



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

EFEITO DE UMA FOSFOLIPASE A₂ BÁSICA ISOLADA DA PEÇONHA DE
Bothropoides pauloensis (*Bothrops pauloensis*) **SOBRE FORMAS PROMASTIGOTA**
DE *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*

Débora Cristina de Oliveira Nunes

Uberlândia - MG
Julho - 2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITO DE UMA FOSFOLIPASE A₂ BÁSICA ISOLADA DA PEÇONHA DE
Bothropoides pauloensis (*Bothrops pauloensis*) SOBRE FORMAS PROMASTIGOTA
DE *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis***

Débora Cristina de Oliveira Nunes

Orientador: Profa. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini

Co-Orientador: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos à obtenção
do título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Bioquímica)

Uberlândia - MG
Julho - 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

N972e Nunes, Débora Cristina de Oliveira, 1987-
2011 Efeito de uma fosfolipase A_2 básica isolada da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*) sobre formas promastigota de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* / Débora Cristina de Oliveira Nunes. – 2011.
93 f. : il.

Orientador: Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini.
Co-orientador: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Bioquímica - Teses. 2. Serpente peçonhenta - Peçonha -
Teses.
I. Tadini, Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama. II. Ávila, Veridiana
de Melo Rodrigues. III. Universidade Federal de Uberlândia. Progra-
ma de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

PALAVRAS-CHAVE DO TRABALHO: *Bothropoides pauloensis*; fosfolipase A_2
básica; *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITO DE UMA FOSFOLIPASE A₂ BÁSICA ISOLADA DA PEÇONHA DE
Bothropoides pauloensis (*Bothrops pauloensis*) SOBRE FORMAS PROMASTIGOTA
DE *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis***

Débora Cristina de Oliveira Nunes

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini

Examinadores: Profa. Dra. Maria Aparecida Souza

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Data da Defesa: 26 / 07 / 2011

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Profa. Dra. Kelly A. G. Yoneyama Tadini



Dedico este trabalho aos meus pais, Erotíldes e Lúcia, e à minha irmã, Amanda, que sempre lutaram para que eu pudesse estudar e me apoiaram nas minhas escolhas.



Agradecimentos

- A Deus e a Nossa Senhora pela força e perseverança concedidas nesta etapa da minha vida.
- A minha família pelo amor incondicional, carinho, preces e por compartilhar meus momentos de dificuldades e alegrias.
- A Profa. Dra.. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini pelos valiosos ensinamentos de bancada, contribuição intelectual, paciência e dedicação. A Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila pela receptividade, oportunidades concedidas, incentivo e dedicação. A vocês duas, agradeço pelas orientações, por compreenderem minhas inseguranças e me ajudarem a superá-las. Vocês me ensinaram a crescer tanto profissionalmente quanto pessoalmente, mostrando o que é profissionalismo, seriedade, força de vontade e ética. Obrigada por terem acreditado que daria certo e terem conduzido o trabalho com tamanha sabedoria. Minha admiração, gratidão e respeito!
- As professoras Amélia Hamaguchi e Maria Inês Homs Brandeburgo pelas oportunidades, ensinamentos, incentivo e confiança.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica (INGEB/UFU) e professores pelos ensinamentos e pela possibilidade de aperfeiçoamento profissional.
- Aos meus amigos do laboratório Química de Proteínas e Produtos Naturais: Letícia, Dayane, Isabela e Renata, pela amizade, ideias compartilhadas, torcida sincera e por me ajudarem com as minhas angústias e sofrimentos pessoais e profissionais. Mário, Francis, Lino, David, Ana Carolina, Sarah, Lamartine, Mirian, Guilherme, Thais pelos momentos de descontração, boa convivência e apoio. Galera, sem vocês o trabalho não seria tão prazeroso.

- Aos Profs. Drs. Maria Aparecida de Souza e Cláudio Vieira da Silva, e seus alunos, especialmente, Alexandre e Thaise, pela imprescindível colaboração na realização dos experimentos e por abrirem as portas de seu laboratório.
- Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro pela grande ajuda no ensaio de infectividade e por disponibilizar material necessário para a realização dos experimentos.
- A Profa. Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro por me acolher em seu laboratório e pela imensurável colaboração na análise de imagens e valiosas sugestões.
- Ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti por permitir meu acesso ao seu laboratório sempre que necessário e pela gentileza em disponibilizar a estufa de CO₂.
- As meninas da histologia e ao técnico Marcelo, pelas contribuições sempre com muito boa vontade e competência.
- Aos meus amigos Renato, Priscila e Henrique pelo auxílio, apoio e prontidão sempre, além do carinho e amizade fora do ambiente de trabalho.
- Aos técnicos, Tianinha e Marina pela atenção, presteza e amizade ao longo de todos esses anos.
- A Taisa, responsável pelo biotério, pela disponibilização e manutenção dos camundongos.
- Aos amigos do laboratório de genética, especialmente Naiara, Mariana, Luciana e Carlos Júnior, por me ajudarem sempre que precisei.
- A CAPES pelo apoio financeiro.
- A todos que indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
CAPÍTULO 1	4
INTRODUÇÃO	5
LEISHMANIOSE	5
Epidemiologia	5
Agente etiológico	6
Vetores e Hospedeiros	10
Ciclo biológico	10
Manifestações clínicas	13
Leishmaniose Tegumentar Americana	14
Interação Parasito-hospedeiro	16
Tratamento	20
PEÇONHA DE SERPENTE	24
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2	36
Resumo	38
Abstract	39
1. Introdução	40
2. Materiais e métodos	41
2.1. Animais	41
2.2. Toxina	42
2.3. Cultura de parasitos	42
2.4. Ensaios de citotoxicidade	43
2.5. Análises morfológicas	43
2.6. Eletroforese e densitometria	44
2.7. Cultura de macrófagos peritoneais murinos	45
2.8. Ensaio de infectividade em macrófagos peritoneais murinos	45

2.9. Dosagem de citocinas	46
2.10. Produção de óxido nítrico	46
2.11. Análise estatística	47
3. Resultados	47
3.1. Efeito da toxina BnSP-7 no crescimento e na viabilidade celular	47
3.2. Efeito da toxina BnSP-7 na morfologia do promastigota	47
3.3. Efeito da toxina BnSP-7 no perfil protéico do parasito	48
3.4. Efeito da toxina BnSP-7 na infectividade de promastigotas em macrófagos peritoneais murinos	48
3.5. Produção de citocinas e de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados	49
4. Discussão	50
5. Conclusão	57
Agradecimentos	58
Referências	59
Legendas	67
Figuras	69
Material suplementar	79

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. *Leishmania* sp.: forma promastigota, flagelada (à esquerda) e forma amastigota, aflagelada (à direita). **Fonte:** Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (2007) 7

Figura 2. Esquema mostrando a morfologia interna de promastigotas (à esquerda) e amastigotas (à direita). **Fonte:** Modificada de Besteiro et al., 2007 8

Figura 3. Representação esquemática do ciclo de vida de *Leishmania* sp em hospedeiro mamífero e mosquito como vetor. **Fonte:** Modificada de Handman, 2000 12

CAPÍTULO 2

Figura 1. Efeito da toxina BnSP-7 no crescimento de formas promastigota de *L. (L.) amazonensis*. O gráfico mostra o perfil de crescimento de parasitos cultivados na presença de concentrações crescentes da toxina BnSP-7 (25-200 µg/mL) por até 96 horas. A tabela apresenta os valores das porcentagens de crescimento dos parasitos em relação ao controle (100% de crescimento). * Diferença significativa em relação ao controle com $p < 0,001$ 69

Figura 2. Efeito da toxina BnSP-7 na viabilidade de formas promastigota de *L. (L.) amazonensis*. A viabilidade de parasitos cultivados por 72 horas em presença de concentrações crescentes de toxina BnSP-7 foi analisada pelo método colorimétrico baseado na oxidação mitocondrial do reagente MTT. O gráfico apresenta as porcentagens de viabilidade celular dos parasitos cultivados com BnSP-7 em relação aos parasitos controle (viabilidade de 100%). * Diferença significativa em relação ao controle com $p < 0,01$ 70

Figura 3. Microscopia óptica de formas promastigota de *L. (L.) amazonensis* cultivadas em presença da toxina BnSP-7. Os parasitos foram cultivados por 72 horas em presença de 200 µg/mL de BnSP-7, fixados e corados com kit Panótico rápido. As imagens mostram a morfologia característica de parasitos controle (**A**) e alterações na morfologia de parasitos cultivados em presença de BnSP-7 (**B**). As setas brancas indicam duplos flagelos, arredondamento do corpo do promastigota e flagelo único e curto 71

Figura 4. Análise ultraestrutural de formas promastigota de *L. (L.) amazonensis* cultivadas em presença de toxina BnSP-7. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão mostram parasitos controle (**A - D**) e parasitos cultivados em presença de 200 µg/mL de BnSP-7 por 72 horas (**E - N**). As setas indicam um único flagelo (**B, D**), o efeito 'blebbing' na membrana (**E - G**), presença de dois flagelos no bolso flagelar (**I, J**), acidocalcisomas (**N**). As letras minúsculas indicam: **a** – acidocalcisoma; **f** – flagelo; **m** – mitocôndria; **n** – núcleo; **v** – vacúolo 73

Figura 5. Perfil protéico de formas promastigota de *L. (L.) amazonensis* cultivadas em presença de toxina BnSP-7. (**A**) Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 13,5% mostrando o perfil protéico de parasitos controle (C), parasitos cultivados com 200 µg/mL (B200) e 20 µg/mL (B20) de BnSP-7 por 72 horas. (**B**) Gráfico mostrando as áreas dos picos de cada banda resultante da densitometria dos componentes protéicos observados por SDS-PAGE. (**C**) Tabela contendo a porcentagem de aumento (+) ou diminuição (-) na expressão da proteína. AP – banda de alto peso; BP – banda de baixo peso; gp63, glicoproteína de 63 kDa; Padrão, padrão de peso molecular 76

Figura 6. Efeito da toxina BnSP-7 na infectividade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos peritoneais murinos. (**A**) O gráfico apresenta os índices de infectividade em macrófagos peritoneais murinos para promastigotas controle, e promastigotas cultivados por 72 horas em presença de diferentes concentrações de BnSP-7 (200, 100 e 25 µg/mL; B200, B100 e B25, respectivamente). O índice de infectividade foi calculado como a média do número de parasitos por macrófago multiplicado pela porcentagem de macrófagos infectados, contando 100 macrófagos por

lamínula (n = 3). * Diferença significativa em relação ao controle com $p < 0.05$. **(B)** A tabela mostra a média do percentual de inibição da infectividade de macrófagos por formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* previamente tratadas com BnSP-7 em relação ao controle. # Diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ 77

Figura 7. Produção de TNF- α **(A)**, IL-10 **(B)** e óxido nítrico **(C)** por macrófagos peritoneais murinos infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Os macrófagos foram infectados com promastigotas previamente tratados ou não (controle) com a toxina BnSP-7 em diferentes concentrações (200 ou 100 $\mu\text{g/mL}$; B 200 e B 100, respectivamente). Os sobrenadantes da cultura de macrófagos infectados foram submetidos a dosagens de TNF- α e IL-10, utilizando a técnica de ELISA, e a quantidade de óxido nítrico foi estimada a partir da produção de nitrito, por meio da reação de Griess. Valores iguais a zero foram atribuídos a níveis de citocina abaixo do limite de detecção do kit 78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Espécies do gênero <i>Leishmania</i> de maior interesse em Parasitologia Humana de acordo com a classificação proposta por Lainson e Shaw, 1987	9
--	---

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
ACN	Acetonitrila
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
IL	Interleucina
LAAO	L-aminoácido oxidase
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
NEED	N-(1-naftil) etilenodiamino
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PBS	Tampão salino fosfatado (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
pg	Picograma (10 ⁻¹² grama)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TFA	Ácido trifluoroacético
TNF-α	Fator de necrose tumoral (<i>Tumoral Necrosis Factor</i>)

APRESENTAÇÃO

Peçonhas de serpentes são misturas complexas compostas por substâncias tóxicas e não tóxicas, tais como: proteínas, peptídeos e, em pequenas proporções, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos e compostos inorgânicos. As proteínas e peptídeos perfazem cerca de 90-95% da peçonha bruta e apresentam importantes propriedades farmacológicas, que incluem: ações anticoagulantes, efeitos sobre a agregação plaquetária, inflamação, hipotensão, atividades antitumoral e antimicrobiana, e outras.

Dentre os efeitos apresentados por essas moléculas bioativas, destaca-se a atividade microbida contra bactérias, fungos e parasitos. Segundo dados da literatura, tal efeito é devido, principalmente, à ação das enzimas fosfolipase A₂ (PLA₂) e L-aminoácido oxidase (LAO). Assim, tais toxinas constituem importantes fontes naturais de moléculas que podem ser utilizadas para o melhor entendimento da biologia de parasitos, sobretudo os do gênero *Leishmania* e, em outro momento, servir de molde para o desenho de possíveis drogas para a terapêutica de doenças, como a leishmaniose.

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que acometem o homem, sendo causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. A doença é típica de países tropicais, sobretudo em países mais pobres, sendo considerada uma doença tropical negligenciada por vários aspectos, mas principalmente, pela falta de auxílio na investigação de novos medicamentos para o seu tratamento.

A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro. No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), uma doença primariamente zoonótica, acomete preferencialmente a pele e/ou as mucosas e se caracteriza pelo aparecimento de lesões ulcerosas. É uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, risco de ocorrência de deformidades no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico. Além disso, apresenta ampla distribuição geográfica, com registro de casos em todas as regiões brasileiras.

Na quimioterapia convencional são empregados os compostos antimoniais pentavalentes, como drogas de primeira escolha. Em caso de uma resposta insatisfatória ou na impossibilidade de uso desses compostos, drogas de segunda escolha, como a anfotericina B e as pentamidinas, são os medicamentos utilizados. Entretanto, tais drogas apresentam: elevada toxicidade com efeitos colaterais importantes, são demasiadamente caras para uso rotineiro em países em desenvolvimento, podem induzir resistência no parasito, a terapia nem sempre é eficiente, além das dificuldades operacionais, tais como a necessidade de hospitalização e a via de administração das drogas. Tais limitações, apresentadas pelos medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento das leishmanioses, tem motivado a busca por novos agentes terapêuticos.

Assim, o presente estudo avaliou o efeito citotóxico de uma fosfolipase A₂ sobre formas promastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, possíveis alterações morfológicas e no perfil protéico induzidas por esse tratamento, bem como a sua ação no processo de infectividade em macrófagos murinos. Para essa finalidade, nós utilizamos a PLA₂ básica, denominada BnSP-7, isolada da peçonha da serpente *Bothropoides pauloensis*.

A apresentação da dissertação foi dividida em capítulos, conforme as normas do Instituto de Genética e Bioquímica e, a formatação seguiu as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas, a ABNT. No capítulo 1, é apresentada uma revisão bibliográfica do assunto, incluindo tópicos referentes à leishmaniose, biologia do agente etiológico, aspectos epidemiológicos, clínicos, imunológicos, terapêuticos, assim como um apanhado geral sobre peçonhas de serpentes, suas toxinas e estudos já realizados com *Leishmania* sp. Finalmente, no capítulo 2, nós mostramos a metodologia utilizada, os resultados obtidos e a discussão sob a forma de um artigo, que será submetido a uma revista científica indexada.

CAPÍTULO 1

LEISHMANIOSE

Leishmanioses são antroponozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. Os agentes etiológicos são espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), transmitidos por picadas de insetos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (HANDMAN, 2000; NEVES, 2005; GARCÍA-ALMAGRO, 2005).

Epidemiologia

A leishmaniose humana está presente nos quatro continentes, sendo endêmica em 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento (BRASIL, 2007; OMS, 2011). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a doença e o número global de indivíduos infectados é de 12 milhões, com aproximadamente dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano. Deste montante, cerca de 1-1,5 milhões correspondem a casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e cerca de 500 mil de leishmaniose visceral (ANTOINE et al., 2004; BRASIL, 2007; OMS, 2011). A saber, 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Brasil, Afeganistão, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (BASANO; CAMARGO, 2004; MURRAY et al., 2005; OMS, 2011).

Apesar destes dados, é difícil fornecer estimativas reais da quantidade de pessoas infectadas. Provavelmente, há uma diferença ainda maior entre o número de casos que realmente ocorrem e o número oficialmente divulgado, devido a vários fatores, tais como: o não-diagnóstico, diagnóstico errado ou a não-notificação da doença (DESJEUX, 2004).

Agente etiológico

O gênero *Leishmania* foi criado por Ross (1903) a partir das observações do parasito feitas por Cunningham (1885), Leishman (1900) e Donovan (1903) (HANDMAN, 2000; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Quanto à taxonomia, os parasitos unicelulares pertencentes ao gênero *Leishmania* possuem a seguinte posição sistemática:

Reino: PROTISTA Haeckel, 1866

Sub-reino: PROTOZOA Goldfuss, 1817

Filo: SARCOMASTIGOPHORA Honigberg & Balamuth, 1963

Sub-filo: MASTIGOPHORA Desing, 1866

Classe: ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909

Ordem: KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976

Sub-ordem: TRYPANOSOMATINA Kent, 1880

Família: TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901, emend. Grobben, 1905

Gênero: *Leishmania* Ross, 1903 (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GARCÍA-ALMAGRO, 2005).

A ordem Kinetoplastida agrupa protozoários flagelados, que possuem uma única mitocôndria, cujo DNA mitocondrial se encontra numa região próxima ao corpúsculo basal do flagelo denominada cinetoplasto. A família Trypanosomatidae agrupa protozoários que possuem apenas um flagelo (NEVES, 2005).

Tais organismos alternam-se entre dois estágios principais durante seu ciclo de vida, apresentando formas biológicas morfologicamente distintas (figura 1). No hospedeiro vertebrado, encontram-se na forma amastigota - aflagelar, imóvel, formato arredondado ou ovalado, presente no interior de fagolisossomos de macrófago. No vetor, a forma encontrada denomina-se promastigota - flagelada (flagelo único e longo) e extracelular (ANTOINE et al., 2004; BAÑULS et al., 2007; BESTEIRO et al., 2007).

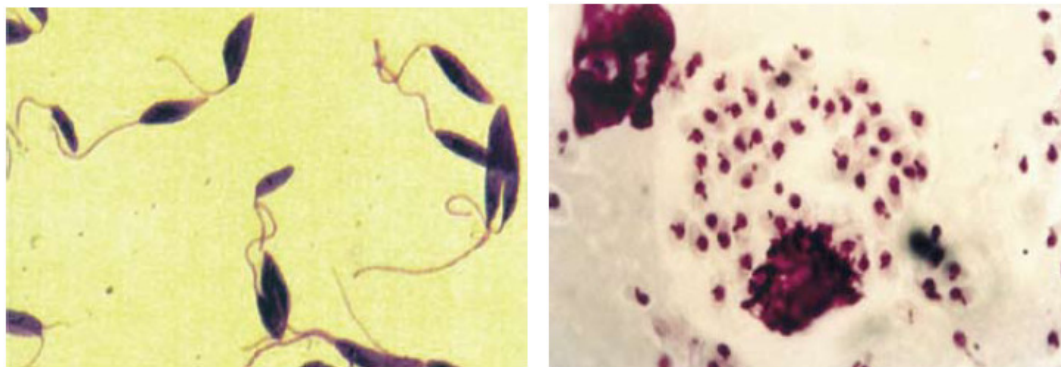


Figura 1. *Leishmania* sp.: forma promastigota, flagelada (à esquerda) e forma amastigota, aflagelada (à direita). **Fonte:** Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (2007).

Morfológicamente (figura 2), ambas as formas apresentam uma membrana, sob a qual estão dispostos os microtúbulos. Essa membrana apresenta uma invaginação na região anterior do corpo do parasito formando a bolsa flagelar, onde está localizado o flagelo. Aí não são encontrados microtúbulos subpeliculares e as atividades excretora e de pinocitose são intensas. No citoplasma, observamos um **núcleo** grande e arredondado, ora denso, ora mais frouxo, mostrando um cariossomo central ou excêntrico e a cromatina com disposição variável. O **cinetoplasto**, em forma de pequeno bastonete, é uma massa de DNA mitocondrial que está contido na única mitocôndria existente na célula. Em seu interior, existem estruturas filamentosas circulares formadas por ácido desoxirribonucléico, denominado k-DNA (“kinetoplast DNA”). O **blefaroplasto** ou **corpúsculo basal** aparece como a continuação do flagelo (em promastigotas), o qual apresenta microestrutura formada de nove pares de microtúbulos concêntricos e um par central, envoltos por uma membrana citoplasmática. Nos amastigotas, não há flagelo livre, apenas uma porção intracitoplasmática. As **acidocalcisomas** caracterizam-se por sua natureza ácida, alta densidade eletrônica e por ser local de armazenamento de polifosfatos, cálcio, magnésio e outros elementos. Além disso, tem o aparelho de Golgi, retículo endoplasmático, vacúolos e inclusões (NEVES, 2005; MORENO; DOCAMPO, 2009).

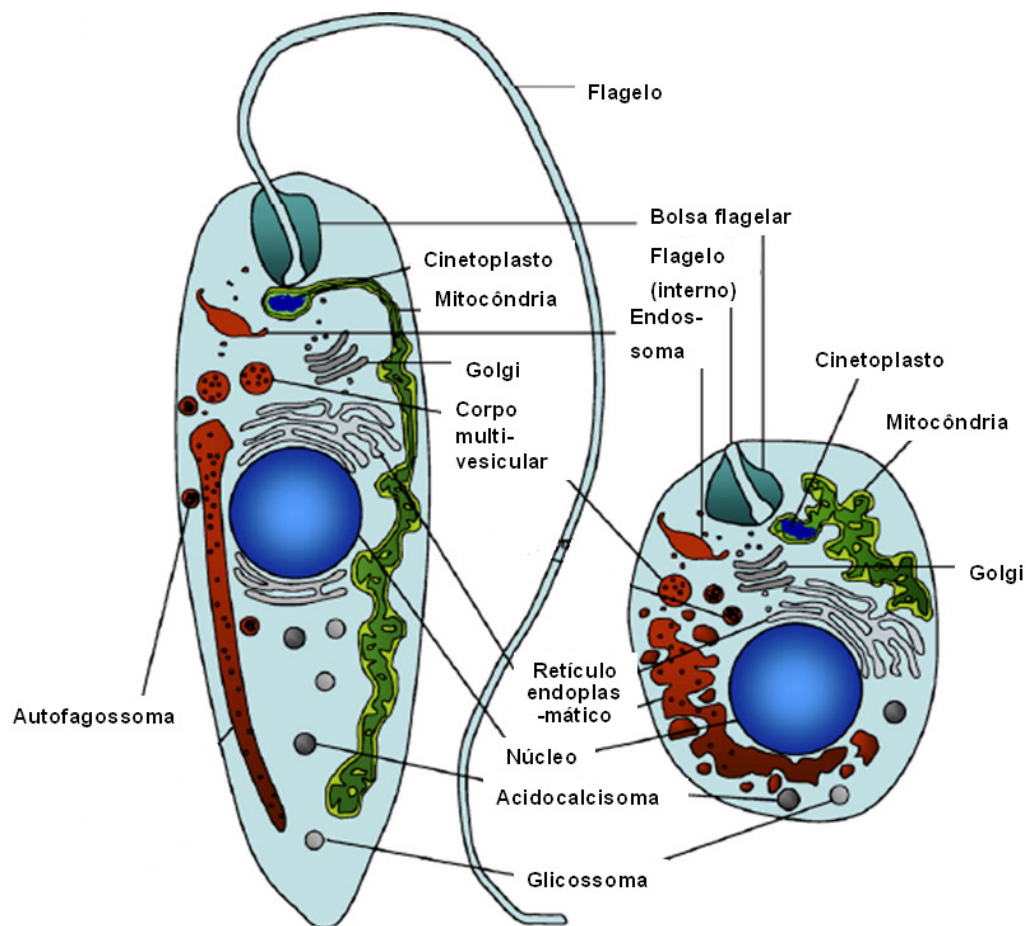


Figura 2. Esquema mostrando a morfologia interna de promastigotas (à esquerda) e amastigotas (à direita). **Fonte:** Modificada de Besteiro et al., 2007.

Existem mais de 30 espécies de *Leishmania* descritas no mundo, dentre as quais aproximadamente 20 causam doença no homem (BARI, 2006; BAÑULS et al., 2007). Antigamente, vários autores deram nomes específicos aos parasitos baseando-se em critérios extrínsecos como vetores, distribuição geográfica, tropismo, propriedades antigênicas e manifestações clínicas. Posteriormente, com o advento das técnicas bioquímicas e de biologia molecular, critérios intrínsecos passaram a ser usados na definição das espécies de *Leishmania* (BAÑULS et al., 2007), uma vez que tais critérios não podem sofrer interferência do meio ambiente ou do hospedeiro (NEVES, 2005).

A classificação mais utilizada, recentemente, foi proposta por Lainson e Shaw (1987) e divide o gênero *Leishmania* em dois subgêneros: *Viannia*, que é encontrado somente no Novo Mundo e *Leishmania*, que inclui espécies do Velho Mundo e do Novo Mundo (NEVES, 2005). Tais subgêneros (*Viannia* e *Leishmania*) foram separados com base na localização dos parasitos no intestino do vetor (BAÑULS et al., 2007) e, por sua vez, foram subdivididos em “complexos”: *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania braziliensis* (tabela 1).

No Brasil, devido à importância parasitológica como causa da leishmaniose tegumentar em humanos, destaca-se as seguintes espécies: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, do subgênero *Viannia* e complexo *braziliensis*; e, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, do subgênero *Leishmania* e complexo *mexicana* (NEVES, 2005).

Tabela 1. Espécies do gênero *Leishmania* de maior interesse em Parasitologia Humana de acordo com a classificação proposta por Lainson e Shaw, 1987

Subgênero			
<i>Leishmania</i>			<i>Viannia</i>
Complexo	Complexo	Outras espécies	Complexo
<i>Leishmania donovani</i>	<i>Leishmania mexicana</i>		<i>Leishmania braziliensis</i>
<i>L. (L.) donovani</i>	* <i>L. (L.) mexicana</i>	<i>L. (L.) tropica</i>	* <i>L. (V.) braziliensis</i>
<i>L. (L.) infantum</i>	* <i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.)</i>	* <i>L. (V.) guyanensis</i>
* <i>L. (L.) chagasi</i>	<i>L. (L.) venezuelensis</i>	<i>aethiopica</i>	<i>L. (V.) panamensis</i>
<i>L. (L.) archibaldi</i> ¹	<i>L. (L.) aristidesi</i>	<i>L. (L.) major</i>	<i>L. (V.) peruviana</i>
	<i>L. (L.) pifanoi</i> ²		* <i>L. (V.) lainsoni</i>
	<i>L. (L.) garnhami</i> ²		* <i>L. (V.) naiffi</i>
			* <i>L. (V.) shawi</i>
			<i>L. (V.) colombiensis</i>

* Espécies encontradas parasitando o homem no Brasil.

¹ Espécies provavelmente pertencentes ao Complexo *Leishmania donovani*.

² Espécies provavelmente pertencentes ao Complexo *Leishmania mexicana*.

Fonte: Modificada de Neves, 2005.

Vetores e hospedeiros

Os vetores da doença são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (NEVES, 2005) e gêneros *Phlebotomus*, em países do Velho Mundo (África, Europa e Ásia) e, *Lutzomyia*, nas Américas (GARCÍA-ALMAGRO, 2005).

No Brasil, espécies do gênero *Lutzomyia* estão presentes em todas as regiões do país, onde recebem nomes populares, tais como, “cangalha”, “mosquito-palha”, “birigui”, “tatuíra”, dentre outros. Estes insetos são morfologicamente menores que os mosquitos comuns (aproximadamente 3mm de comprimento), apresentam o corpo densamente coberto por pêlos e tem coloração clara, cor palha ou castanho-claro. São ainda facilmente reconhecíveis pela atitude que adotam quando pousam - as asas permanecem entreabertas e ligeiramente levantadas, em vez de se cruzarem sobre o dorso. As fêmeas necessitam de sangue para completarem o desenvolvimento dos ovos e costumam exercer a hematofagia no período noturno (REY, 2001; NEVES, 2005; GARCÍA-ALMAGRO, 2005; BARI, 2006; BAÑULS et al., 2007).

Hospedeiros e possíveis reservatórios naturais das espécies de *Leishmania* incluem animais silvestres, tais como: roedores, marsupiais (gambá), edentados (tatu, tamanduá, preguiça), canídeos e primatas. O homem também pode representar um hospedeiro, mas parece não ter um papel importante na manutenção dos parasitos na natureza (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BASANO; CAMARGO, 2004; BAÑULS et al., 2007).

Ciclo biológico

Leishmania sp. apresentam um ciclo evolutivo heteroxênico (digenético), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, responsáveis pela transmissão do parasito (figura 3) (ANTOINE et al., 2004).

A fêmea dos flebotomíneos (vetor) contamina-se ao ingerir amastigotas livres e/ou macrófagos contendo amastigotas durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado (NEVES, 2005). Formas amastigota existentes dentro de células fagocíticas desenvolvem-se, no intestino do vetor, em formas promastigota procíclicas, as quais são alongadas, flageladas e móveis. Ocorre, então, a metaciclogênese, processo no qual essas formas extracelulares, altamente replicativas e não infectivas diferenciam-se em formas promastigota metacíclicas, incapazes de se dividir, mas altamente infectivas. Após esse processo de diferenciação, os parasitos infectivos destacam-se das células intestinais e migram para o aparelho bucal do inseto (HANDMAN, 2000; ANTOINE et al., 2004; GARCÍA-ALMAGRO, 2005; BAÑULS et al., 2007). Desse modo, ao fazer uma nova refeição, o vetor inocula na derme do hospedeiro algumas centenas de formas promastigota metacíclicas associadas à sua saliva. A saliva do vetor contém substâncias farmacologicamente ativas (anticoagulantes, vasodilatadoras, moléculas imunoreguladoras e antiinflamatórias) que alteram a resposta imune do hospedeiro vertebrado, favorecendo o estabelecimento da infecção (GREVELINK; LERNER, 1996; HANDMAN, 2000; NEVES, 2005; GARCÍA-ALMAGRO, 2005). Os parasitos são, na sua maioria, fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear, como macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans, onde são formados os fagossomos. Estes se fundem a lisossomos, formando os fagolisossomos que originam os vacúolos parasitóforos (NEVES, 2005). Ali, há a diferenciação das formas promastigota em amastigota, que são formas aflageladas, intracelulares obrigatórios, são altamente infectivas e responsáveis pelo desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero. Uma vez no hospedeiro, as formas amastigota sobrevivem multiplicando-se por divisão binária dentro dos macrófagos, lisam estas células e os amastigotas liberados são fagocitados por outros macrófagos, continuando assim o ciclo (HANDMAN, 2000; NEVES, 2005; ANTOINE et al., 2004; GARCÍA-ALMAGRO, 2005; BAÑULS et al., 2007)

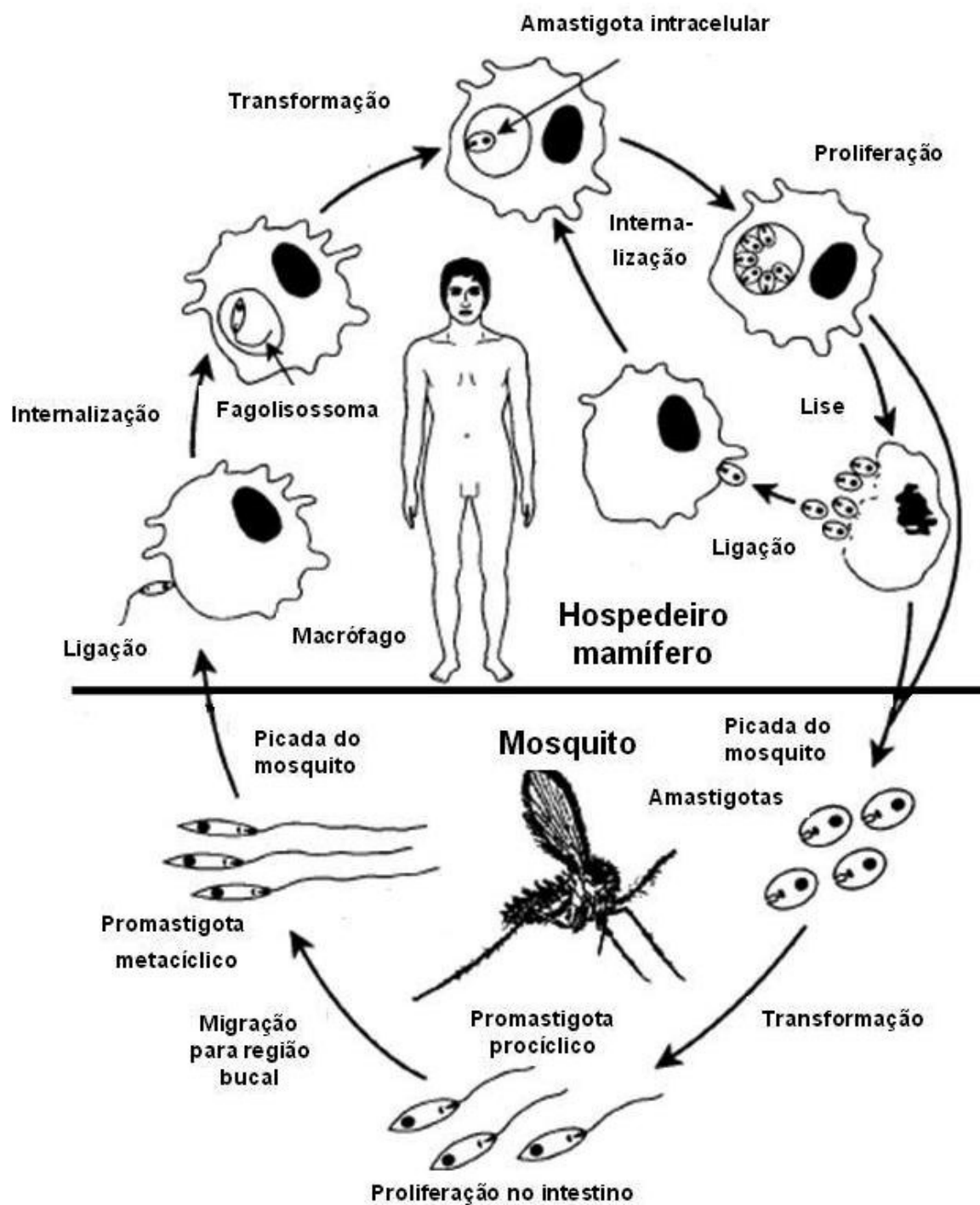


Figura 3. Representação esquemática do ciclo de vida de *Leishmania* sp em hospedeiro mamífero e mosquito como vetor. **Fonte:** Modificada de Handman, 2000.

Manifestações clínicas

Após o parasito ser internalizado pelo macrófago, inicia-se a evolução clínica da doença. Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e do estado nutricional, da carga genética e do perfil imunológico do hospedeiro, este pode permanecer assintomático ou apresentar processos patológicos mais ou menos graves (ANTOINE et al., 2004).

Em função da diversidade e complexidade biológica do parasito, dos vetores e dos hospedeiros, a leishmaniose apresenta um caráter espectral de manifestações clínicas. Dessa forma, não é considerada como uma doença simples, mas sim, um complexo de doenças (MURRAY et al., 2005; MITROPOULOS et al., 2010) que se apresenta sob diferentes manifestações clínicas:

- Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) – Causa lesões cutâneas limitadas. No Novo Mundo, é causada, principalmente, pelas espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) panamensis* e *L. (.) guyanensis*. Esta é a forma mais comum da doença e é relativamente benigna. Caracteriza-se pela presença de lesões cutâneas limitadas, indolores, que podem ser ulcerosas ou não (GREVELINK; LERNER, 1996; GARCÍA-ALMAGRO, 2005). A forma cutânea da doença resulta da multiplicação do parasito em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) da pele. (GRIMALDI; TESH, 1993).

- Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) – Causa lesões cutâneas difusas. No Novo Mundo, é causada por *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis* e *L. (L.) amazonensis* (GREVELINK; LERNER, 1996; GARCÍA-ALMARGO, 2005). Caracteriza-se pela presença de lesões disseminadas em diversas regiões do corpo, contendo macrófagos intensamente parasitados, sendo associadas a fraca resposta celular do hospedeiro (GREVELINK; LERNER, 1996). Geralmente ocorre em indivíduos anérgicos ou que haviam sido tratados previamente contra leishmaniose visceral. Em

vários casos, pacientes com esta forma clínica da doença são resistentes ao tratamento (ASHFORD, 2000).

- Leishmaniose Mucocutânea (LMC) – Causa lesões mucocutâneas, também conhecida como espúndia. No Novo Mundo, é causada por *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) mexicana* (GREVELINK; LERNER, 1996). Forma complicada da leishmaniose cutânea, que pode evoluir para lesões desfigurantes. O hospedeiro apresenta comprometimento das mucosas nasal, bucal e faríngea, causando degeneração das cartilagens e tecidos moles (DESJEUX, 2004; GARCÍA-ALMAGRO, 2005). Pode acontecer morte do indivíduo devido a infecções bacterianas secundárias e desnutrição. A forma mucocutânea caracteriza-se por uma resposta imune intensa, com hipersensibilidade retardada e células do SFM das mucosas normalmente pouco parasitadas (GRIMALDI; TESH, 1993; ASHFORD, 2000).

- Leishmaniose visceral (LV) - Também conhecida como leishmaniose calazar. É a manifestação mais agressiva da doença e é fatal se não tratada (DESJEUX, 2004; GARCÍA-ALMAGRO, 2005). O hospedeiro apresenta lesões viscerais devido ao tropismo do parasito por células do SFM do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides (REY, 2001). Pode também, após o tratamento realizado, causar recidivas ou evoluir para a forma clínica de leishmaniose dérmica pós-calazar (GREVELINK; LERNER, 1996; GARCÍA-ALMARGO, 2005).

Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, que acomete pele e mucosas, de forma localizada ou difusa (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2007). No Brasil, foram registradas sete espécies causadoras da LTA: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L.*

(V.) *lainsoni*, L. (V.) *naiffi*, L. (V.) *lindenberg* e L. (V.) *shawii*, sendo que as três primeiras espécies são as principais (COSTA, 2005; BRASIL, 2007).

Dentre essas várias espécies, destaca-se a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* que é um importante agente etiológico da leishmaniose tegumentar humana (PEREIRA; ALVES, 2008), estando distribuída no Brasil, principalmente na bacia amazônica, em áreas de florestas tipo várzea e igapó (Amazonas, Pará, Rondônia e sudoeste do Maranhão), e também na Bahia, em Minas Gerais e em Goiás. Tem como principal vetor o *Lutzomyia flaviscutellata*, flebotomíneo de hábito noturno e pouco antropofílico (GONTIJO; CARVALHO, 2003; NEVES, 2005). Produz lesões cutâneas únicas ou em pequeno número, que poucas vezes se curam espontaneamente, estando relacionada com a leishmaniose cutânea difusa ou forma disseminada (anérgica) da doença, em indivíduos com deficiência inata da resposta imune (REY, 2001; GONTIJO; CARVALHO, 2003; BASANO; CAMARGO, 2004; PEREIRA; ALVES, 2008).

No Brasil, casos clínicos de LTA eram conhecidos por Cerqueira desde 1885, que identificava a moléstia como botão de Biskra (BASANO; CAMARGO, 2004). No entanto, a natureza leishmaniótica das lesões cutâneas e nasofaríngeas foi confirmada somente em 1909, por Lindenberg, que encontrou formas do parasito em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias no interior de São Paulo (BASANO; CAMARGO, 2004; NEVES, 2005; BRASIL, 2007). Em 1922, Aragão, pela primeira vez, demonstrou o papel do flebotomíneo na transmissão da leishmaniose tegumentar (BRASIL, 2007).

A LTA distribui-se amplamente no continente americano, desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BARI, 2006; BRASIL, 2007) e é uma enfermidade que constitui um problema de saúde pública não somente pela freqüência, mas pelas dificuldades terapêuticas, ampla distribuição geográfica e pelas deformidades e sequelas que pode acarretar (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007).

No Brasil, a partir da década de 70, verificou-se um aumento expressivo no número de casos registrados, variando de 3.000 (1970) a 37.000 (2001) (COSTA,

2005). Em 2003, sua autoctonia foi confirmada em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2007). Nas últimas décadas, o número de casos tem aumentado significativamente devido a alguns fatores como: controle inadequado dos reservatórios e vetores dos parasitos, aumento da detecção da leishmaniose associada a infecções oportunistas (tal como a AIDS), urbanização e desflorestamentos, resistência a drogas leishmanicidas, conflitos armados e turismo (BARI, 2006).

A patogenia inicial de qualquer das leishmanioses humanas é sempre representada por um quadro inicial inflamatório, com comprometimento de células do SMF (NEVES, 2005). Após um período de incubação que varia de 10 dias a 3 meses (GONTIJO; CARVALHO, 2003), observa-se no local da picada a primeira manifestação clínica, o nódulo papular, o qual pode regredir e se curar dentro de poucos dias, permanecer estacionário por semanas ou evoluir rapidamente para úlceras (GARCÍA-ALMAGRO, 2005). As lesões típicas são caracterizadas pelo desenvolvimento de nódulos que evoluem para lesões ulcerativas sem dor, cobertas por uma crosta aderente de exsudato seco (GREVELINK et al., 1996).

A lesão causada por *L. (L.) amazonensis* cura-se espontaneamente e é susceptível ao tratamento. Entretanto, alguns pacientes desenvolvem a forma difusa da doença (LCD), na qual o parasito migra por vasos linfáticos, provocando o aparecimento de lesões por toda a pele e formando metástases (HANDMAN, 2000; GONTIJO; CARVALHO 2003). Na LCD não há resposta aos tratamentos conhecidos e está associada à deficiência da resposta imune celular do paciente frente aos antígenos do parasito. Na LCD é comum também o aparecimento de lesões não-ulcerosas com focos necróticos e granulomas, principalmente no rosto e membros (HANDMAN, 2000; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Interação parasito-hospedeiro

Tanto as formas promastigota quanto amastigota podem ser fagocitados por macrófagos por meio de um processo fagocítico mediado pela actina. Na maioria dos

casos, a fagocitose de *L. (L.) amazonensis* inicia-se com o engolfamento do corpo celular do parasito seguido pela progressiva internalização do flagelo (ANTOINE et al., 2004). Macrófagos constituem uma família de células residentes em tecidos e são considerados fagócitos profissionais. Estando presentes principalmente em linfonodos, baço, fígado, pulmões, trato gastrointestinal, cavidades serosas, ossos, pele e sistema nervoso central, eles não estão envolvidos somente com a internalização e morte de agentes infecciosos, mas também na remoção de células alteradas e moléculas modificadas (ANTOINE et al., 2004).

Em um primeiro momento, o parasito precisa se ligar à célula hospedeira para, posteriormente, ser internalizado. Vários receptores do hospedeiro (receptor de componentes do complemento tipos 1 e 3 - CR1 e CR3, receptor manose-fucose, receptor de fibronectina, receptor de macrófago para “advanced glycosylation end products” e várias moléculas da superfície do parasito (lipofosfoglicano - LPG, leishmanolisina - gp63 e glicoinositolfosfolipídeos - GIPLs) parecem ser responsáveis pela ligação e entrada dos promastigotas (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; ANTOINE et al., 2004).

Para o estabelecimento de uma infecção no hospedeiro mamífero, imediatamente após a internalização, o parasito deve sobreviver ao processo de fagocitose e depois resistir ao meio ácido e rico em protease encontrado nos fagolisossomos. Diversas moléculas (LPG, gp63, GIPLs, (glico)esfingolipídeos – GSLs) são diferencialmente expressas na superfície das formas promastigota e amastigota e parecem contribuir para a sobrevivência intrafagossomal e intrafagolisossomal. O LPG, por exemplo, inibe a fusão entre o endossomo e o fagossomo e retira radicais hidroxil e os ânions superóxido, os quais são rapidamente liberados após ativação da NADPH oxidase durante a fagocitose. Esse fenômeno pode ser visto como uma forma do parasito ganhar tempo para a transformação em amastigota, forma mais resistente às enzimas e ao pH ácido do fagolisossomo (BOGDAN; ROLLINGHOF, 1998; ANTOINE et al., 2004).

Como em todas as infecções por *Leishmania* sp., os macrófagos são colonizados pelas formas amastigota dos parasitos, os quais se multiplicam

intracelularmente até que as células sejam rompidas (PEREIRA; ALVES, 2008). Enquanto parasitos do complexo *Leishmania mexicana*, (*L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) pifanoi*) residem em grandes vacúolos parasitóforos (VPs), os parasitos do complexo *Leishmania donovani*, (*L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi*) residem em VPs individuais e apertados de onde as células-irmãs segregam em seu próprio VP (KIMA, 2007; PEREIRA; ALVES, 2008).

Ainda com relação ao estabelecimento da infecção, é preciso ocorrer supressão de vários eventos sinalizadores envolvidos na ativação de mecanismos microbicidas (ANTOINE et al., 2004). Uma variedade de mecanismos que contribuem para a desativação do fagócito mononuclear durante a infecção tem sido identificada. Um deles é a interferência dos patógenos intracelulares nas vias de sinalização requeridas para a ativação da célula hospedeira e sua consequente eliminação (BHARDWAJ et al., 2010). Outros mecanismos antimicrobianos ativos contra parasitos *Leishmania* são a liberação de superóxido por neutrófilos e macrófagos via NADPH oxidase, e a síntese de óxido nítrico (NO) catalisada pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que ocorre nos macrófagos (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998).

Apesar dos potentes mecanismos leishmanicidas dos macrófagos, *Leishmania* pode infectar e se multiplicar nessas células. Vários mecanismos podem explicar a resistência do parasito à resposta de defesa do macrófago. Um fator importante para a sobrevivência do parasito é que as células infectadas são menos responsivas à ativação de citocinas. Ainda, o parasito por si só tem mecanismos que podem interferir com a produção de NO e então facilitar sua sobrevivência dentro dos macrófagos. Como NO constitui uma das principais moléculas efetoras na destruição intracelular da *Leishmania* por macrófagos murinos, sugere-se que a interferência com a habilidade de sintetizar NO possa ser um importante mecanismo de evasão para o parasito (BALESTIERI et al., 2002).

Estudos realizados em *L. (L.) major* estabeleceram o paradigma Th1/Th2 de resistência/susceptibilidade à infecção, o qual determina que a resposta imune protetora tanto para a leishmaniose cutânea (*L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* ou *L. (L.)*

amazonensis) quanto para a visceral (*L. (L.) donovani*) é dependente do desenvolvimento de uma imunidade do tipo 1 (ALEXANDER; BRYSON, 2005).

Macrófagos, células dendríticas, linfócitos T helper CD⁴⁺ tipo I (Th1), citocinas tais como interferon- γ (IFN- γ), interleucina-12 (IL-12) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) e, fatores de transcrição como o fator regulatório de interferon (IFR-1) são cruciais para a resolução da infecção pelas espécies de *Leishmania* e para imunidade protetora duradoura. Ainda, o NO, produzido pela enzima iNOS de macrófagos, e os intermediários reativos de oxigênio, gerados pelas enzimas NADPH oxidase e superóxido dismutase de fagócitos, são moléculas efetoras potentes contra *Leishmania* extra e intracelular. Contrariamente, a não-cura das infecções por *Leishmania* são comumente associadas com a expansão dos linfócitos T helper tipo II (Th2), os quais liberam IL-4 e IL-5 e, grande quantidade de fatores desativadores de macrófagos, como o fator transformador do crescimento (TGF- β) e prostaglandina E₂ (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998).

Se a resposta é dirigida para a indução de IL-12, ocorre o desenvolvimento de resposta do tipo Th1. As células Th1 produzem IFN- γ , a qual induz macrófagos a produzirem NO, levando à morte dos parasitos. Em contraste, em indivíduos susceptíveis, há preferencialmente a produção de IL-4, que leva à diferenciação de células Th2. Estas produzem mais IL-4, inibindo então a ativação dos macrófagos e a síntese de NO. Obviamente, este não é o único mecanismo de controle da leishmaniose, mas é um dos principais durante a leishmaniose cutânea (LIEW et al., 1997).

Muitos estudos tem focado em citocinas específicas ou uma combinação dessas como fatores de susceptibilidade ou resistência à infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos (PEREIRA; ALVES, 2008). As citocinas comumente estudadas são: IL-4, IL-10, IFN- γ , IL-12 e TNF- α .

A IL-10 é produzida por vários tipos celulares incluindo células T, monócitos e macrófagos. É um potente imunossupressor das funções dos macrófagos, diminui a expressão de MHC classes I e II afetando a apresentação de antígenos e reduz a transcrição e tradução de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-12, e IL-18 de

macrófagos. Ademais, suprime a indução da iNOS que catalisa a produção de NO. É uma citocina crítica na determinação de susceptibilidade do hospedeiro à infecção por *Leishmania*, sendo que em modelo murino de leishmaniose cutânea, IL-10 contribui para a progressão da doença. (BHARDWAJ et al., 2010).

TNF- α é produzida predominantemente por macrófagos logo após o desafio e está envolvida na fase inata da resposta imune com um papel central na defesa contra patógenos intracelulares. A função do TNF- α no desenvolvimento de resposta imune protetora tem sido investigada. O tratamento de lesões com TNF- α recombinante resultou em diminuição da lesão e da carga parasitária, enquanto que a aplicação de anticorpos anti-TNF- α causaram agravamento dos sintomas (KORNER et al., 2010).

Além das citocinas, outra molécula importante na resposta à infecção por espécies de *Leishmania* é o óxido nítrico (NO). Este é derivado do nitrogênio guanidino da L-arginina e do oxigênio molecular em uma reação catalisada pela enzima iNOS, com NADPH e tetrahidrobiopterina como cofatores. O NO é muito instável com meia-vida de 3 a 5 segundos. Por isso, normalmente mede-se seus produtos oxidativos, nitrito e nitrato, em sobrenadantes de cultura ou soro. É um crítico mediador de uma variedade de funções biológicas, dentre elas a atividade microbicida. A enzima responsável por sua produção é induzida em macrófagos por uma variedade de estímulos imunológicos, tais como IFN- γ , TNF- α e lipopolissacarídeo de bactéria (LPS). Uma vez ativada, essas células produzem grandes quantidades de NO e se torna citotóxica (LIEW, 1995; LIEW et al., 1997; PANARO et al., 2001).

Tratamento

Em se falando de tratamento farmacológico sistêmico das leishmanioses, as drogas de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), existentes sob duas formas: o antimoniato de N-metilglucamina e o stibogluconato de sódio. Este último, porém, não é comercializado no Brasil (BALAÑA-FOURCE et al., 1998;

GONTIJO; CARVALHO, 2003; GARCÍA-ALMAGRO, 2005; BRASIL, 2007). O mecanismo de ação dessas drogas parece estar relacionado à influência na glicólise e β -oxidação de ácidos graxos das formas amastigota, o que culmina com a depleção dos níveis intracelulares de ATP (BALAÑA-FOURCE et al., 1998; BRASIL, 2007). Entre os efeitos colaterais mais frequentes estão: cefaléia, náuseas, vômitos, febre, mialgia e artralgia. Outros mais graves incluem toxicidade cardíaca, renal e hepática e constituem importante limitação à sua segurança. Ademais, por serem abortivos, os antimoniais não podem ser administrados em gestantes (GREVELINK et al., 1996; GONTIJO; CARVALHO, 2003, GARCÍA-ALMAGRO, 2005). Além da toxicidade, o alto 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 não se obtém resposta satisfatória com o tratamento pelo antimonial pentavalente ou na impossibilidade do seu uso, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e as pentamidinas (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007). O desoxicolato de anfotericina B é um antibiótico poliênico de reconhecida ação leishmanicida, usado desde 1960. Seu modo de ação consiste na interferência sobre ésteres (episterol precursor do ergosterol) da membrana citoplasmática de *Leishmania* (CROFT et al., 2006; BRASIL, 2007). O 24-ergosterol é o principal esterol existente em membranas de *Leishmania* e fungos. Assim, a anfotericina B altera a composição de esteróis da membrana e, por consequência, sua permeabilidade, levando o parasito à morte (BALAÑA-FOURCE et al., 1998). 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 o grande período de hospitalização requerido, impedem seu uso fora do ambiente hospitalar (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007; RICHARD; WERBOVETZ, 2010). Um avanço no uso desta droga foi a sua associação a compostos lipídicos, o que aumentou o índice terapêutico e diminuiu os efeitos tóxicos em humanos, porém esta é uma droga cara (BALAÑA-FOURCE et al., 1998; MITROPOULOS et al., 2010). Trata-se de uma nova

formulação em que a anfotericina B é incorporada dentro de lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. Entretanto, no Brasil, tal formulação está indicada para o tratamento de leishmaniose visceral (BRASIL, 2007).

As pentamidinas são derivados sintéticos da amidina, comercializadas para uso em humanos sob a forma de dois sais: Isotionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) e Mesilato (Di-B-Hidroximetil-Sulfonato) de pentamidina, sendo que apenas o isotionato de pentamidina é comercializado no Brasil (BRASIL, 2007; MITROPOULOS et al., 2010). Podem ser usadas em indivíduos intolerantes ao tratamento por antimoniais ou em caso de resistência a estes (MITROPOULOS et al., 2010). O seu mecanismo de ação é controverso e ainda não é completamente conhecido (BALAÑA-FOURCE et al., 1998). As pentamidinas parecem inibir a biossíntese de poliaminas e agir sobre a membrana mitocondrial interna (CROFT et al., 2006). Apresentam morbidade moderada e as reações adversas mais frequentes são: dor, abscessos estéreis no local da aplicação, além de náuseas, vômitos, tontura, cefaléia, adinamia, mialgias, hipotensão, lipotímias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia. É contra-indicada em caso de gestação, diabetes mellitus, insuficiência renal, insuficiência hepática, doenças cardíacas e em crianças com peso inferior a 8kg (BALAÑA-FOURCE et al., 1998; BRASIL, 2007; MITROPOULOS et al., 2010).

Outros medicamentos estão entre as diversas opções alternativas aos antimoniais. São eles: alopurinol, compostos azóis, paromomicina e miltefosina. O alopurinol (4-hidróxipirazol [3,4-d] pirimidina) é um quimioterápico oral tradicionalmente usado no tratamento de gota (GARCÍA-ALMAGRO, 2005; MITROPOULOS et al., 2010). Acredita-se que esse composto atue inibindo enzimas da via de salvamento das purinas em *Leishmania*, perturbando a biossíntese de macromoléculas (CROFT et al., 2006). Efeitos adversos incluem: erupções na pele causadas por reações de hipersensibilidade, anemia, neutropenia, trombocitopenia e cálculo renal (BALAÑA-FOURCE et al., 1998). Os compostos azóis são agentes antifúngicos que incluem duas classes diferentes: imidazóis (cetoconazol) e os

triazóis (flucanazol, itraconazol). Todos atuam inibindo a síntese do ergosterol (GARCÍA-ALMAGRO, 2005; MITROPOULOS et al., 2010). As vantagens destes compostos são administração oral e efeitos colaterais menos severos em comparação com os antimoniais pentavalentes (MITROPOULOS et al., 2010). Os efeitos colaterais mais comuns compreendem hepatotoxicidade, alteração na produção de testosterona, diminuição da libido, dentre outros (BALAÑA-FOURCE et al., 1998). A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo (Aminosidina) de uso tópico com pronunciada ação leishmanicida. Entretanto, também apresenta efeitos colaterais tais como: erupções na pele, prurido local e queimação e, seu efeito ainda não está totalmente comprovado (BALAÑA-FOURCE et al., 1998; GARCÍA-ALMAGRO, 2005; MITROPOULOS et al., 2010). Por fim, a miltefosina (hexadecilfosfocolina) é um derivado de fosfolípido e foi inicialmente desenvolvida como um agente antineoplásico. É administrada oralmente, porém mais estudos são necessários para avaliar o seu uso no tratamento da leishmaniose cutânea, e suas limitações incluem toxicidade no trato gastrointestinal, teratogenicidade e um custo relativamente alto (CROFT; ENGEL, 2006; CROFT et al., 2006; MITROPOULOS et al., 2010; RICHARD; WERBOVETZ, 2010).

O critério de cura para a LTA é definido pelo aspecto clínico das lesões: re-epitelização das lesões ulceradas ou não-ulceradas, regressão total da infiltração e eritema, até três meses após a conclusão do esquema terapêutico (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007).

Com base no que foi mencionado acima sobre a terapêutica da leishmaniose tegumentar, podemos perceber que as formulações atualmente disponíveis apresentam uma série de desvantagens, representando assim um obstáculo ao tratamento adequado dos casos da doença. A saber: alta toxicidade, modo de administração, resistência à droga, alto custo e problemas operacionais. Nesse sentido, esforços devem ser efetivados no sentido de ampliar os testes clínicos com as novas drogas promissoras e pesquisar drogas alternativas que facilitem o tratamento (BASANO; CAMARGO, 2004).

Ultimamente, na busca por drogas com ação leishmanicida, vários compostos e formulações têm se mostrado promissores, tais como: derivados de fosfolipídeos, de poliaminas, formulações orais de anfotericina B e tópicas de paromomicina, chalconas, compostos nitroaromáticos, inibidores do metabolismo de esteróis, dentre vários outros (RICHARD; WERBOVETZ, 2010). Além disso, produtos naturais como extratos de plantas e compostos derivados destas e, peçonhas e secreções animais constituem valiosa fonte de potenciais agentes medicinais (FERNANDEZ-GOMES et al., 1994; TEMPONE et al., 2001; GONÇALVES et al., 2002; ROCHA et al., 2005; BORGES et al., 2006; PASSERO et al., 2007; TEMPONE et al., 2007; 2008; MAYER et al., 2011; PEICHOTO et al., 2011).

PEÇONHA DE SERPENTE

As peçonhas de serpente 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), hialuronidases, L-aminoácido oxidases (LAAO), esterases, 5'-nucleotidases, NAD nucleosídeos, metaloproteases e serinoproteases (cerca de 90% dos constituintes dessa peçonha) (STOCKER, 1990). Além disso, também estão presentes citrato, íons metálicos, carboidratos, nucleotídeos e em menor proporção aminoácidos livres e lipídeos (SOUZA et al., 2001).

Dentre os componentes enzimáticos tóxicos, destacam-se as LAAOs e as fosfolipases A₂, devido ao seu potencial citotóxico (STÁBELI et al., 2006; SAMY et al., 2007; CISCOTTO et al., 2009; TORRES et al., 2010).

As LAAOs (LAAOs, EC 1.4.3.2) são flavoenzimas que catalisam estereoespecificamente a desaminação oxidativa de um L-aminoácido ao seu correspondente α -cetoácido, com produção de peróxido de hidrogênio e amônia (CURTI et al., 1992). Vários estudos *in vitro* utilizando LAAOs contra formas promastigota de *Leishmania* sp. já foram realizados e evidenciam sua potente ação leishmanicida, em torno de 100% de inibição no crescimento e/ou morte. Tempone e

colaboradores (2001) observaram um efeito leishmanicida na peçonha de *Bothrops moojeni* e associaram tal ação a uma enzima LAAO. Em 2006, Izidoro et al. verificaram que a BpirLAAO-I isolada da peçonha de *Bothrops pirajai* apresenta atividade leishmanicida contra *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) major*. Nesse mesmo ano, Toyama et al. demonstraram que a CascaLAO de *Crotalus durissus cascavella* tem alta atividade citotóxica em *L. (L.) amazonensis*. Ciscotto et al. (2009) demonstraram que a LAAO de *Bothrops jararaca* também possui atividade anti-*Leishmania* em *L. (L.) amazonensis*. Ainda em 2009, Rodrigues e colaboradores visualizaram o potencial leishmanicida da Bp-LAAO de *Bothrops pauloensis* contra *L. (L.) donovani*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*. Torres et al. (2010) mostraram que a BmarLAAO de *Bothrops marajoensis* inibiu o crescimento de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis*. Em 2011, Naumann et al. verificaram o efeito leishmanicida da BI-LAAO isolada de *Bothrops leucurus* sobre *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis*. E, finalmente, Paiva et al. (2011) demonstraram o potencial anti-parasito da Batrox LAAO de *Bothrops atrox* contra *Trypanosoma cruzi* e diferentes espécies de *Leishmania* (*L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) major*).

Embora as LAAOs apresentem potente ação leishmanicida, a incubação dos parasitos com LAAO em presença de catalase (enzima que catalisa a degradação de peróxido de hidrogênio) resulta em alto percentual de sobrevivência dos promastigotas, sugerindo que a morte dos parasitos esteja relacionada à produção de peróxido de hidrogênio (IZIDORO et al., 2006; TOYAMA et al., 2006). Assim, apesar do seu alto potencial citotóxico, mais estudos devem ser realizados com o intuito de melhor entender o mecanismo de ação das LAAOs.

Outra classe de enzimas com potencial microbiano é a das fosfolipases A₂ (PLA₂, EC 3.1.1.4). Estas enzimas são definidas pela habilidade de catalisar a hidrólise da ligação éster dos fosfolipídios na posição sn-2 produzindo ácidos graxos livres e lisofosfolipídios (DIAZ; ARM, 2003). As PLA₂s presentes nas peçonhas ofídicas podem ser divididas em dois subgrupos principais: Asp-49 (D49) e Lys-49 (K49), dependendo de qual aminoácido está presente na posição 49 da estrutura

primária. As PLA₂s com Asp-49 são enzimaticamente ativas, enquanto que as Lys-49 tem pouca ou nenhuma atividade enzimática, embora ambos os tipos sejam biologicamente ativas (COGO et al., 2006). Apesar da falta de atividade catalítica, as Lys-49 possuem atividade citotóxica que é mediada por uma coleção de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos na região C-terminal da molécula (SAMY et al., 2007; NEVALAINEN et al., 2008).

A ação *in vitro* das PLA₂s em formas promastigota de *Leishmania* sp. foi verificada por alguns pesquisadores. Stábili e colaboradores (2006) demonstraram que MjTx-II, uma PLA₂ Lys-49, isolada da peçonha de *B. moojeni* foi capaz de reduzir aproximadamente 50% da população de *Leishmania* sp. (*L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani*). Costa et al. (2008) avaliaram o potencial de duas fosfolipases A₂ (MTX-I e II) de *Bothrops brazili* e seus respectivos peptídeos sintéticos derivados da região C-terminal (pepMTX-I e pepMTX-II) contra *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Tanto MTX-I, uma PLA₂ Asp-49 quanto MTX-II, uma PLA₂ Lys-49 apresentaram efeito anti-parasito de aproximadamente 90% na concentração de 100µg/mL, enquanto os peptídeos foram capazes de matar cerca de 70% das *Leishmania* sp. na dose de 120µg/mL. Contrariamente, outro estudo demonstrou, *in vivo* e *in vitro*, que a PLA₂, enzimaticamente ativa, isolada de *Crotalus durissus collilineatus* pode estimular o crescimento de formas promastigota e amastigota de *L. (L.) amazonensis*. Segundo os autores, isso se deve, provavelmente, ao fato das PLA₂s serem fatores de progressão para a leishmaniose cutânea (Passero et al., 2008). Torres et al. (2010) mostraram que BmarPLA₂, uma PLA₂ Lys-49, de *Bothrops marajoensis*, foi incapaz de inibir o crescimento de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*. Por fim, Peichoto et al. (2011) verificaram que a PLA₂ Trimorphin, uma Asp-49 isolada de *Trimorphodon biscutatus lambda*, exibe potente efeito citotóxico contra *Leishmania (L.) major*. Os autores observaram que concentrações muito baixas de toxina estimularam a proliferação celular, enquanto concentrações maiores inibiram a viabilidade celular do parasito.

A BnSP-7 é uma fosfolipase A₂ isolada a partir da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Soares et al., 2000), serpente que segundo a classificação de

Silva (2004) passou a ser chamada de *Bothrops pauloensis* (Valle; Brites, 2008) e, finalmente, de acordo com a última reclassificação passou a ser denominada *Bothropoides pauloensis* (Fenwick et al., 2009). A toxina é cataliticamente inativa (Lys-49), miotóxica, induz edema, libera creatina quinase do músculo gastrocnêmico de camundongos, apresenta atividade bactericida sobre *Escherichia coli* (Soares et al., 2000), dentre outras atividades.

Com base no que foi mencionado neste capítulo, o nosso estudo teve como objetivo estudar a ação de uma toxina isolada da peçonha de *Bothropoides pauloensis*, denominada BnSP-7, em *L. (L.) amazonensis*, analisando o efeito da toxina na: citotoxicidade celular, avaliando o crescimento e a viabilidade; morfologia do parasito, por estudos de microscopia óptica e eletrônica; e infectividade do promastigota, através de ensaios de infectividade em macrófagos peritoneais murinos e dosagens de produção de citocinas e NO nos sobrenadantes de cultura dos macrófagos infectados.

REFERÊNCIAS

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

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**, v. 58, p. 1-68, 2004.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, v. 30, p.1269-1281, 2000.

BALAÑA-FOURCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, J. C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of Leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BALESTIERI, F. M. P.; QUEIROZ, A. R. P.; SCAVONE, C.; COSTA, V. M. A.; BARRAL-NETO, M.; ABRAHAMSOHN, I. A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes and Infection**, v. 4, 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. **Advances in Parasitology**, v. 64, p. 1-109, 2007.

BARI, A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, v. 16, p. 156-162, 2006.

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

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

BHARDWAJ, S.; SRIVASTAVA, N.; SUDAN, R.; SAHA, B. Leishmania interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-13, 2010.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 121-134, 1998.

BORGES, A.; SILVA, S.; OP DEN CAMP, H. J.; VELASCO, E.; ALVAREZ, M.; ALFONZO, M. J.; JORQUERA, A.; DE SOUSA, L.; DELGADO, O. *In vitro* leishmanicidal activity of *Tityus discrepans* scorpion venom. **Parasitology Research**, v.99, n. 2, p. 167-173, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

CISCOTTO, P.; AVILA, R. A. M.; COELHO, E. A. F.; OLIVEIRA, J.; DINIZ, C. G.; FARÍAS, L. M.; DE CARVALHO, M. A. R.; MARIA, W. S.; SANCHEZ, E. F.; BORGES, A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, p. 330-341, 2009.

COGO, J. C.; LILLA, S.; SOUZA, G. H. M. F.; HYSLOP, S.; NUCCI, G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochimie**, v. 88, p. 1947 - 1959, 2006.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 3-17, 2005.

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; OLIVEIRA, C. Z.; SANTOS-FILHO, N. A.; TEIXEIRA, S. S.; NOMIZO, A.; FULY, A. L.; MONTEIRO, M. C.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; STÁBELI, R. G.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, p. 1645-1656, 2008.

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

CROFT, S. L.; ENGEL, J. Miltefosine — discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p. S4-S8, 2006.

CURTI, B.; RONCHI, S.; SIMONETTA, P. M. D- and L-Amino acid oxidases. In: MÜLLER, F. (Ed.). **Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes**. Boca Raton: CRC Press, 1992, p. 69-94.

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

DIAZ, B. L.; ARM, J. P. Phospholipase A₂. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 69, p. 87 - 97, 2003.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET JR., R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 156, p. 617-640, 2009.

FERNANDEZ-GOMES, R.; ZERROUK, H.; SEBTI, F.; LOYENS, M.; BENSLIMANE, A.; OUAISSI, M. A. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: Preliminary identification of proteins from *Cerastes cetrastes* venom which interact with the parasites. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 875-882, 1994.

GARCÍA-ALMAGRO, D. Leishmaniasis cutánea. **Actas Dermo-sifiliográficas**, v. 96, n. 1, p. 1-24, 2005.

GONÇALVES, A. R.; SOARES, M. J.; SOUZA, W.; DE DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. Ultra structural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Parasitology Research**, v. 88, p. 598-602, 2002.

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

GREVELINK, S. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 34, n. 2, Part 1, p. 257-272, 1996.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 230-250, 1993.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. **Advances in Parasitology**, v. 44, p. 1-39, 2000.

IZIDORO, L. F. M.; RIBEIRO, M. C.; SOUZA, G. R. L.; SANT'ANA, C. D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GOULART, L. R.; BELEBONI, R. O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 7034-7043, 2006.

KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1087-1096, 2007.

KÖRNER, H.; MCMORRAN, B.; SCHLÜTER, D.; FROMM, P. The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 879-888, 2010.

LIEW, F. Y. Interactions between cytokines and nitric oxide. **Advances in Neuroimmunology**, v. 5, p. 201-209, 1995.

LIEW, F. Y.; WEI, X. Q.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 352, p. 1311-1315, 1997.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ, A. D.; BERLINCK, R. G. S.; FUSETANI, C. N. Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 153, p. 191-222, 2011.

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

MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 208-213, 2009.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.

NAUMANN, G. B.; SILVA, L. F.; FARIA, G.; RICHARDSON, M.; EVANGELISTA, K.; KOHLHOFF, M.; GONTIJO, C. M. F.; NAVDAEV, A.; DE REZENDE, F. F.; EBLE, J. A.; SANCHEZ, E. F. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 7, p. 683-694, 2011.

NEVALAINEN, T. J.; GRAHAM, G. G.; SCOTT, K. F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. Review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1781, p. 1-9, 2008.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 11 ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

OMS – Organização Mundial de Saúde – Disponível em:
<http://www.who.int/leishmaniasis/en/> Consulta dia 08/06/2011.

PAIVA, R. M. A.; FIGUEIREDO, R. F.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; BIANCHI, M. L. P.; RODRIGUES, K. C.; LUCARINI, R.; CAETANO, R. C.; PIETRO, R. C. L. R.; MARTINS, C. H. G.; DE ALBUQUERQUE, S.; 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.

PANARO, M. A.; BRANDONISIO, O.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FUMAROLA, L.; MITOLO, V. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by prostaglandin E₂. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 1, p. 137-143, 2001.

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, p. 1365-1371, 2007.

PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; TOYAMA, M. H. The effect of phospholipase A₂ from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Parasitology Research**, v. 102, p. 1025-1033, 2008.

PEICHOTO, M. E.; TAVARES, F. L.; DEKREY, G.; MACKESSY, S. P. 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, p. 239-255, 2008.

REY, L. **Parasitologia**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

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

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

RODRIGUES, R. S.; SILVA, J. F.; BOLDRINI FRANÇA, J.; FONSECA, F. P. P.; OTAVIANO, A. R.; SILVA, F. H.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S. K.; DOS SANTOS, J. I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M. R. M.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and functional properties of Bp-

LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**, v. 91, p. 490-501, 2009.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; THWIN, M. M.; CHOW, T. K. V.; BOW, H.; YAP, E. H.; THONG, T. W. J. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A₂ enzymes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 650-659, 2007.

SILVA, V. X., 2004. The *Bothrops neuwiedi* complex, p. 410-422. In Campbell, J.A. & Lamar, W.W. (ed.). **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Comstock, Ithaca, London.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 2, p. 201-209, 2000.

SOUZA, J. R. F.; MONTEIRO, R. Q.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon**, v. 39, p. 787-792, 2001.

STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 142, p. 371-381, 2006.

STOCKER, K. Composition of snake venoms. In: STOCKER, K. P. (Ed.). **Medical Use of Snake Venom Proteins**. Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 33 - 56.

TEMPONE, A. G.; ANDRADE, H. F.; SPENCER, P. J.; LOURENÇO, C. O.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, p. 620-624, 2001.

TEMPONE, A. G.; MELHEM, M. S.; PRADO, F. O.; MOTOIE, G.; HIRAMOTO, R. M.; ANTONIAZZI, M. M.; HADDAD, C. F. B.; JARED, C. Amphibian secretions for drug discovery studies: a search for new antiparasitic and antifungal compounds. **Letters in drug discovery**, v. 4, p. 67-73, 2007.

TEMPONE, A. G.; PIMENTA, D. C.; LEBRUN, I.; SARTORELLI, P.; TANIWAKI, N. N.; ANDRADE JR, H. F.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon**, v. 52, p. 13-21, 2008.

TORRES, A. F. C.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; FILHO, E. D.; ZARA, F. J.; DE QUEIROZ, M. G. R.; NOGUEIRA, N. A. P.; DE OLIVEIRA, M. R.; TOYAMA, D. O.; 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, p. 795-804, 2010.

TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; TOMOKANE, T. Y.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; MARTINS, M. A. C.; MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, p. 47-57, 2006.

VALLE, A.L.; BRITES, V.L.C. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis* (Amaral, 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 10, n. 2, p. 155-161, 2008.

CAPÍTULO 2

Efeito de uma fosfolipase A₂ básica isolada da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*) sobre formas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*

Débora C. O. Nunes ^a, Dayane L. N. Souza ^a, Luiz Fernando M. Izidoro ^b, Eloísa A. V. Ferro ^c, Souza, M. A. ^d, Veridiana M. Rodrigues ^{a,e}, Kelly A. G. Yoneyama ^{a*}

^a Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, MG, Brasil; ^b Faculdade de Ciências Integradas do Pontal, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil; ^c Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil; ^d Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil; ^e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar), 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brasil.

***Endereço para correspondência:** Prof. Dr. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama
Tel.: +3432182203 Fax: +55 34 3218 2203#22, Endereço do laboratório: Avenida Pará, 1720 CEP: 38400-902 – Uberlândia, MG, Brasil. E-mail: kellyagy@ingeb.ufu.br.

Abreviaturas: acetonitrila (ACN), dimetil sulfoxido (DMSO), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico (HEPES), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), N-(1-naftil) etilenodiamino (NEED), dodecil sulfato de sódio (SDS), soro fetal bovino (SFB), ácido trifluoroacético (TFA).

Resumo

A leishmaniose é um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. O tratamento disponível atualmente para esta doença apresenta alta toxicidade, elevado custo, resistência do parasito, além de dificuldades de cura. Nesse sentido, o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento da leishmaniose torna-se indispensável e as peçonhas de serpente aparecem como importante fonte natural de biomoléculas farmacologicamente ativas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de uma fosfolipase A_2 (BnSP-7) cataliticamente inativa, da serpente *Bothropoides pauloensis*, sobre *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. BnSP-7 apresentou atividade contra as formas promastigota do parasito, tanto no teste de MTT, com percentual de viabilidade celular em torno de 60% para 200µg/mL de toxina, quanto na curva de crescimento, inibindo 60-70% da proliferação do parasito nas concentrações de 50-200 µg/mL da toxina após 72 horas de tratamento. Estudos ultraestruturais em promastigotas tratados com BnSP-7 revelaram inchaço mitocondrial, alteração nuclear, vacuolização, presença de acidocalcisomas, aspecto multiflagelar e efeito de 'blebbing' na membrana plasmática. Análises preliminares por SDS-PAGE mostraram que a toxina parece alterar o perfil protéico do parasito. Finalmente, BnSP-7 interferiu com a capacidade infectiva do promastigota em macrófagos peritoneais murinos, causando reduções estatisticamente significativas ($p < 0,05$) de aproximadamente 20-30% para as concentrações de toxina ensaiadas (25-200 µg/mL). Sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados por 72 horas com parasitos tratados com a toxina apresentaram produção aumentada de $TNF\alpha$, redução de IL-10 e discreto aumento de óxido nítrico. Tais dados sugerem que a BnSP-7 é uma importante ferramenta para a descoberta de novos alvos no parasito que possam ser explorados para o desenvolvimento de novas drogas para a terapêutica da leishmaniose.

Palavras-chave: fosfolipase A_2 básica; *Bothropoides pauloensis*; citotoxicidade, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Abstract

Leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoa of *Leishmania* genus. The currently available treatment for this disease presents high toxicity and cost, parasite resistance, and difficulties of healing. In this sense, the development of new strategies for treatment of leishmaniasis is indispensable and snake venoms appear as an important natural source of pharmacologically active biomolecules. The aim of this study was assess effects of a phospholipase A₂ (BnSP-7) catalytically inactive, from *Bothropoides pauloensis* snake venom, on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. BnSP-7 presented activity against promastigote forms of parasite, both MTT assay, with percentage of cell viability around 60% to 200µg/mL of toxin, and growth curve, inhibiting 60-70% of parasite proliferation at concentrations of 50-200 µg/mL of toxin after 72h of treatment. Ultrastructural studies in promastigotes treated with BnSP-7 revealed mitochondrial swelling, nuclear alteration, vacuolization, acidocalcisomes presence, multiflagellar aspect and blebbing effect in plasma membrane. SDS-PAGE preliminary analysis showed that toxin seems to alter the parasite protein profile. Finally, BnSP-7 interfered with infective capacity of promastigote in murine peritoneal macrophages, causing statistically significant reductions ($p < 0.05$) of approximately 20-30% for toxin concentrations tested (25-200 µg/mL). Culture supernatants of infected macrophages for 72h with toxin treated-parasites presented increased production of TNF- α , reduction of IL-10 and slight increase of nitric oxide. These data suggest that the BnSP-7 is an important tool for discovery of new targets in the parasite that can be exploited for development of new drugs for leishmaniasis treatment.

Keywords: basic phospholipase A₂; *Bothropoides pauloensis*; cytotoxicity, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*.

1. Introdução

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, os quais são transmitidos pela picada de um mosquito fêmea do gênero *Phlebotomus*. Durante o repasto sanguíneo, mosquitos infectados injetam a forma infectiva e flagelada, os promastigotas, no hospedeiro humano. As formas promastigota são fagocitadas por macrófagos e transformadas nas formas amastigota, aflagelada. Estas se multiplicam em células infectadas e afetam diferentes tecidos (MITROPOULOS et al., 2010). No caso da *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, o parasito afeta a pele causando lesões ulcerosas características da leishmaniose tegumentar americana (GREVELINK; LERNER, 1996; BASANO; CAMARGO, 2004; GARCÍA-ALMARGO, 2005).

As drogas indicadas para o tratamento da leishmaniose apresentam elevada toxicidade com significativos efeitos colaterais, alto custo e podem induzir resistência no parasito. Além disso, a terapia nem sempre é eficiente e existem dificuldades operacionais, tais como a necessidade de hospitalização e a via de administração das drogas (BALAÑA-FOURCE et al., 1998; GARCÍA-ALMARGO, 2005; MITROPOULOS et al., 2010). Tais limitações, apresentadas pelos medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento das leishmanioses, tem motivado a busca por novas abordagens terapêuticas.

Toxinas de peçonhas ofídicas são comumente usadas como ferramentas para desenho de drogas, tendo em vista a grande variedade de ações farmacológicas descritas para essas substâncias (TEMPONE et al., 2001). Da literatura, nós encontramos que a atividade microbida descrita para as peçonhas de serpentes tem sido associada às enzimas fosfolipase A_2 e/ou L-aminoácido oxidase (SAMY et al., 2007; CISCOTTO et al., 2009; TORRES et al., 2010). Fosfolipases A_2 tem apresentado atividade microbida *in vitro* contra fungos, parasitos e bactérias (BARBOSA et al., 2005; STÁBELI et al., 2006).

Fosfolipase A_2 (PLA₂, EC 3.1.1.4) é uma classe de enzimas definida pela habilidade de catalisar a hidrólise da ligação éster dos fosfolipídios na posição sn-2

produzindo ácidos graxos livres e lisofosfolipídios (VAN DEENEN; DE HAAS, 1963; DIAZ; ARM, 2003). São classificadas em 15 grupos com base no padrão de pontes dissulfeto, similaridade da sequência de aminoácidos e mecanismos catalíticos (SCHALOSKE; DENNIS, 2006), sendo que as PLA₂s de peçonhas ofídicas pertencem aos grupos I (Elapidae/Hydrophidae) e II (Viperidae/Crotalidae). O grupo II pode ser subdividido em dois principais subgrupos, dependendo do resíduo de aminoácido presente na posição 49 da estrutura primária: Asp-49 (D49), cataliticamente ativa, e Lys-49 (K49), com baixa ou nenhuma atividade enzimática (LOMONTE et al., 2003).

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito citotóxico de uma PLA₂ Lys-49 (básica) isolada da peçonha da serpente *Bothropoides pauloensis*, denominada BnSP-7 em formas promastigota de *L. (L.) amazonensis*, avaliando o efeito da toxina no crescimento, na viabilidade celular, na morfologia, no perfil protéico, bem como determinar o efeito da toxina na infectividade do promastigota em macrófagos peritoneais murinos, estimando a concentração de citocinas e a produção de óxido nítrico (NO) em culturas de macrófagos infectados.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Camundongos BALB/c (peso médio: 25-30g) foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia. Eles foram mantidos em gaiolas esterilizadas em um ambiente controlado (25±5 °C, ciclo de 12h dia/noite) e receberam água e ração *ad libitum*. Os procedimentos animais e protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Utilização Animal (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (Parecer 052/09).

2.2. Toxina

A fosfolipase A₂ (PLA₂) denominada de BnSP-7 foi isolada da peçonha de *Bothropoides pauloensis* de acordo com a metodologia descrita por Soares et al. (2000) com algumas modificações. Brevemente, a peçonha bruta de *Bothropoides pauloensis* foi dissolvida em tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05 M, pH 7,8 e, aplicada a uma coluna CM-Sepharose *fast flow*, a qual foi previamente equilibrada e inicialmente eluída com o mesmo tampão da amostra. Um gradiente foi aplicado até 0,5 M de AMBIC e frações de 1,0 mL/tubo foram coletadas a um fluxo de 6,5 mL/hora. A fração correspondente à BnSP-7 foi então submetida a cromatografia de fase reversa em uma coluna Shimadzu C₁₈, a qual foi equilibrada com solvente A (TFA 0,1% e ACN 5%) e eluída com um gradiente do solvente B (ACN 60% e TFA 0,1%) a um fluxo de 1,0 mL/minuto a temperatura ambiente.

A toxina foi solubilizada em DMSO (Sigma, St. Louis, MO, USA) para a obtenção de uma solução estoque (20 mg/mL), e armazenada a -20°C. Nos ensaios de citotoxicidade, a concentração mais alta testada no parasito foi de 200 µg/mL, e desse modo, a concentração final de DMSO no meio de cultura nunca excedeu 1% (v/v). Essa concentração de DMSO não interfere na proliferação dos parasitos (GRANTON et al., 2007; RODRIGUES et al., 2007; SANTOS et al., 2008; NETO et al., 2011).

2.3. Cultura de parasitos

As formas promastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas em meio Schneider (LGC Biotecnologia, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) inativado pelo calor, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) – Schneider completo - em B.O.D. a 23±0.5°C.

2.4. Ensaios de citotoxicidade

Para avaliar o efeito da toxina BnSP-7 na inibição do crescimento de formas promastigota de *L. (L.) amazonensis*, parasitos (5×10^6 células/mL) foram cultivados em garrafas de cultura contendo meio Schneider completo com concentrações crescentes da toxina (25 - 200 µg/mL de BnSP-7) a $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Alíquotas das culturas foram coletadas a cada 24 horas por um período de 96 horas para a determinação da densidade celular.

A viabilidade celular dos parasitos cultivados em presença da toxina BnSP-7 foi avaliada pelo método colorimétrico baseado na oxidação mitocondrial do reagente MTT (Sigma) como descrito por Mosmann (1983), com algumas modificações. Promastigotas da fase log de crescimento foram adicionados em meio Schneider completo. A suspensão de parasitos foi disposta em placas de cultura de 96 poços (1×10^6 parasitos/poço) e incubada a $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$ com concentrações crescentes de toxina (1,56 - 200 µg/mL de BnSP-7), por 72 horas. Após esse tempo, MTT (50µg/poço) foi adicionada à placa e procedeu-se a incubação por aproximadamente 4 horas a $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$ sob proteção da luz. Finalmente, isopropanol ácido (0,4mL de ácido clorídrico 10N para cada 100 mL de isopropanol; 100 µL/poço) foi adicionado para a dissolução dos grânulos de Formazan precipitados. A absorbância foi medida a 595 nm usando uma leitora de placas (BIOTEK EL800). Cada ensaio foi desenvolvido em triplicata e experimentos independentes foram realizados.

2.5. Análises morfológicas

Parasitos cultivados por 72 horas em presença da toxina (200 µg/mL) foram coletados por centrifugação ($950 \times g$, por 10 minutos, 4°C), lavados por três vezes em PBS, fixados com formaldeído 2% em PBS. Alíquotas de parasitos fixados foram dispostas em lamínulas de vidro, coradas com o kit Panótico Rápido (LB Laborclin, Brasil) e analisadas por microscopia óptica.

Para avaliar as alterações ultraestruturais, parasitos cultivados por 72h em presença de toxina (200 µg/mL) foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão. Após o tratamento com a toxina, os parasitos foram fixados por 2 horas a 4 °C em uma solução contendo glutaraldeído 2,5% em PBS. As células foram então lavadas no mesmo tampão e pós fixadas por 1 hora em uma solução contendo tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% e ferrocianeto de potássio a 0,8% em tampão PBS. Em seguida, as células foram desidratadas gradualmente em solução de acetona e embebidas em resina. Cortes ultrafinos foram corados com acetato de uranila e chumbo, e foram observados em microscópio eletrônico Zeiss EM 109.

2.6. Eletroforese e densitometria

Eletroforese em gel de poliacrilamida 13,5% na presença de SDS (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com Laemmli (1970). Os parasitos, tratados ou não com BnSP-7 (200 e 20 µg/mL) por 72 horas, foram lisados por 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em sonicator a 37°C na presença de tampão PBS com inibidor de proteases (EDTA 1 mM; benzamidina 1 mM; aprotinina 1 µg/mL; PMSF 1 mM; leupeptina 2 µg/mL). Posteriormente, os parasitos foram centrifugados por 30 minutos a 4 °C a 10.000 x g. O precipitado (10 µg) foi dissolvido em tampão com condições desnaturantes (SDS e β-mercaptoethanol 10%), aquecidos a 100°C por 5 minutos e submetidos a eletroforese. O peso das bandas foi estimado a partir de uma curva-padrão, em que a migração eletroforética relativa (em centímetros) foi colocada no eixo X e, o antilog da massa molecular no eixo Y. Assim, a estimativa da massa molecular foi realizada por meio da comparação da migração de proteínas de massa conhecida (marcador molecular) com aquelas de massa desconhecida. O marcador molecular utilizado foi: soroalbumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), α-lactalbumina (14,4 kDa). A densitometria foi realizada utilizando o software Scion Image 4.0.3.2.

2.7. Cultura de macrófagos peritoneais murinos

Macrófagos residentes foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c machos por lavagem com PBS gelado. As células coletadas foram lavadas três vezes com PBS gelado por centrifugação a 950 x g e ressuspensas em meio RPMI (HIMEDIA) suplementado com 10% de SFB, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), e HEPES 10 mM – RPMI completo. Aproximadamente 5×10^5 macrófagos peritoneais/poço foram distribuídos em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. As células que não aderiram às lamínulas foram removidas por lavagens com RPMI e as placas com os macrófagos aderidos foram incubadas a 37 °C em estufa de CO₂ (5% de CO₂).

2.8. Ensaio de infectividade em macrófagos peritoneais murinos

Macrófagos mantidos a 37 °C em estufa de CO₂ por 24 horas foram infectados com formas promastigota na fase estacionária previamente incubados com toxina (25, 100 e 200 µg/mL) por 72h, e com promastigotas controle na razão de 10:1 (parasitos:macrófago), e mantidos em temperatura ambiente por 1 hora. As placas foram lavadas com RPMI para a remoção de parasitos não internalizados. Meio RPMI completo foi adicionado aos poços e as placas foram incubadas a 37 °C em estufa de CO₂ por 24 e 72 horas. Após esses períodos de incubação, os sobrenadantes foram coletados para dosagem de citocinas e óxido nítrico (NO) e as lamínulas contendo macrófagos infectados com parasitos por 72 horas foram fixadas com formaldeído 2% em PBS e coradas com o kit Panótico Rápido (LB Laborclin). Os índices de infectividade foram determinados pela média do número de parasitos por macrófago multiplicado pela porcentagem de macrófagos contendo parasitos (infectados). Esses dados foram definidos a partir da contagem de 100 macrófagos/lamínula. Cada ensaio foi desenvolvido em triplicata e experimentos independentes foram realizados.

2.9. Dosagem de citocinas

Os níveis de IL-10 e TNF- α , ambas de camundongo, foram medidos em sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* previamente cultivados em presença ou ausência de BnSP-7, como descrito no item 2.8 de “Materiais e métodos”, nos tempos de 24 e 72h. Para as dosagens foram utilizados kits comerciais (BD OptEIA™) e os experimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de citocinas, em pg/mL, foram calculadas por interpolação da curva de regressão linear determinada a partir de quantidades conhecidas de citocinas recombinantes fornecidas pelo kit. Os limites de detecção foram de 0,976 pg/mL e 7,8 pg/mL para TNF- α e IL-10, respectivamente. Cada ensaio foi feito em triplicata e experimentos independentes foram realizados.

2.10. Produção de óxido nítrico

Para avaliar a ativação do macrófago induzida por parasitos pré-tratados com BnSP-7, a produção de óxido nítrico (NO) foi estimada pela acumulação de nitrito (NO₂), usando a reação de Griess (GREEN et al., 1982). Brevemente, 50 uL do reagente de Griess (sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ a 2,5% e NEED a 0,1% em H₃PO₄ a 2,5% (v/v)) foram adicionados a 50 uL de cada amostra (sobrenadante de cultura de macrófagos infectados) em placa de 96 poços. Uma curva padrão com concentrações conhecidas de NO₂, a partir de uma solução estoque de nitrito de sódio (NaNO₂) a 1 M, e um branco foram determinados. A absorbância foi medida a 595 nm usando uma leitora de placas (BIOTEK EL800). O conteúdo de NO₂ foi quantificado pela interpolação da curva padrão e os resultados foram expressos em concentração (μ M) de nitrito. A fim de evitar a interferência por nitritos possivelmente presentes no meio, o branco de cada experimento foi feito com o meio RPMI. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e experimentos independentes foram realizados.

2.11. Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão para cada grupo. Diferenças estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos foram avaliadas por ANOVA e confirmadas por teste de Bonferroni, quando apropriado. O programa utilizado foi o GraphPad Prism 5,0.

3. Resultados

3.1. Efeito da toxina BnSP-7 no crescimento e na viabilidade celular

A figura 1 sumariza a ação da toxina BnSP-7 no crescimento de formas promastigota de *L. (L.) amazonensis*. A toxina foi capaz de inibir o crescimento do parasito de forma dose-dependente. As inibições no crescimento foram mais efetivas para doses superiores a 50 $\mu\text{g/mL}$ de toxina e a partir de 72 horas de tratamento. Com 96 horas de tratamento, observamos inibições bem expressivas do crescimento, variando de 60-70% para as concentrações de 50-200 $\mu\text{g/mL}$. A viabilidade do parasito foi analisada pelo ensaio do MTT, método baseado na habilidade de parasitos viáveis em converter o reagente MTT em formazan. Todas as inibições de viabilidade foram estatisticamente significativas ($p < 0,01$) em relação ao controle, sendo que para a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, o percentual de viabilidade celular foi em torno de 60% (Fig. 2).

3.2. Efeito da toxina BnSP-7 na morfologia do promastigota

Os parasitos cultivados com BnSP-7 apresentaram alterações relevantes em suas características morfológicas. A análise por microscopia óptica mostrou presença de restos celulares, corpo do promastigota com forma arredondada e ora a presença de dois flagelos, ora um único flagelo curto (Fig. 3). A análise por

microscopia eletrônica de transmissão confirmou as alterações verificadas por meio da microscopia óptica e revelou detalhes adicionais, tais como: o efeito de 'blebbing' na membrana plasmática, núcleo com aspecto crenado, vacuolização, presença de acidocalcisomas, inchaço mitocondrial, perda de continuidade da membrana celular e de conteúdo citoplasmático (Fig. 4), os quais confirmam os efeitos deletérios da BnSP-7 na morfologia do promastigota.

3.3. Efeito da toxina BnSP-7 no perfil protéico do parasito

O perfil protéico dos parasitos cultivados em presença de 20 ou 200 µg/mL de BnSP-7 por 72 horas foi analisado por SDS-PAGE e comparado ao perfil protéico de parasitos controle (Fig. 5A). Parasitos tratados com 200 µg/mL de toxina mostraram um aumento das seguintes bandas protéicas: AP2 (> 100kDa), 18%; gp63 (63kDa), 7,8%; BP25 (~25kDa), 33%; BP16 (~16kDa), 1200%; e BP14 (~14kDa) aumentou 13% (Fig. 5B e C). Parasitos tratados com 20µg/mL de BnSP-7 mostraram alterações mais discretas no perfil protéico. É importante enfatizar que a expressão da banda BP16 apresentou um aumento relevante de 1200% nos parasitos tratados com 200 µg/mL de BnSP-7 em relação ao controle, o qual apresentou traços deste componente protéico. BP16 não foi detectada no perfil de proteínas de parasitos tratados com 20 µg/mL da toxina.

3.4. Efeito da toxina BnSP-7 na infectividade de promastigotas em macrófagos peritoneais murinos

Parasitos cultivados em meio de cultura na ausência ou presença de 25, 100 ou 200 µg/mL de toxina BnSP-7 por 72 horas foram adicionados a cultura de macrófagos peritoneais murinos e a infectividade foi calculada após 72 horas (ver material suplementar). A análise dos índices de infectividade mostrou que o cultivo dos promastigotas na presença de BnSP-7 inibiu significativamente a infectividade em culturas de macrófagos, quando comparada à dos promastigotas controle. Os

percentuais de inibição da infectividade variaram de 20-30% (Fig. 6), mostrando pequenas variações nas taxas de inibição para as concentrações testadas.

3.5. Produção de citocinas e de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados

Estudos preliminares quanto à produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos infectados, decorrentes do efeito da toxina BnSP-7 no parasito, mostraram que, após 24 horas de infecção, a produção de TNF- α ficou abaixo do limite de detecção. Porém, após 72 horas de infecção, o sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com parasitos tratados com 200 μ g/mL de BnSP-7 apresentou produção aumentada de TNF- α em comparação a produção da mesma citocina em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com parasitos controle. Mesmo assim, a análise estatística revelou que tal aumento não foi significativo (Fig. 7A). No que diz respeito à produção de IL-10 foi verificado, após 24 horas de infecção, um aumento na quantidade produzida desta citocina por macrófagos infectados com parasitos tratados com BnSP-7 em relação aos infectados com parasitos controle. Por outro lado, após 72 horas de infecção, foi observada uma reversão no perfil de produção da IL-10, e dessa forma, macrófagos infectados com parasitos tratados produziram menor quantidade desta citocina em comparação aos infectados com parasitos controle (Fig. 7B). A dosagem de NO revelou uma baixa produção de nitrito em cultura de macrófagos infectados, tanto por 24 horas quanto por 72 horas, sendo observado um discreto aumento na produção de NO no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com parasitos tratados por 72 horas de cultivo em relação aos parasitos controle (Fig. 7C). Também para esta dosagem, a análise dos resultados mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4. Discussão

Vários estudos envolvendo a ação de peçonhas ofídicas (FERNANDEZ-GOMES et al., 1994; TEMPONE et al., 2001; GONÇALVES et al., 2002; PASSERO et al., 2007; PEICHOTO et al., 2011) e suas toxinas isoladas, especialmente L-aminoácido oxidases (LAAOs) (TEMPONE et al., 2001; IZIDORO et al., 2006; TOYAMA et al., 2006; CISCOTTO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009; TORRES et al., 2010; NAUMANN et al., 2011; PAIVA et al., 2011) e fosfolipases A₂ (PLA₂s) (STÁBELI et al., 2006; COSTA et al., 2008; PASSERO et al., 2008; TORRES et al., 2010; PEICHOTO et al., 2011), em *Leishmania* sp., tem sido realizados. Entretanto, tais estudos, em sua maioria, avaliam o efeito da toxina na citotoxicidade em parasitos, ficando tais estudos restritos a ação da toxina na viabilidade celular, uma vez que o intuito é determinar o potencial de efeitos biológicos associado à toxina purificada e caracterizada. Assim, existem poucos dados sobre o efeito de toxinas na interação parasito-hospedeiro, bem como uma escassez de estudos voltados a elucidação do mecanismo de citotoxicidade, alterações bioquímicas e fisiológicas observadas no parasito. Convém enfatizar que, nenhum estudo, até o presente momento, mostrou alterações morfológicas decorrentes da ação de toxinas ofídicas em *Leishmania* sp.

Apesar de as LAAOs apresentarem um alto potencial citotóxico contra *Leishmania* sp., seu efeito parece estar relacionado à produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e não ao α-cetoácido gerado pela enzima (TEMPONE et al., 2001; TOYAMA et al., 2006; NAUMANN et al., 2011). Além do H₂O₂, amônia e um α-cetoácido constituem os produtos da reação catalítica dessa enzima, uma desaminação oxidativa estereoespecífica de L-aminoácido (CURTI et al., 1992). A observação de que a potente ação das LAAOs deve-se ao peróxido de hidrogênio é fruto de experimentos que mostram que parasitos tratados com LAAO na presença de catalase (enzima que degrada H₂O₂) apresentam alto índice de sobrevivência (TEMPONE et al., 2001; IZIDORO et al., 2006; TOYAMA et al., 2006; NAUMANN et al., 2011). Mesmo assim, o mecanismo de ação citotóxico dessa classe de enzima ainda não é completamente entendido. O que se sugere é que o estresse oxidativo

induzido pelo peróxido de hidrogênio poderia ativar proteínas de choque térmico, descritas em *Leishmania* sp., induzindo atividade proteolítica dentro da célula e afetando a função mitocondrial devido ao aumento na concentração de cálcio, o que leva à morte por apoptose (TEMPONE et al., 2001).

Nossos resultados mostraram que a BnSP-7, uma PLA₂, apresentou um efeito leishmanicida em formas promastigota de *L. (L.) amazonensis*, causando inibição no crescimento do promastigota e na ação das desidrogenases mitocondriais do parasito, como determinado pelo teste do MTT. Após 72 horas de tratamento, a BnSP-7 inibiu aproximadamente 60-70% da proliferação do parasito nas concentrações de 50-200 µg/mL da toxina, chegando a 65-70% para as concentrações 50-200 µg/mL da toxina após 96 horas de tratamento. Independente do tempo de crescimento as inibições foram dose-dependente. Concentrações mais baixas de toxina resultaram em uma menor inibição do crescimento, que, mesmo assim, foi dose-dependente. Outro aspecto relevante é que o efeito inibitório é também tempo-dependente, o que suporta a idéia de que o mecanismo de ação pode envolver a perturbação de algumas vias metabólicas importantes (LEDEZMA et al., 2002). Outros pesquisadores já haviam observado a ação da fosfolipase A₂ em promastigotas de *Leishmania* sp. MjTX-II, uma PLA₂ Lys-49 isolada de *Bothrops moojeni* reduziu cerca de 50% da viabilidade de *Leishmania* sp. quando na presença de 75 µg/mL da toxina (STÁBELI et al., 2006). Costa et al. (2008) testaram duas fosfolipases A₂ (MTX-I e II) de *Bothrops brazili* e seus respectivos peptídeos sintéticos derivados da região C-terminal das PLA₂s (pepMTX-I e pepMTX-II). Tanto a MTX-I, uma PLA₂ Asp-49, quanto a MTX-II, uma PLA₂ Lys-49 causaram inibições, de aproximadamente 90%, na viabilidade do parasito utilizando uma concentração de 100 µg/mL das toxinas, enquanto que os peptídeos causaram a morte de aproximadamente 70% das *Leishmania* sp. com 120µg/mL. Outro estudo, contrariamente, demonstrou que a PLA₂ enzimaticamente ativa da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* conseguiu estimular o crescimento das formas amastigota e promastigota de *L. (L.) amazonensis*, possivelmente, como sugerido pelos autores do trabalho, devido ao fato de PLA₂s serem fatores de progressão para

leishmaniose tegumentar (PASSERO et al., 2008). Torres et al. (2010) mostraram que uma PLA₂ Lys-49, BmarPLA₂, de *Bothrops marajoensis*, foi incapaz de inibir o crescimento desses parasitos. E, finalmente, Peichoto et al. (2011) verificaram que a PLA₂ Trimorphin, uma Asp-49 isolada de *Trimorphodon biscutatus lambda*, exibe um potente efeito citotóxico contra *Leishmania (L.) major*, sendo que 3,6 µg/mL de toxina reduziu 50% da viabilidade dos parasitos. Contrariamente, concentrações muito baixas de toxina causaram um estímulo à proliferação celular. Segundo os autores, isso poderia ser explicado pela resposta adaptativa das células a um estresse moderado. Sendo as PLA₂s importantes mediadores de complexas vias de sinalização intracelular, baixas concentrações destas enzimas conduziriam a um estímulo para o crescimento celular, enquanto que altas concentrações da enzima resultariam em dano direto à célula.

Esses achados sugerem que a atividade catalítica das PLA₂s, possivelmente, não é necessária para a ação anti-*Leishmania*. Diversos estudos têm demonstrado que a região C-terminal, compreendendo resíduos de aminoácidos nas posições 115 a 129, está relacionada aos efeitos citotóxico e bactericida das fosfolipases A₂, independentemente da atividade catalítica (PÁRAMO et al., 1998; RODRIGUES et al., 2004; STÁBELI et al., 2006; NEVALAINEN et al., 2008).

Neste trabalho mostramos que a toxina BnSP-7 causou um efeito citotóxico em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Além da ação inibitória no crescimento e na viabilidade celular, a toxina, sobretudo em altas concentrações, foi capaz de induzir diversas alterações morfológicas na estrutura do parasito. Tais alterações variaram de discretas à destruição total do parasito. Parasitos controle apresentaram ultraestrutura normal, mostrando corpo celular alongado típico, flagelo anterior, mitocôndria única contendo o cinetoplasto e núcleo normal (Figs 3 e 4).

A forma arredondada no corpo do promastigota, o efeito 'blebbing', o inchaço mitocondrial, a perda de continuidade da membrana e do conteúdo citoplasmático observados para parasitos cultivados com BnSP-7 indicam um relevante efeito da toxina na morfologia do promastigota. Outras indicações de mudanças morfológicas decorrentes da ação da toxina foram as alterações localizadas na região do núcleo.

A saber: aspecto crenado do núcleo (efeito picnótico) e organização alterada da cromatina, lembrando fortemente células apoptóticas. A apoptose é um tipo de morte celular programada que desempenha um papel central no desenvolvimento tecidual normal e na homeostase (PARIS et al., 2004; DEOLINDO et al., 2010; PAIVA et al., 2011). Envolve a externalização de fosfatidilserina, liberação de citocromo c com consequente ativação de proteases celulares e clivagem do DNA em fragmentos oligossomais. Tais eventos bioquímicos conduzem a mudanças características na morfologia celular e subsequente morte. Em *Leishmania* sp., as alterações celulares durante esse processo incluem arredondamento da célula, retração do citoplasma (picnose), condensação da cromatina, fragmentação nuclear, efeito 'blebbing' na membrana plasmática, inchaço mitocondrial (PARIS et al., 2004; MENNA-BARRETO et al., 2009; JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; PAIVA et al., 2011). Além disso, núcleo e mitocôndria alterados, provavelmente, estão entre os principais fatores que constituem a base para o efeito antiproliferativo e a perda da viabilidade celular em espécies de *Leishmania* (LEDEZMA et al., 2002).

Com relação à presença de mais de um flagelo, esse fenômeno também foi observado por Nakamura et al. (2006), quando eles trataram *L. (L.) amazonensis* com óleo essencial rico em eugenol de *Ocimum gratissimum*, e por Havens et al. (2000), em *L. (L.) donovani* exposta a inibidores de tubulina. A emergência dessas formas multiflagelares sugere uma interferência com o processo de divisão celular. Em tripanossomatídeos, os microtúbulos participam em quatro processos cruciais: (i) os microtúbulos subpeliculares estão envolvidos na manutenção estrutural dos protozoários; (ii) os flagelares estão associados à motilidade; (iii) os do corpo basal e fibras mitóticas estão relacionados à divisão celular; e (iv) os do citóstoma estão envolvidos na endocitose (MENNA-BARRETO et al., 2009).

Finalmente, as fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de parasitos cultivados em presença de BnSP-7 revelaram vacuolização e aumento no número de acidocalcisomas, as quais são organelas envoltas por membrana com conteúdo elétron-denso, caracterizadas por sua natureza ácida, alta densidade eletrônica e elevado conteúdo de polifosfatos (poliPs), cálcio, magnésio e outros

elementos. Essas organelas parecem estar envolvidas no armazenamento de fósforo (Pi, PPi e poli P), homeostase do pH intracelular e osmorregulação (DOCAMPO; MORENO,1999; 2001; MORENO; DOCAMPO, 2009).

Lesões ultraestruturais induzidas por drogas permitem fazer interpretações quanto ao modo de ação de drogas e a via de morte celular em protozoários patogênicos, tais como se seguem: alterações como formações tipo mielina e autofagossomo são indicativos de autofagia; efeito de 'blebbing' na membrana e alterações na cromatina indicam apoptose; e ruptura da membrana plasmática sugere necrose (MENNA-BARRRETO, 2009). Levando em consideração tais interpretações e de acordo com as observações apresentadas neste trabalho, pode-se supor que o mecanismo de citotoxicidade da toxina BnSP-7 envolva a ativação da apoptose em *L. (L.) amazonensis*. Entretanto, outras alterações morfológicas também podem sugerir efeito da toxina no ciclo celular do promastigota. De qualquer forma, a regulação e a modulação das vias de morte em *Leishmania* sp. são pouco entendidas (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010) e precisam ser mais bem estudadas para que seja possível o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e a elucidação dos mecanismos de citotoxicidade envolvidos na ação de diferentes drogas.

Com vistas para a infectividade, pôde-se notar diminuição estatisticamente significativa no índice de infectividade de parasitos cultivados com BnSP-7 por 72 horas, para todas as concentrações ensaiadas, sendo que os percentuais de inibição da infectividade variaram de 20-30% para as concentrações testadas. A inibição na infectividade em macrófago por parasitos cultivados na presença de BnSP-7 pode ser decorrente das alterações morfológicas observadas nos promastigotas. Além disso, é possível que a inibição na infectividade não tenha sido maior em virtude do aumento na expressão da proteína gp63 (em torno de 7%, quando o promastigota foi tratado com 200 µg/mL de BnSP-7), uma importante metaloprotease envolvida na infectividade (ALEXANDER; RUSSEL, 1992; BRITTINGHAM et al, 1995). Ainda, uma proteína com massa em torno de 25kDa, a BP25, teve um aumento de 33% na sua expressão. Um estudo sobre a expressão diferencial de proteases e polipeptídeos de superfície celular em promastigotas virulentos e não virulentos de *L. (L.)*

amazonensis propõe que componentes protéicos representados, principalmente, pelas massas 63, 50 e 25-27kDa foram mais expressos em promastigotas virulentos (SOARES et al., 2003). Entretanto, outro componente protéico, BP16, altamente expresso em parasitos tratados com 200 µg/mL de BnSP-7, sugere que a toxina possa estar causando outros efeitos em componentes da membrana do promastigota, o que resultaria em interferencia no processo de infectividade. Convém salientar ainda que a proteína BP14, com expressão aumentada após tratamento do parasito com 200 µg/mL de BnSP-7, não corresponde a toxina, pois apesar de a BnSP-7 apresentar massa molecular aparente de 14 kDa quando reduzida (SOARES et al., 2000), esta banda também está presente em parasitos controle.

Os macrófagos são as principais células hospedeiras na leishmaniose e desempenham uma importante função no controle imunológico de parasitos intracelulares por meio da produção de citocinas e metabólitos de oxigênio (BALARAMAN et al., 2004). Sendo assim, nós decidimos mensurar a quantidade de TNF- α (citocina pró-inflamatória), IL-10 (citocina antiinflamatória) e óxido nítrico (NO) liberados pelo macrófago com o intuito de avaliar se o pré-tratamento de promastigotas com a toxina Bnsp7 alteraria a resposta celular do macrófago, durante a infecção e estabelecimento do parasito na célula hospedeira.

Os primeiros estudos, particularmente com *L. (L.) major*, definiram o paradigma Th1/Th2 de resistência e susceptibilidade à infecção, estabelecendo que uma resposta imune protetora contra leishmaniose, tanto cutânea (causada por *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* ou *L. (L.) amazonensis*) quanto visceral (causada por *L. (L.) donovani*), depende do desenvolvimento de uma potente imunidade do tipo 1 (Th1). Assim, uma resposta predominantemente Th1 é um bom prognóstico para o controle da infecção, enquanto que uma resposta predominantemente Th2 usualmente traduz a exacerbação da doença (ALEXANDER; BRYSON, 2005). Tal paradigma é caracterizado por um perfil específico de citocinas secretadas por linfócitos T auxiliares (Th), sendo que a resposta Th1 produz interferon- γ (IFN- γ), IL-12, TNF- α e, a Th2 libera IL-4, IL-5, IL-10, dentre outros mediadores (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; PEREIRA; ALVES, 2008).

Neste estudo mostramos que culturas de macrófagos infectados por 24 horas, tanto com parasitos controle quanto com parasitos tratados, não produziram TNF- α , e que neste mesmo tempo de infecção foi observado um aumento na produção de IL-10 para os macrófagos infectados com parasitos tratados com BnSP-7 em relação ao controle, e a produção de NO foi baixa e comparável ao controle. Após 72 horas de incubação foi verificado, em macrófagos infectados com parasitos tratados, um discreto aumento na produção de TNF- α , que foi acompanhado pelo aumento na produção de NO e uma diminuição na liberação de IL-10 em relação ao controle.

Sabe-se que a IL-10 é produzida por muitos tipos celulares, como células T, monócitos e macrófagos e é um potente imunossupressor das funções dos macrófagos. Esta citocina diminui a expressão do MHC classes I e II, afetando a apresentação de antígeno, e reduz a transcrição e tradução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-12 e IL-18 dos macrófagos. Ainda, a IL-10 suprime a indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que catalisa a produção de NO, o radical livre leishmanicida. Assim, a IL-10 é uma citocina crítica na determinação da susceptibilidade do hospedeiro à infecção por *Leishmania* sp. e em modelos murinos de leishmaniose cutânea e visceral, a IL-10 contribui para a progressão da doença (BHARDWAJ et al., 2010). Por outro lado, o TNF- α é produzido predominantemente por macrófagos e tem o papel de defesa contra patógenos intracelulares (KORNER et al., 2010). Esta citocina age em sinergismo com o IFN- γ induzindo a produção de óxido nítrico e, consequentemente, contribui para a morte do amastigota dentro do macrófago (LIEW et al., 1990). A produção de óxido nítrico, desde 1988, é considerada um dos principais mecanismos microbicidas em macrófagos murinos (PANARO et al., 2001). Entretanto, evidências sugerem que *L. (L.) amazonensis* é capaz de inibir a produção de NO em certos tipos de macrófagos murinos, sendo que esta redução ocorre concomitantemente à diminuição da atividade da iNOS (BALESTIERI et al., 2002).

Dessa forma, podemos sugerir que nas primeiras 24 horas de infecção, parasitos cultivados com BnSP-7 iniciaram um processo de modulação da resposta na célula hospedeira, no sentido de suprimir as funções de defesa do macrófago

contra o patógeno, e que tal supressão foi maior do que a causada por parasitos controle, uma vez que a produção de IL-10 foi maior para macrófagos infectados com parasitos tratados. Talvez, a supressão das funções do macrófago observada nas primeiras 24 horas de infecção com parasitos tratados esteja relacionada com o aumento na expressão da metaloprotease gp63, tendo em vista que está descrito o envolvimento desta protease na redução da atividade de AP-1, um fator de transcrição que regula a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e óxido nítrico (CONTRERAS et al, 2010). Assim, o parasito tratado conseguiria, em um primeiro momento, subverter a resposta da célula hospedeira e, passado as 72 horas de infecção, o macrófago iniciaria suas funções de defesa contra o parasito, como sugerido pelas alterações no perfil de produção de IL-10, TNF- α e NO observadas após 72 horas de infecção. Supõe-se que os efeitos da toxina no parasito o impediram de manter a modulação no macrófago em favor da infecção.

De qualquer forma, estudos mais detalhados precisam ser realizados para um melhor entendimento dos efeitos biológicos e moleculares da toxina BnSP-7 em *L. (L.) amazonensis* e, neste sentido, perspectivas futuras incluem: investigação de proteínas-alvo e vias envolvidas no processo de morte das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, da infectividade *in vivo*, bem como da resposta imune associada à infectividade *in vivo* e *in vitro*, testando outros mediadores, diferentes condições de tratamento, dentre outros.

5. Conclusão

No presente trabalho, nós mostramos que a BnSP-7, uma fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *B. pauloensis*, apresenta uma atividade anti-*Leishmania* contra as formas promastigota. A toxina mostrou-se capaz de inibir o crescimento do promastigota, alterar o perfil protéico e promover drásticas modificações na morfologia do parasito. Além disso, os estudos de infectividade mostraram que a toxina reduziu a capacidade infectiva do promastigota, confirmando o efeito da toxina

também na interação do parasito com a célula hospedeira. Estes dados iniciais servirão como norte para estudos futuros visando elucidar as alterações bioquímicas envolvidas no mecanismo de citotoxicidade da toxina BnSP-7 e que, posteriormente, servirão como protótipo para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da leishmaniose.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. Ademais, agradecemos às professoras doutoras Amélia Hamaguchi e Maria Inês Homsí Brandeburgo pelos valiosos ensinamentos, incentivo e confiança. Declaramos não haver conflito de interesse.

Referências

ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Advances in Parasitology**, v. 31, p. 175-254, 1992.

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

BALAÑA-FOURCE, R.; REGUERA, R.M.; CUBRÍA, J.C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of Leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BALARAMAN, S.; TEWARY, P.; SINGH, V. K.; MADHUBALA, R. *Leishmania donovani* induces interferon regulatory factor in murine macrophages: a host defense response. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 30, p. 639-647, 2004.

BALESTIERI, F. M. P.; QUEIROZ, A. R. P.; SCAVONE, C.; COSTA, V. M. A.; BARRAL-NETTO, M.; ABRAHAMSOHN, I. A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 23-29, 2002.

BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; HAYT, A.; TOYAMA, O.; EVANGELISTA, J. S. M.; FERREIRA, D. P. P.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; TOYAMA, M. H.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 46, 376-386, 2005.

BHARDWAJ, S.; SRIVASTAVA, N.; SUDAN, R.; SAHA, B. *Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-13, 2010.

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

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 121-134, 1998.

BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C. J.; MCMASTER, W. R.; MCGWIRE, B. S.; CHANG, K. P.; MOSSER, D. M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **Journal of Immunology**, v. 155, n. 6, p. 3102-11, 1995.

CISCOTTO, P.; AVILA, R. A. M.; COELHO, E. A. F.; OLIVEIRA, J.; DINIZ, C. G.; FARIAS, L. M.; DE CARVALHO, M. A. R.; MARIA, W. S.; SANCHEZ, E. F.; BORGES, A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, p. 330-341, 2009.

CONTRERAS, I.; GÓMEZ, M. A.; NGUYEN, O.; SHIO, M. T.; MCMASTER, R. W.; OLIVIER, M. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 10, p. 1-14, 2010.

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; OLIVEIRA, C. Z.; SANTOS-FILHO, N. A.; TEIXEIRA, S. S.; NOMIZO, A.; FULY, A. L.; MONTEIRO, M. C.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; STÁBELI, R. G.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, p. 1645-1656, 2008.

CURTI, B.; RONCHI, S.; SIMONETTA, P.M. D- and L-amino acid oxidases. In: MÜLLER, F. (Ed.). **Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes**. Boca Raton: CRC Press, 1992, p. 69-94.

DEOLINDO, P.; TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. L-amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. **Toxicon**, v. 56, p. 944-955, 2010.

DIAZ, B. L.; ARM, J. P. Phospholipase A₂. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essencial Fatty Acids**, v. 69, p. 87 - 97, 2003.

DOCAMPO, R; MORENO, S. N. J. Acidocalcisome: a novel Ca²⁺ storage compartment in Trypanosomatids and Apicomplexan parasites. **Parasitology Today**, v. 15, n. 11, p. 443-448, 1999.

DOCAMPO, R; MORENO, S. N. J. The acidocalcisome. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 33, p. 151-159, 2001.

FERNANDEZ-GOMES, R.; ZERROUK, H.; SEBTI, F.; LOYENS, M.; BENSLIMANE, A.; OUAISSI, M. A. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: Preliminary identification of proteins from *Cerastes cetrastes* venom which interact with the parasites. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 875-882, 1994.

GARCÍA-ALMAGRO, D. Leishmaniasis cutánea. **Actas Dermo-sifiliográficas**, v. 96, n. 1, p. 1-24, 2005.

GONÇALVES, A. R.; SOARES, M. J.; SOUZA, W.; DE DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. Ultra structural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Parasitology Research**, v. 88, p. 598-602, 2002.

GRANTHON, A. C.; BRAGA, M. V.; RODRIGUES, J. C. F.; CAMMERER, S.; LORENTE, S. O.; GILBERT, I. H.; URBINA, J. A.; SOUZA, W. Alterations on the growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* induced by squalene synthase inhibitors. **Veterinary Parasitology**, v.146, p. 25-34, 2007.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOR, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and 15N nitrate in biological fluids. **Analysis Biochemical**, v. 126, p. 131-138, 1982.

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

HAVENS, C. G.; BRYANT, N.; ASHER, L.; LAMOREAUX, L.; PERFETTO, S.; BRENDLE, J. J.; WERBOVETZ, K. A. Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemistry Parasitology**, v. 110, p. 223-236, 2000.

IZIDORO, L. F. M.; RIBEIRO, M. C.; SOUZA, G. R. L.; SANT'ANA, C. D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GOULART, L. R.; BELEBONI, R. O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 7034-7043, 2006.

JIMÉNEZ-RUIZ, A.; ALZATE, J. F.; MACLEOD, E. T.; LÜDER, C. G. K.; FASEL, N.; HURD, H. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 104, p. 1-15, 2010.

KÖRNER, H.; MCMORRAN, B.; SCHLÜTER, D.; FROMM, P. The role of TNF in parasitic diseases: Still more questions than answers. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 879-888, 2010.

LAEMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEDEZMA, E.; JORQUERA, A.; BENDEZÚ, H.; VIVAS, J.; PÉREZ, G. Antiproliferative and leishmanicidal effect of ajoene on various *Leishmania* species: ultrastructural study. **Parasitology Research**, v. 88, p. 748-753, 2002.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **Journal of Immunology**, v. 145, p. 4306-10, 1990.

LIEW, F. Y.; WEI, X.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as ejector molecules against parasitic infections. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B**, v. 352, p. 1311-1315, 1997.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, 885-901, 2003.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; SALOMÃO, K.; DANTAS, A. P.; SANTA-RITA, R. M.; SOARES, M. J.; BARBOSA, H. S.; DE CASTRO, S. L. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron**, v. 40, p. 157-168, 2009.

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

MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, 3, p. 208-213, 2009.

MOSMANN, T. J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Immunomethods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAKAMURA, T. U.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; MAZA, P. K.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. S. S.; LOPES, A. H. C. S.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of Eugenol rich oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, p. 99-105, 2006.

NAUMANN, G. B.; SILVA, L. F.; FARIA, G.; RICHARDSON, M.; EVANGELISTA, K.; KOHLHOFF, M.; GONTIJO, C. M. F.; NAVDAEV, A.; DE REZENDE, F. F.; EBLE, J. A.; SANCHEZ, E. F. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 7, p. 683-694, 2011.

NEVALAINEN, T. J.; GRAHAM, G.G.; SCOTT, K.F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. Review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1781, p. 1-9, 2008.

NETO, R. L. M.; SOUSA, L. M. A.; DIAS, C. S.; BARBOSA FILHO, J. M.; OLIVEIRA, M. R.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. **Experimental Parasitology**, v.127, p. 215-221, 2011.

PAIVA, R. M. A.; FIGUEIREDO, R. F.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; BIANCHI, M. L. P.; RODRIGUES, K. C.; LUCARINI, R.; CAETANO, R. C.; PIETRO, R. C. L. R.;

MARTINS, C. H. G.; DE ALBUQUERQUE, S.; 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.

PANARO, M. A.; BRANDONISIO, O.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FUMAROLA, L.; MIT, V. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by prostaglandin E2. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 1, p. 137-143, 2001.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDA, J.; BENGOCHEA, J.A.; GORVEL, J.P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom - synthetic Lys49 myotoxin II-(115–129)-peptide identifies its bactericidal region. **European Journal of Biochemistry**, v. 253, p. 452-461, 1998.

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BRÉARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 852-859, 2004.

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, p. 1365-1371, 2007.

PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; TOYAMA, M. H. The effect of phospholipase A₂ from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Parasitology Research**, v. 102, p. 1025-1033, 2008.

PEICHOTO, M. E.; TAVARES, F. L.; DEKREY, G.; MACKESSY, S. P. 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**, 2011. *In press*, doi:10.1016/j.toxicon.2011.04.018.

PEREIRA, B. A. S.; ALVES, C.R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 239-255, 2008.

RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R. S.; DE ARAÚJO, A.L.; MALTA-NETO, N. R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, p. 305-314, 2004.

RODRIGUES, J. C. F.; BERNARDES, C. F.; VISBAL, G.; URBINA, J. A.; VERCESIE, A. E.; SOUZA, W. Sterol methenyl transferase Inhibitors alter the ultrastructure and function of the *Leishmania amazonensis* mitochondrion leading to potent growth inhibition. **Protist**, v. 158, p. 447-456, 2007.

RODRIGUES, R. S.; SILVA, J. F.; BOLDRINI FRANÇA, J.; FONSECA, F. P. P.; OTAVIANO, A. R.; SILVA, F. H.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S. K.; DOS SANTOS, J. I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M. R. M.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**, v. 91, p. 490-501, 2009.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; THWIN, M. M.; CHOW, T. K. V.; BOW, H.; YAP, E. H.; THONG, T. W. J. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A₂ enzymes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 650-659, 2007.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 204-208, 2008.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, p. 1246 - 1259, 2006.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, 2, p. 201-209, 2000.

SOARES, R. M. A.; SANTOS, A. L. S.; BONALDO, M. C.; ANDRADE, A. F. B.; ALVIANO, C. S.; ANGLUSTER, J.; GOLDENBERG, S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in

avirulent and virulent Promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 104, p.104-112, 2003.

STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 142, p. 371-381, 2006.

TEMPONE, A. G.; ANDRADE, H. F.; SPENCER, P. J.; LOURENÇO, C. O.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, p. 620-624, 2001.

TORRES, A. F. C.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; FILHO, E. D.; ZARA, F. J.; DE QUEIROZ, M. G. R.; NOGUEIRA, N. A. P.; DE OLIVEIRA, M. R.; TOYAMA, D. O.; 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, p. 795-804, 2010.

TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; TOMOKANE, T. Y.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; MARTINS, M. A. C.; Monteiro, H. S. A.; Fonteles, M. C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, p. 47-57, 2006.

VAN DEENEN, L.L.M., de Haas, G.H. The substrate specificity of phospholipase A₂. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 70, 538-553, 1963.

Legendas

Figura 1. Efeito da toxina BnSP-7 no crescimento de formas promastigota de *L. (L.) amazonensis*. O gráfico mostra o perfil de crescimento de parasitos cultivados na presença de concentrações crescentes da toxina BnSP-7 (25-200 µg/mL) por até 96 horas. A tabela apresenta os valores das porcentagens de crescimento dos parasitos em relação ao controle (100% de crescimento). * Diferença significativa em relação ao controle com $p < 0,001$.

Figura 2. Efeito da toxina BnSP-7 na viabilidade de formas promastigota de *L. (L.) amazonensis*. A viabilidade de parasitos cultivados por 72 horas em presença de concentrações crescentes de toxina BnSP-7 foi analisada pelo método colorimétrico baseado na oxidação mitocondrial do reagente MTT. O gráfico apresenta as porcentagens de viabilidade celular dos parasitos cultivados com BnSP-7 em relação aos parasitos controle (viabilidade de 100%). * Diferença significativa em relação ao controle com $p < 0,01$.

Figura 3. Microscopia óptica de formas promastigota de *L. (L.) amazonensis* cultivadas em presença da toxina BnSP-7. Os parasitos foram cultivados por 72 horas em presença de 200 µg/mL de BnSP-7, fixados e corados com kit Panótico rápido. As imagens mostram a morfologia característica de parasitos controle **(A)** e alterações na morfologia de parasitos cultivados em presença de BnSP-7 **(B)**. As setas brancas indicam duplos flagelos, arredondamento do corpo do promastigota e flagelo único e curto.

Figura 4. Análise ultraestrutural de formas promastigota de *L. (L.) amazonensis* cultivadas em presença de toxina BnSP-7. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão mostram parasitos controle **(A - D)** e parasitos cultivados em presença de 200 µg/mL de BnSP-7 por 72 horas **(E - N)**. As setas indicam um único flagelo **(B, D)**, o efeito 'blebbing' na membrana **(E - G)**, presença de dois flagelos no bolso flagelar **(I, J)**, acidocalcisomas **(N)**. As letras minúsculas indicam: **a** – acidocalcisoma; **f** – flagelo; **m** – mitocôndria; **n** – núcleo; **v** – vacúolo.

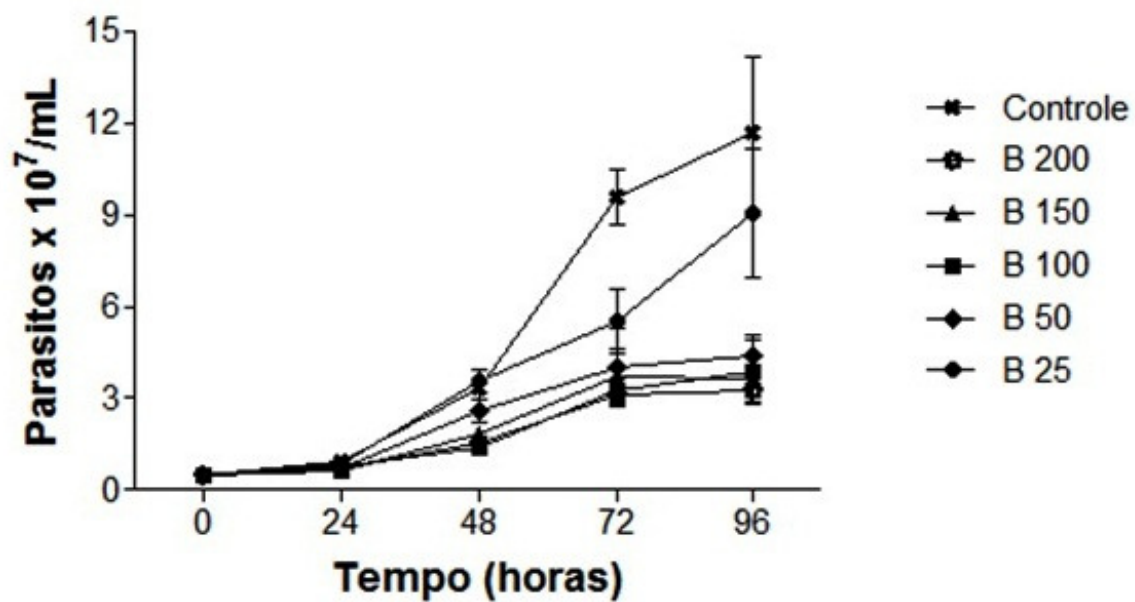
Figura 5. Perfil protéico de formas promastigota de *L. (L.) amazonensis* cultivadas em presença de toxina BnSP-7. **(A)** Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 13,5%

mostrando o perfil protéico de parasitos controle (C), parasitos cultivados com 200 µg/mL (B200) e 20 µg/mL (B20) de BnSP-7 por 72 horas. **(B)** Gráfico mostrando as áreas dos picos de cada banda resultante da densitometria dos componentes protéicos observados por SDS-PAGE. **(C)** Tabela contendo a porcentagem de aumento (+) ou diminuição (-) na expressão da proteína. AP – banda de alto peso; BP – banda de baixo peso; gp63, glicoproteína de 63 kDa; Padrão, padrão de peso molecular.

Figura 6. Efeito da toxina BnSP-7 na infectividade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos peritoneais murinos. **(A)** O gráfico apresenta os índices de infectividade em macrófagos peritoneais murinos para promastigotas controle, e promastigotas cultivados por 72 horas em presença de diferentes concentrações de BnSP-7 (200, 100 e 25 µg/mL; B200, B100 e B25, respectivamente). O índice de infectividade foi calculado como a média do número de parasitos por macrófago multiplicado pela porcentagem de macrófagos infectados, contando 100 macrófagos por lamínula (n = 3). * Diferença significativa em relação ao controle com $p < 0.05$. **(B)** A tabela mostra a média do percentual de inibição da infectividade de macrófagos por formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* previamente tratadas com BnSP-7 em relação ao controle. # Diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$.

Figura 7. Produção de TNF- α **(A)**, IL-10 **(B)** e óxido nítrico **(C)** por macrófagos peritoneais murinos infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Os macrófagos foram infectados com promastigotas previamente tratados ou não (controle) com a toxina BnSP-7 em diferentes concentrações (200 ou 100 µg/mL; B 200 e B 100, respectivamente). Os sobrenadantes da cultura de macrófagos infectados foram submetidos a dosagens de TNF- α e IL-10, utilizando a técnica de ELISA, e a quantidade de óxido nítrico foi estimada a partir da produção de nitrito, por meio da reação de Griess. Valores iguais a zero foram atribuídos a níveis de citocina abaixo do limite de detecção do kit.

Figura 1



Tempo (h)/ Amostra (%)	Controle	B 200	B 150	B 100	B 50	B 25
24	100	74,9±5,7*	70,9±4,0*	83,6±4,6*	76,8±3,5*	93,5±6,8
48	100	47,0±2,2*	55,0±4,8*	42,3±1,8*	78,2±12,4*	96,4±4,3
72	100	32,9±0,4*	39,0±9,0*	33,9±4,3*	42,4±13,4*	58,0±10,8*
96	100	32,5±3,5*	31,3±0,9*	34,1±8,9*	37,7±5,7*	75,3±15,1*

Figura 2

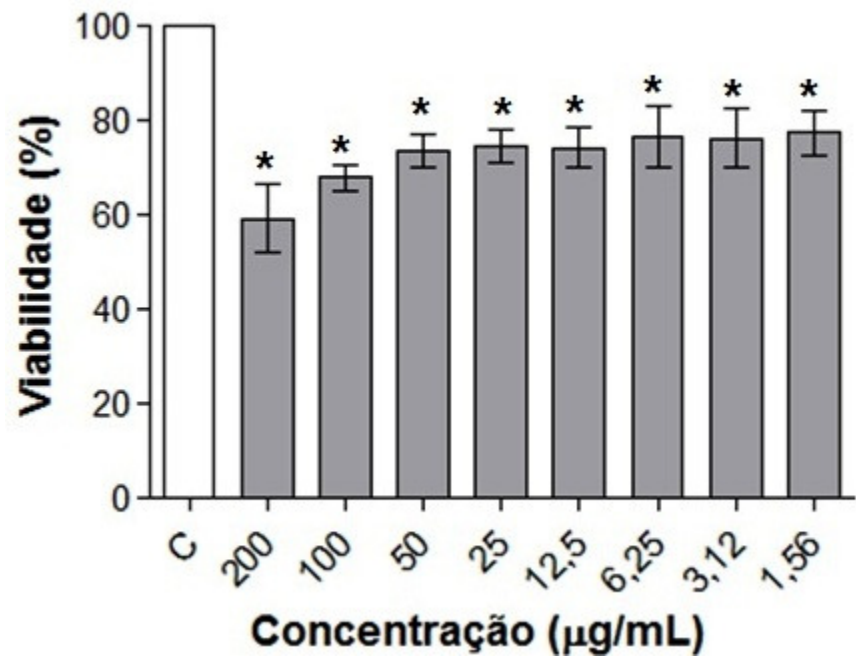
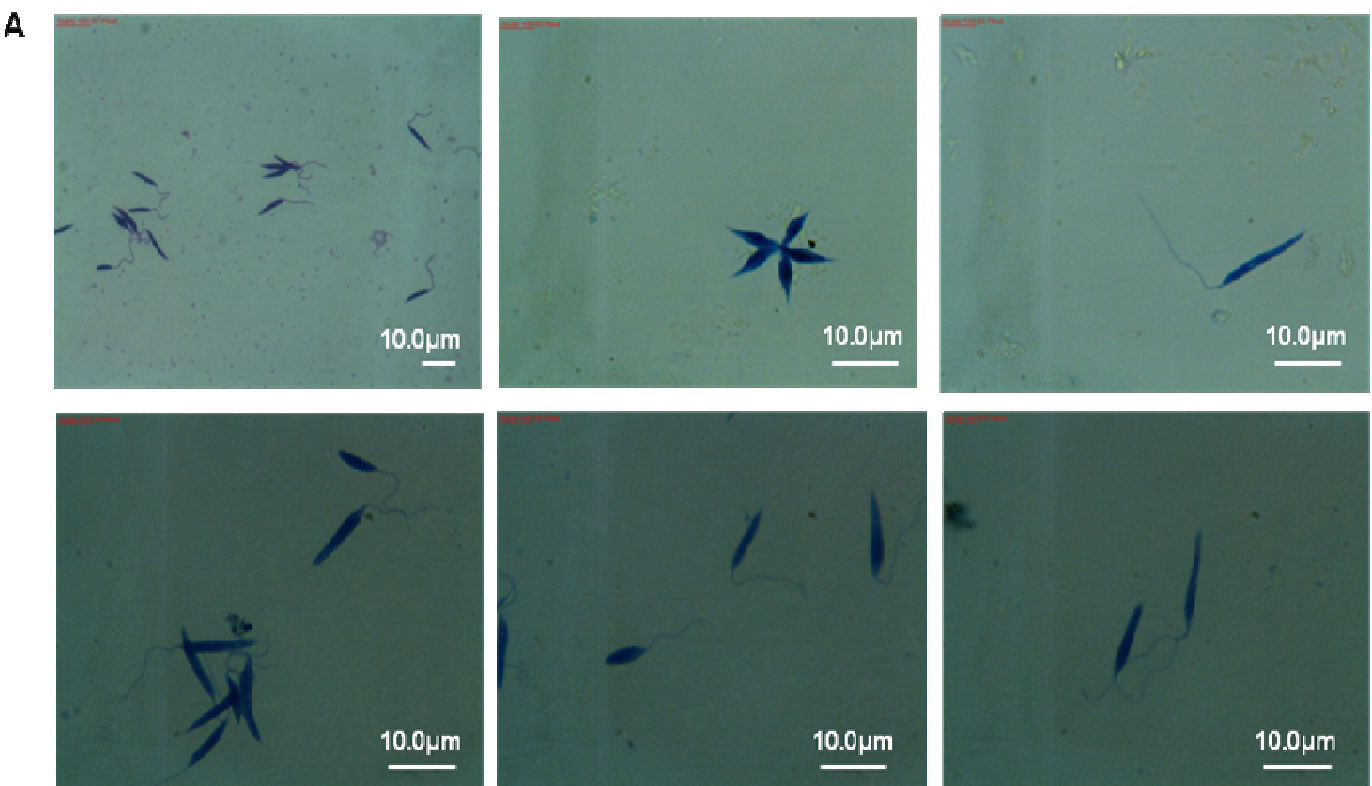


Figura 3



B

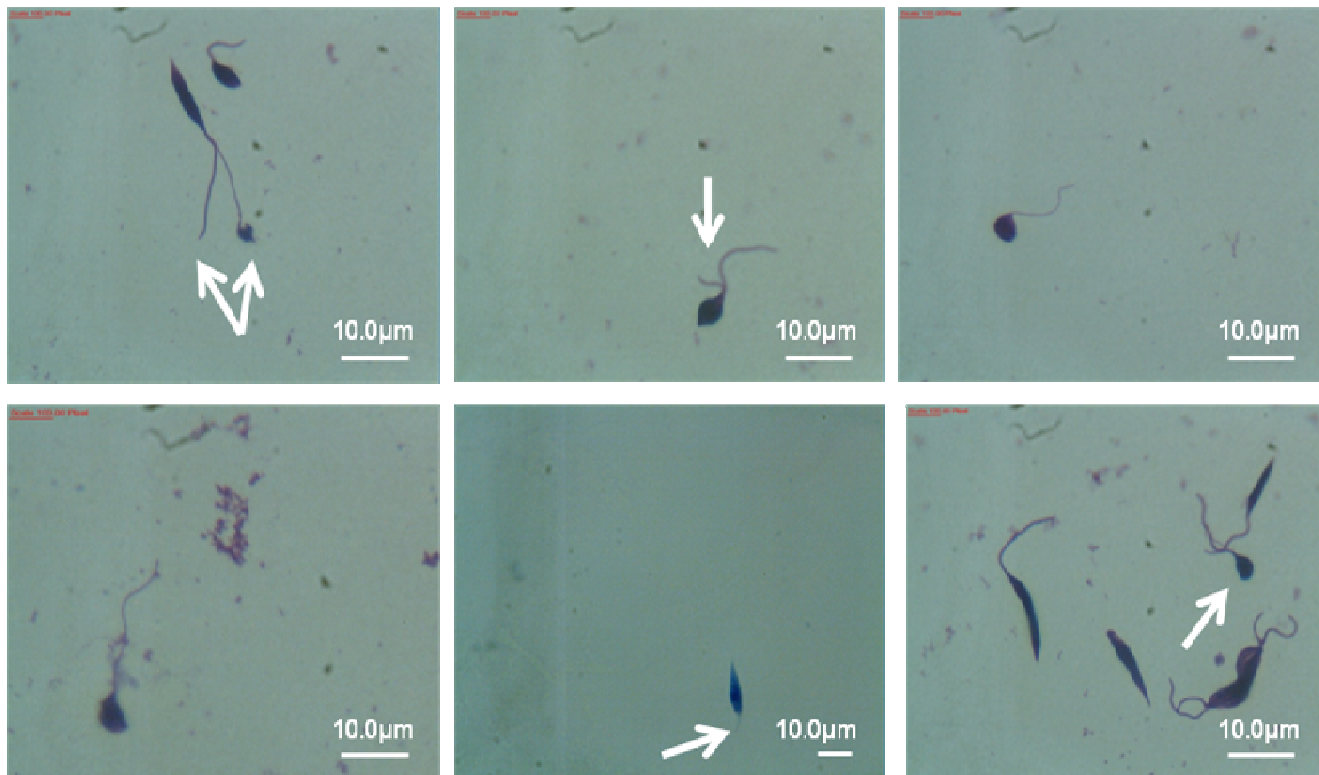
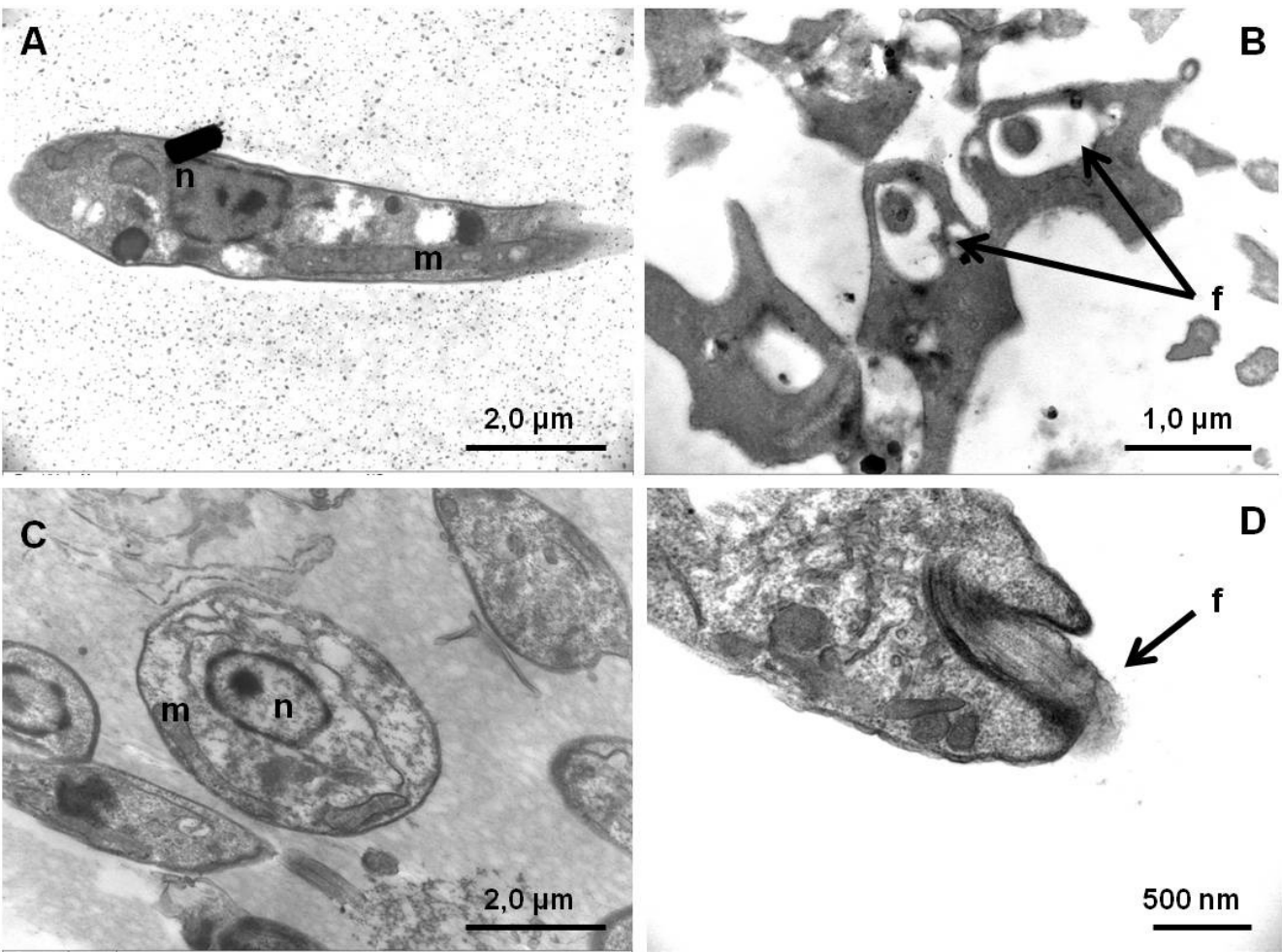
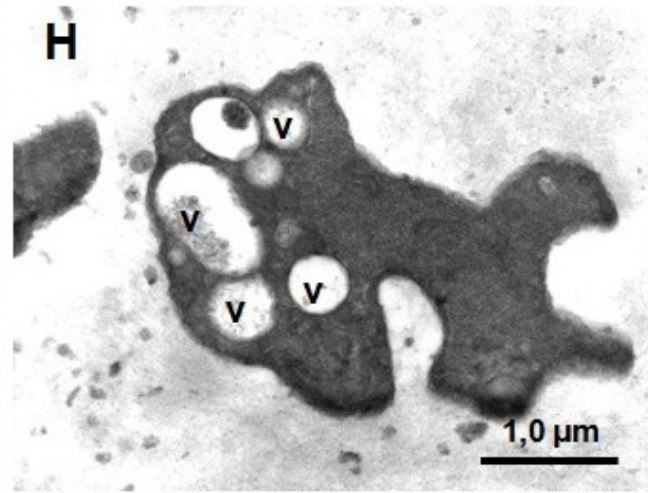
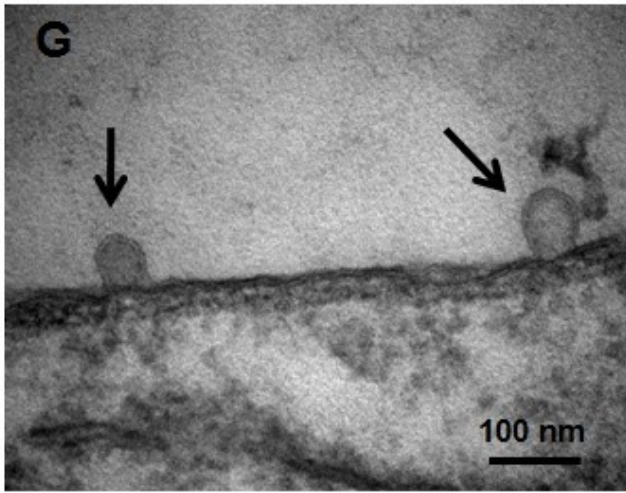
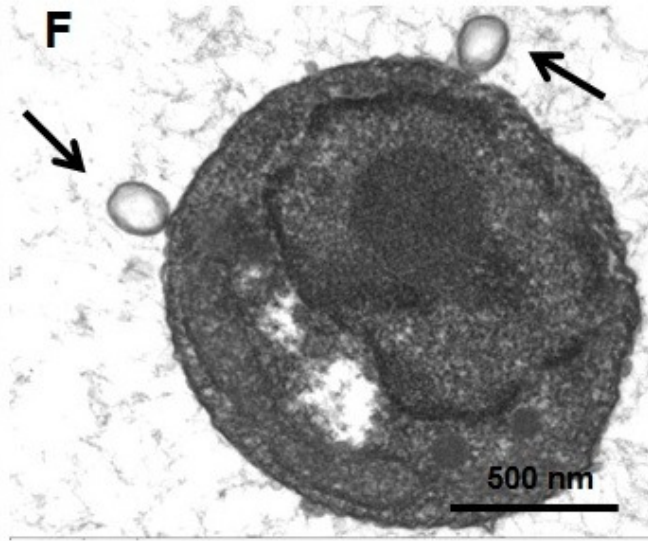
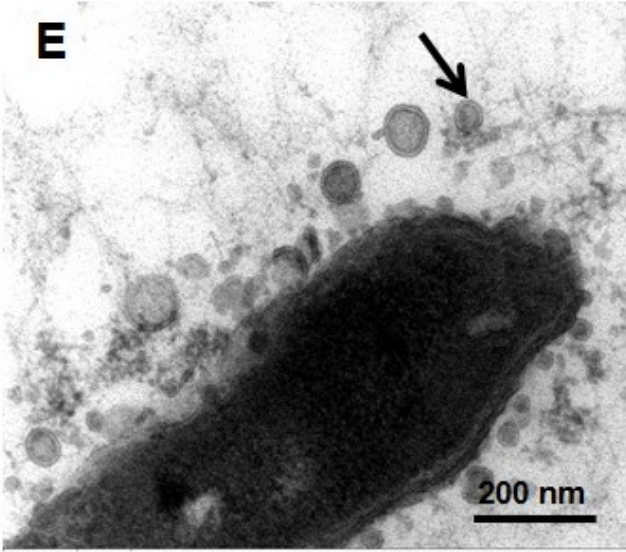
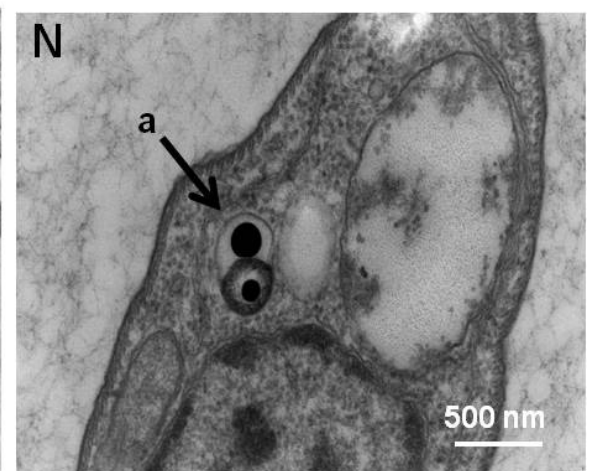
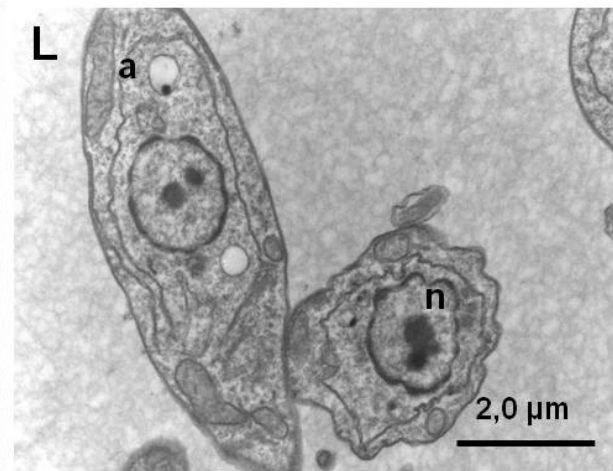
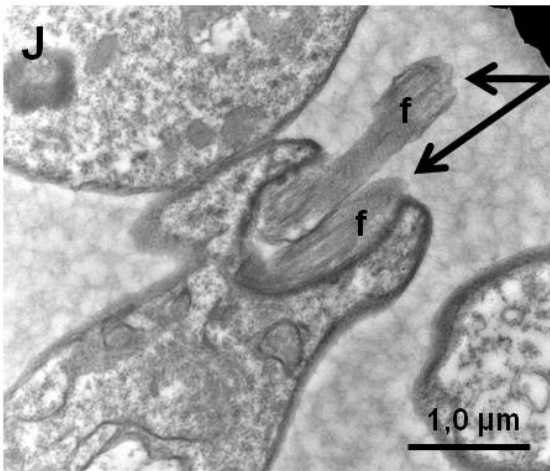
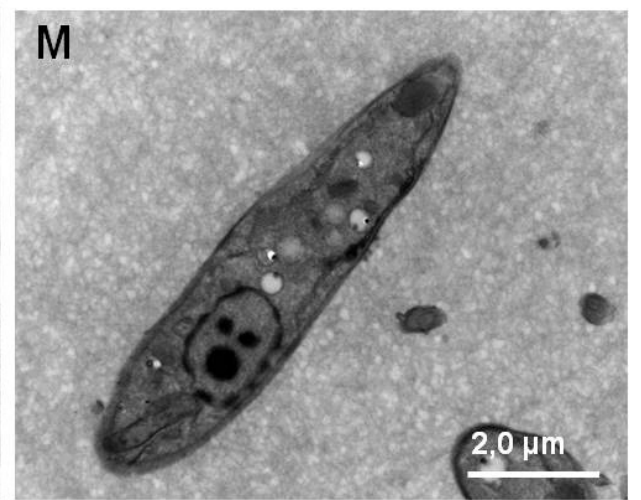
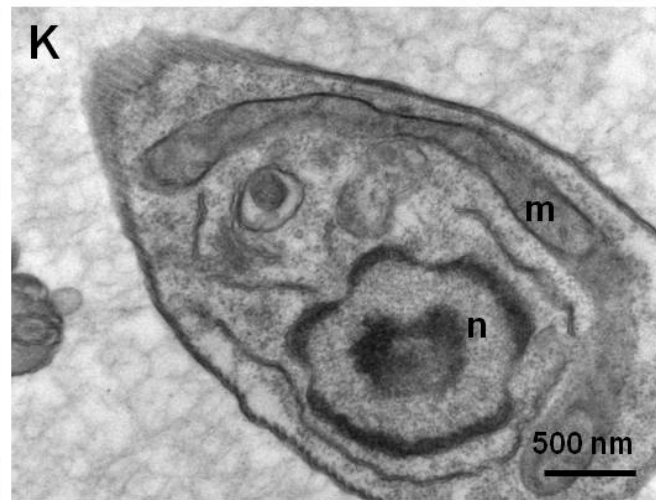
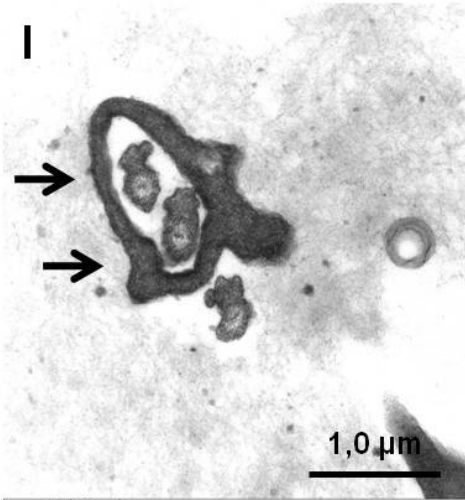


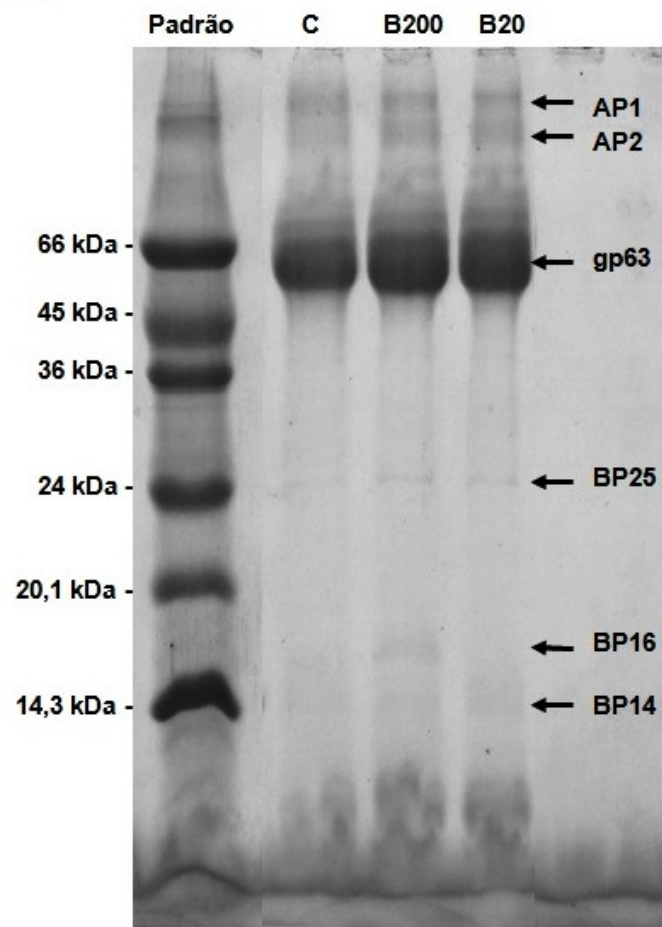
Figura 4



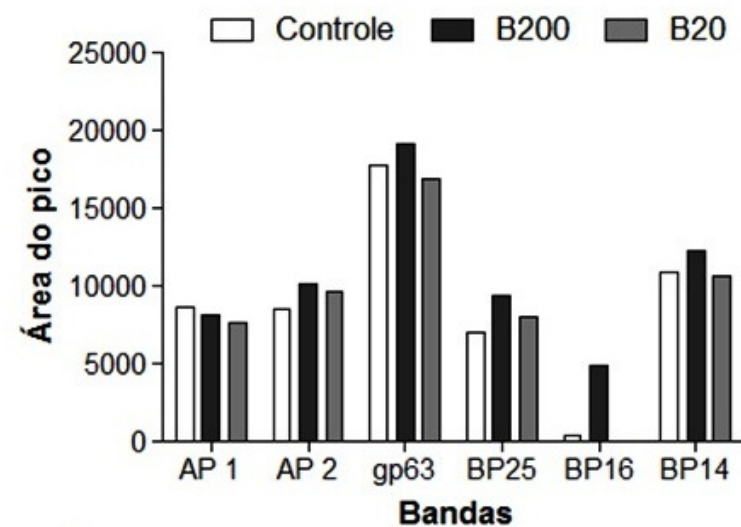




A



B

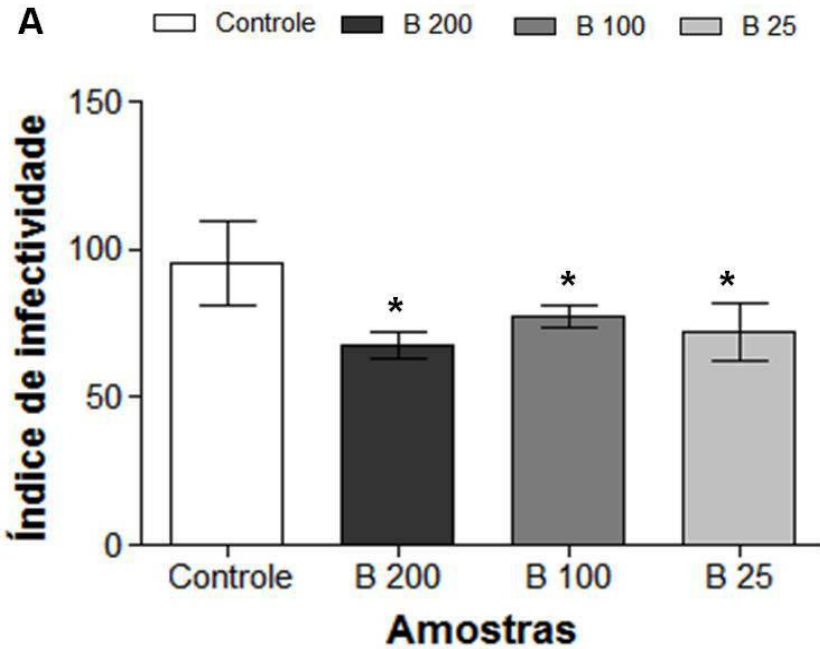


C

Bandas/Amostra (%)	B 200	B 20
AP1	- 5,16	- 12,00
AP2	+ 18,17	+ 12,20
gP63	+ 7,80	- 5,16
BP25	+ 33,80	+ 13,81
BP16	+ 1259,00	- 10,50
BP14	+ 13,00	- 2,00

Figura 5

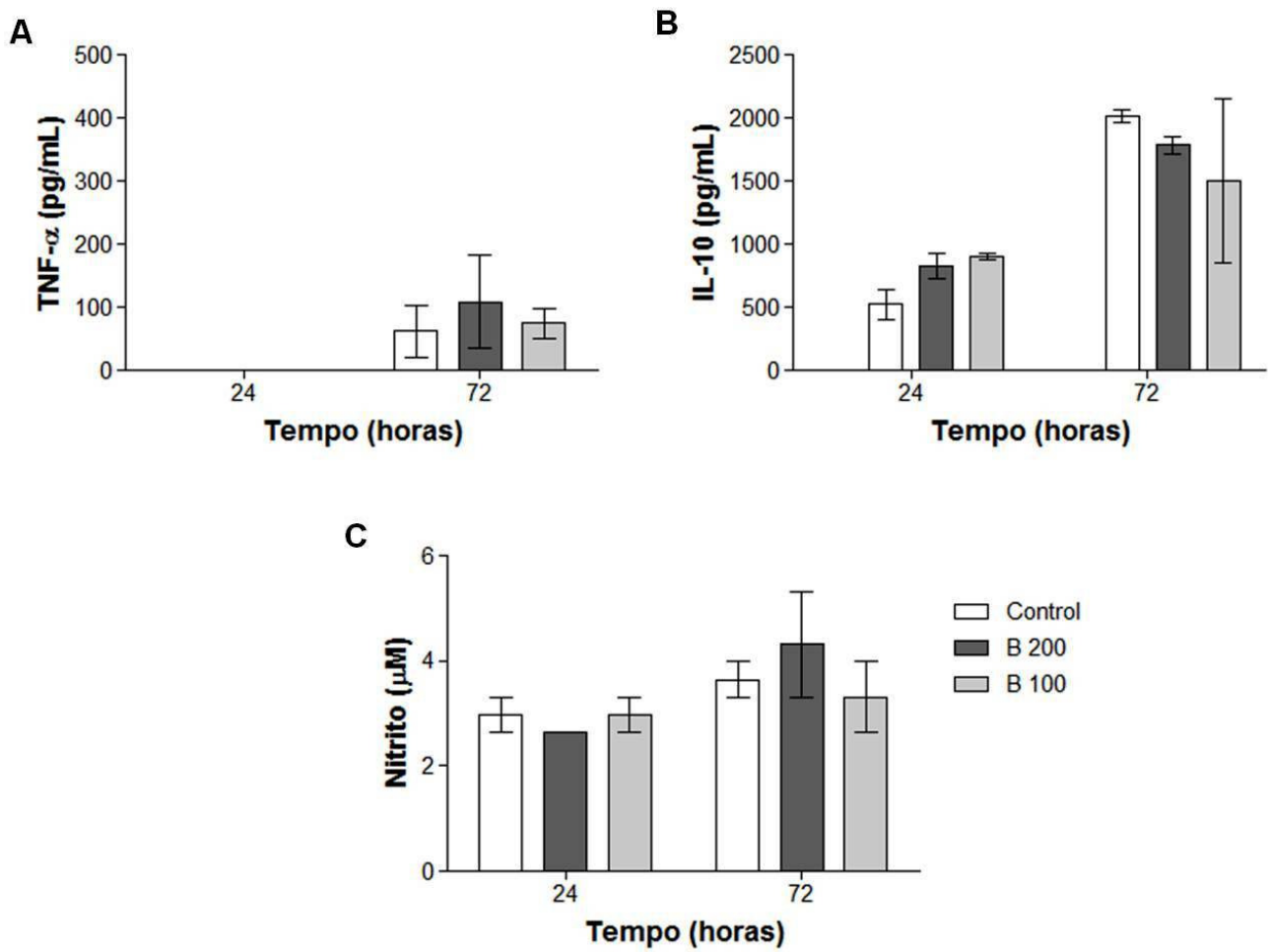
Figura 6

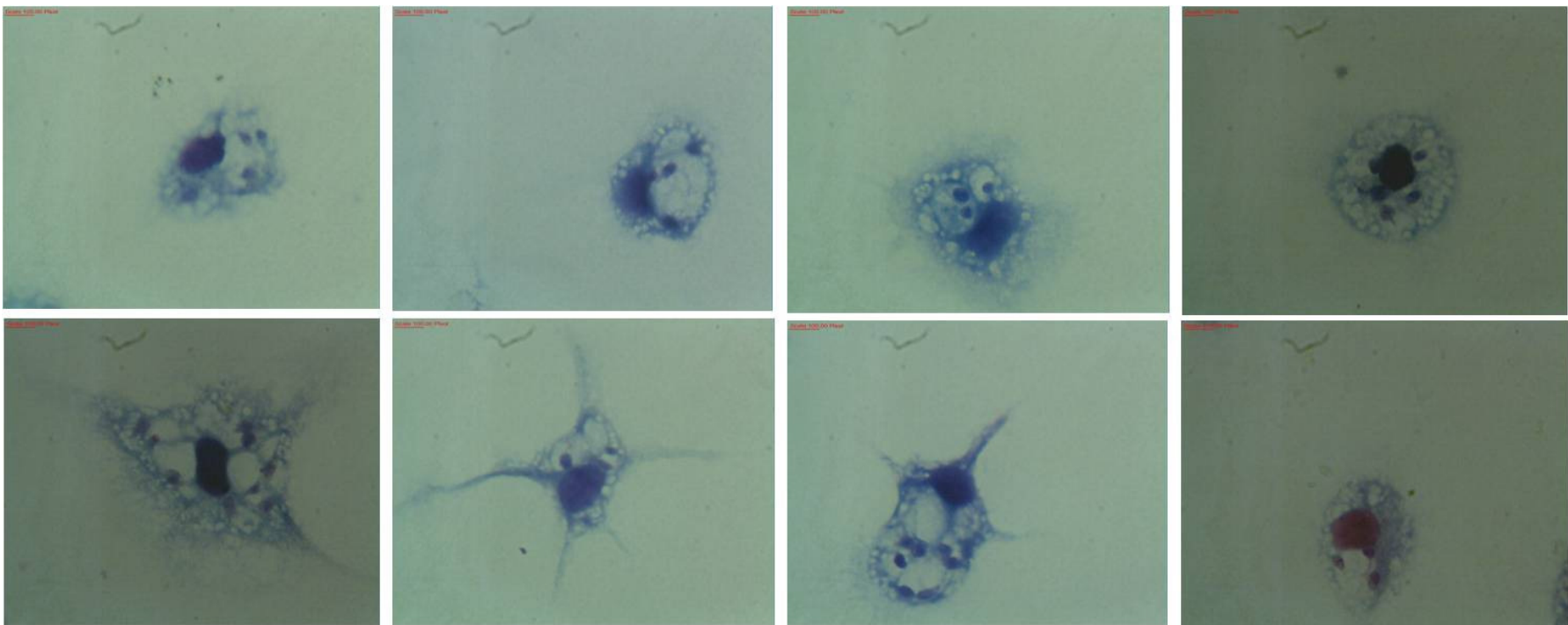


B

BnSP-7 (µg/mL)	Inibição da infectividade (%)
200	29,44±3,32 [#]
100	18,81±2,80 [#]
25	24,73±7,12

Figura 7





Controle

B 200

B 100

B 25