of Snake Venom Proteins**. 1a. ed. Boca Raton: CRC press, 1990. p. 33–56.

TORRES, A. F. C.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; FILHO, E. D.; ZARA, F. J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M. G.; PINTO NOGUEIRA, N. A.; ROSA DE OLIVEIRA, M.; OLIVEIRA TOYAMA, D. DE; MONTEIRO, H. S. A.; MARTINS, A. M. C. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and l-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. **55**, n. 4, p. 795–804, 2010.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: Implications for

intracellular survival. **Trends in Parasitology**, v. **28**, n. 8, p. 335–344, 2012.

WANG, J.; QIN, X.; ZHANG, Z.; CHEN, M.; WANG, Y.; GAO, B. Crotoxin suppresses the tumorigenic properties and enhances the antitumor activity of Iressa (gefinitib) in human lung adenocarcinoma SPCA-1 cells. **Molecular Medicine Reports**, p. 3009–3014, 2014.

WANG, J.-H.; XIE, Y.; WU, J.-C.; HAN, R.; REID, P. F.; QIN, Z.-H.; HE, J.-K. Crotoxin enhances the antitumor activity of gefinitib (Iressa) in SK-MES-1 human lung squamous carcinoma cells. **Oncology reports**, v. **27**, n. 5, p. 1341–7, 2012.

WEINBERG, J. B. Mononuclear phagocytes. *In*: GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. (Eds.). . **Wintrobe's clinical hematology**. 12 ed. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2009. p. 249–281.

WHO, W. H. O. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases.** [s.l: s.n.].

XUAN, W.; QU, Q.; ZHENG, B.; XIONG, S.; FAN, G.-H. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. **Journal of leukocyte biology**, v. **97**, n. 1, p. 61–9, 2015.

ZAMBELLI, V. O.; PASQUALOTO, K. F. M.; PICOLO, G.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; CURY, Y. Harnessing the knowledge of animal toxins to generate drugs. **Pharmacological Research**, 2016.

ZAMBRANO-VILLA, S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J. C.; ORTIZ-ORTIZ, L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends in Parasitology**, v. **18**, n. 6, p. 272–278, 2002.

ZIELER, H.; KEISTER, D. B.; DVORAK, J. A; RIBEIRO, J. M. A snake venom phospholipase A(2) blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. **The Journal of experimental biology**, v. **204**, p. 4157–4167, 2001.

ANEXO 1



PARECER BIO053-12

Projeto: Efeito da crotóxina (CTX) derivada de *Crotalus durissus terrificus* sobre macrófagos co-cultivados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*."

Coordenador: Prof. Dra. Edilene de Oliveira da Silva

Área Temática: Biologia

Vigência: 10/2011 a 10/2015

Nº no CEPAE-UFPA: BIO053-12

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 18 de setembro de 2011



Prof. Dr. Walace Gomes Leal
Presidente do Comitê de Ética Em Pesquisa
Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará
Federal do Pará

ANEXO 2