



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA REDE
BIONORTE**



FOSFOLIPASE A₂-Asp-49 DE *Bothrops jararacussu* ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS COMO TERAPIA ALTERNATIVA PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.

NEUZA BIGUINÁTI DE BARROS

**Porto Velho - RO
DEZEMBRO/2017**

NEUZA BIGUINÁTI DE BARROS

FOSFOLIPASE A₂-Asp-49 DE *Bothrops jararacussu* ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS COMO TERAPIA ALTERNATIVA PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. ROBERTO NICOLETE

**Porto Velho - RO
DEZEMBRO/2017**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B277f Barros, Neuza Biguináti de Barros
FOSFOLIPASE A2 Asp-49 DE *Bothrops jararacussu*
ENCAPSULADA EM LIPOSSOMOS COMO TERAPIA
ALTERNATIVA PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA. / Neuza
Biguináti de Barros Barros. 2017
115 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Roberto Nicolete
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. *Leishmania amazonensis*, . 2. Leishmaniose cutânea, . 3.
Bothrops jararacussu, . 4. Fosfolipase A2 PLA2-Asp-49, . 5.
Lipossomas, . I. Nicolete, Roberto II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

NEUZA BIGUINÁTI DE BARROS

FOSFOLIPASE A₂-Asp-49 DE *Bothrops jararacussu* ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS COMO TERAPIA ALTERNATIVA PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. ROBERTO NICOLETE

Banca examinadora

Prof. Dr. Roberto Nicolete
Orientador- Presidente da banca

Prof. Dr. Leandro Moreira Dill
Examinador 2 – interno

Prof. Dr. Leonardo de Azevedo Calderon
Examinador 3 – interno

Prof. Dr. Quintino Moura Dias Jr.
Examinador 4 – interno

Profa. Dra. Giselle Martins Gonçalves
Examinador 5 – externo

**Porto Velho-RO-RO
DEZEMBRO/2017**

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Armindo Briene de Barros, por ser a minha força, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos de alegria e dificuldades, ajudando, incentivando, criticando e elogiando, mas sempre apoiando. O seu amor e compreensão se traduziram no meu maior incentivo durante esta árdua, porém gratificante jornada. O meu amor eterno pelo caminhar a dois.

Aos meus pais, Lucas e Ana, pelos grandiosos ensinamentos que fizeram com que eu me tornasse uma pessoa decidida e dedicada.

Aos queridos filhos, Ana Carla e Lucas e ao meu genro, Waldnilso, por serem pessoas maravilhosas e especiais. Presentes ou à distância nunca deixaram de me incentivar e me ajudar no que podiam.

Aos meus irmãos, Jairo e Osni pela confiança e carinho. À minha irmã querida, Meire e ao cunhado, Daniel, que mesmo distantes, nunca me negaram apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Roberto Nicolete, orientador, pela pessoa especial que é, pela paciência, carinho e por acreditar em mim. Também pelo inestimável apoio e pelo sorriso quando eu achava tudo difícil.

À Sharan Rose, pelo carinho, companhia, amizade e dedicação. Também pela preciosa ajuda durante a realização dos experimentos e, principalmente, por ser uma grande amiga, uma irmã. Assim como ao João Rafael, colega de Laboratório e de caminhada, cuja amizade e companheirismo tive o privilégio de desfrutar.

Outra colega querida e que muito contribuiu é a Larissa Nicolete. Ela, assim como o esposo mudaram para Fortaleza onde novos horizontes profissionais se descortinaram. No entanto, também foi muito importante nessa caminhada, por ser uma pessoa que se dedicou à equipe, ajudando e dando a maior força quando precisávamos. Amália, minha querida que vi nascer e crescer no Laboratório de Biotecnologia. Sinto-me um pouco responsável pelo seu crescimento pessoal e profissional, cuja retribuição foi em forma de amizade e de ajuda em todos os momentos.

Juntos, formamos uma feliz família do Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde, dentro da grande família Fiocruz-RO.

À Minha querida amiga Dra. Mônica, pessoa especial que passou por aqui e que, por motivos profissionais mudou para o Sul do País. Sua breve passagem por aqui foi muito profícua. À Dra. Giselle, pessoa amiga e especial que sempre esteve presente ao longo desta jornada. Meus agradecimentos também aos doutores Leonardo Calderon e Andreimar, que, com suas *expertises* tornaram possível levar adiante os experimentos, apoiando, apontando caminhos e as melhores práticas, além da ajuda material.

À Minha querida amiga Marlene, pessoa especial que sempre me deu apoio desde o mestrado, já nos primórdios da minha caminhada, assim como o Geovane, o Emerson e a Rose, em nome dos quais estendo as minhas considerações a todos os funcionários da Fiocruz-RO pela ajuda, carinho, dedicação e amizade.

Todos vocês fizeram com que as horas, dias, meses e anos debruçados sobre a bancada ou buscando ajuda na literatura especializada valessem a pena. E como valeu!

À direção da FIOCRUZ, pela oportunidade oferecida, sem a qual não poderia abraçar a pesquisa e ver descortinar a ciência tal como ela me apresenta agora.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado, importante incentivo para a manutenção do foco no projeto, ora transformado em uma tese de doutorado bem sucedida.

A todos o meu sincero

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre. Umas porque nos ajudam na construção e moldagem do eu individual e social; outras, porque nos apresentam projetos de sonhos e outras, ainda, porque nos desafiam a construí-los.”

A. Briene

BARROS, Neuza Biguináti de. **Fosfolipase A₂ Asp-49 de *bothrops jararacussu* encapsulada em lipossomas como terapia alternativa para leishmaniose cutânea.** 2017. 122f. Tese (doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade). Programa de pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia PPG-BIONORTE – Universidade Federal do Amazonas, Porto Velho, 2017.

RESUMO

A leishmaniose cutânea é uma doença endêmica em várias regiões do mundo. No Brasil, 75% dos pacientes com a doença exibem uma forma clínica típica, caracterizada por uma ou mais úlceras de bordas arredondadas e elevadas com um centro necrótico. *Leishmania amazonensis* é um dos principais agentes etiológicos de formas clínicas da leishmaniose. O objetivo do presente trabalho foi o de investigar os efeitos *in vitro* e *in vivo* da potencial atividade antileishmaniana *amazonensis* da Fosfolipase A₂ (PLA₂) da peçonha de *Bothrops jararacussu* encapsulada em sistema lipossomal. O método de MTT foi utilizado para avaliação da citotoxicidade da PLA₂-Asp49-lipossomal em macrófagos J774 após 48h de incubação. Os macrófagos tratados com a PLA₂-Asp49-lipossomal apresentaram viabilidade celular em cerca de 82% na maior concentração utilizada (100 µg/mL). No ensaio com as formas promastigotas tratadas com a mesma concentração da PLA₂-Asp49-lipossomal ocorreu uma inibição de 78% dos parasitos. Para o teste de infecção macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c, infectados e incubados com PLA₂-Asp49-lipossomal apresentaram redução de 28% no índice fagocítico e de 55% (p < 0.05) na quantidade de amastigotas intracelulares, após 48h de tratamento, comparado ao grupo controle. Os sobrenadantes de cultura dos macrófagos peritoneais foram coletados para a avaliação da produção de citocinas (TNF-α e IL-10) e de óxido nítrico. Não houve produção de IL-10 pelos macrófagos tratados com o PLA₂-Asp49-lipossomal *in vitro*. Entretanto, o grupo tratado com PLA₂-Asp49-lipossomal produziu níveis significativos de TNF-α e óxido nítrico. Após a caracterização físico-química dos lipossomas foi observado que o tamanho das vesículas permaneceu próximo ao tamanho da membrana utilizada na extrusão, com diâmetro médio entre 205,2 nm para PLA₂-Asp49-lipossomal e 241,9 nm para os lipossomas controle. A PLA₂-Asp49 foi eficientemente encapsulada nos lipossomas (69,6%). A atividade dos lipossomas contendo a toxina foi avaliada em camundongos BALB/c, previamente infectados com 1x10⁵ promastigotas do parasito. Após seis semanas foi iniciado o tratamento com as preparações dos diferentes grupos de animais, acompanhados por 21 dias. Foi observado nos animais tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal diminuição de aproximadamente 18% do tamanho da lesão das patas, em relação ao grupo controle sem

tratamento e aos animais tratados com o fármaco referência (Glucantime®). Ao término do tratamento, os animais foram mortos, os tecidos das patas e linfonodos foram coletados para recuperação de amastigotas e quantificação de citocinas e nitritos nos sobrenadantes destes tecidos. No macerado do linfonodo, no grupo tratado com PLA₂-asp49-lipossomal observou-se redução da carga parasitária de 73,5%, comparado com o grupo controle. Ainda nessa comparação, no macerado do tecido da pata houve redução de 57,12% dos números de amastigotas transformadas para promastigotas. Os grupos infectados e tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal apresentaram aumentos significativos, respectivamente, nos tecidos dos linfonodos e patas, nos níveis de IL-12 (1.200 e 400 pg/mL), fator de necrose tumoral (TNF- α) (50 e 100 pg/mL), e de nitritos (32 e 36 μ M), quando comparados aos grupos infectados e sem tratamento. Os resultados sugerem que o sistema lipossomal contendo PLA₂-Asp-49 é uma ferramenta biotecnológica promissora para conferir atividade antileishmania a macrófagos infectados, aumentando seus mecanismos celulares microbicidas e auxiliando para o estabelecimento de uma resposta imunológica mais eficiente.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, Leishmaniose cutânea, *Bothrops jararacussu*, Fosfolipase PLA₂-Asp-49, Lipossomas, Terapia experimental.

BARROS, Neuza Biguináti de. **Liposomes containing Asp49 A₂ phospholipase from *bothrops jararacussu* as alternative experimental therapy against cutaneous leishmaniasis.** 2017. 122f. Thesis (doctorate in Biodiversity and Biotechnology). Postgraduate Program in Biodiversity and Biotechnology PPG-BIONORTE – Universidade Federal do Amazonas. Porto Velho, 2017.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is endemic in several regions of the world. In Brazil, despite the wide variety of clinical manifestations, 75% of patients with CL display a typical clinical picture, characterized by one or more ulcers and high round edges with a central necrosis, usually in the lower extremities. *Leishmania amazonensis* is a major etiologic agent of a wide spectrum of clinical forms of leishmaniasis. The objective of this study was to investigate the *in vitro* and *in vivo* antileishmania *amazonensis* activity of phospholipase A₂ (Asp49) isolated from *Bothrops jararacussu* venom encapsulated in liposomal system. The cytotoxicity of PLA₂-Asp49-liposomal was determined by MTT method in J774 macrophages after 48h of incubation. Macrophages treated with PLA₂-Asp49-liposomes had cell viability around 82% at the highest concentration (100 µg/mL), while promastigotes treated with the same concentration resulted 78% of inhibition. On the other hand, peritoneal macrophages from Balb/c mice infected and treated with PLA₂-Asp49-liposomes showed a 28% reduction in phagocytic index and a 55% reduction (p <0.05) in the number of intracellular amastigotes after 48h of treatment compared to the control group. After the treatments, the supernatants of peritoneal macrophages were collected, and the production of TNF-α, IL-10 and nitric oxide was evaluated. It was observed that there was no IL-10 production by macrophages treated with PLA₂-Asp49-liposomes when compared to the untreated control. However, this group presented significant levels of TNF-α and nitric oxide. After the physicochemical characterization of the liposomes it was observed that the size of the vesicles remained close to the diameter of the membrane used in the extrusion, with an average diameter of 205.2 nm for PLA₂-Asp49-liposomes and 241.9 nm for the control liposomes. PLA₂-Asp49 were also efficiently encapsulated in liposomes (69.6%). The molecular docking showed that lipids strongly interact with the active site of the enzyme PLA₂-Asp49. The activity of the toxin-containing liposomes was evaluated in BALB/c mice, previously infected with 1x10⁵ of the parasite's promastigotes. After six weeks of infection, treatments in different groups of animals were initiated and observed for 21 days. The size of the paw lesion in PLA₂-Asp49-liposomal treated animals was observed as decreasing by approximately 18% relative to the untreated

control group and the Glucantime®-treated animals, which was used as a reference drug. At the end of the treatment, the animals were sacrificed and the paw and lymph node tissues were collected. Part of the collection was used to recover amastigotes and another to quantify cytokines and nitrites. In the group treated with PLA₂-Asp49-liposomes the parasitic load was observed to be reduced by 73.5% in the macerated lymph node, compared to the control group. Comparatively, in the paw tissue was observed a reduction of 57.12%. The infected groups treated with PLA₂-Asp49-liposomes showed significant production in TNF- α (45 and 80 pg/mL) and nitrite levels (32 and 36 μ M), respectively, in lymph node and paw tissues, compared to infected untreated groups. The results indicate that the liposomal system containing PLA₂-Asp49 is a promising biotechnological tool to confer an antileishmania activity in infected macrophages.

Keywords: *Leishmania amazonensis*, Cutaneous leishmaniasis, *Bothrops jararacussu*, PLA₂-Asp-49, Liposomes, Experimental therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida da <i>Leishmania spp</i>	18
Figura 2. Interação entre lipossomo e células do organismo.....	28
Figura 3. Esquema de fluxograma <i>in vitro</i>	32
Figura 4. Interação molecular entre PLA ₂ -Asp49 e lipídeos - análise Docking.....	43
Figura 5. Índice fagocítico de macrófagos peritoniais	45
Figura 6. Representação micrográfica dos grupos avaliados <i>in vitro</i>	46
Figura 7. Níveis de nitritos produzidos por macrófagos infectados e tratados com PLA ₂ -Asp49	47
Figura 8. Esquema do Fluxograma <i>in vivo</i>	54
Figura 9. Gráfico tratamento lipossomal.....	60
Figuras 10 A e B. Análise do índice de amastigotas recuperadas.....	61
Figuras 11 A, B, C, D e E. Histopatologia de lesão linfonodo e órgãos <i>in vivo</i> - fotomicrografia.....	62
Figuras 12 A, B, C, D e E. Histopatologia de lesão da pata e órgãos <i>in vivo</i> – <i>fotomicrografia</i>	62
Figuras 13 A e B. Produção de IL 12 no sobrenadante.....	64
Figuras 14 A e B. Avaliação de produção <i>in vivo</i> de citocinas TNF- α	65
Figuras 15 A e B. Níveis de nitritos.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fármacos empregados no tratamento	22
Tabela 2. Distribuição dos volumes curva padrão	36
Tabela 3. Resultado da análise de tamanho, PZ e taxa de encapsulamento	42
Tabela 4. Resultados após análise de Docking molecular	43
Tabela 5. Resultados da atividade citotóxica de PLA2-Asp49 lipossomal	44

LISTA DE SÍMBOLOS

APC - Células apresentadoras de antígenos

BSA - Albumina de soro bovino

DPPC - Dipalmitoilfosfatidilcolina

DPPS - Dipalmitoilfosfatidilserina

I.P. - Intraperitoneal

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina

12 iNOS - Sintase de Óxido Nítrico induzível

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LUV - Vesículas unilamelares grandes

MLV - Vesículas multilamelares

MTT - (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il) – 2,5-difenil brometo petrazolina)

NK - Células natural killer

NO - Óxido Nítrico

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

SB+5 Antimonial pentavalente

RPMI- 1640- Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA

SFB - Soro fetal bovino

SUV - Vesículas unilamelares pequenas

Th1 - Linfócitos T helper do tipo 1

Th2 - Linfócitos T helper do tipo 2

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	21
1.1.1 As Leishmanioses	21
1.1.2 Ciclo de vida da Leishmania spp	23
1.1.3 Resposta Imune nas leishmanioses	24
1.1.4 Quimioterapia	26
1.1.5 Toxinas de serpentes – Fosfolipases A₂	27
1.1.6 Sistemas de liberação modificada de fármacos: lipossomas	30
2. OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS COM PLA₂-Asp49	37
3.2 ANIMAIS	37
3.3 PARASITAS	37
3.4 MEIO DE CULTURA	38
3.5 FOSFOLIPASE A₂ A SER ENCAPSULADA	38
4. METODOLOGIA	39
4.1 PURIFICAÇÃO DA FOSFOLIPASE A₂	39
4.2 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS	39
4.2.1 Determinação do tamanho e potencial zeta dos lipossomas	40
4.2.2. Determinação do teor de proteínas de PLA₂-Asp49 em lipossomas	40
4.2.3 Obtenção dos macrófagos peritoneais	41
4.2.4 Análise <i>in silico</i> (docking)	42
4.2.5 Ensaio de citotoxicidade	42
4.2.6 Atividade antileishmania <i>in vitro</i> de PLA₂-Asp49-liposomal	43
4.2.7 Determinação do índice de seletividade	43
4.2.8 Infecção e tratamento de macrófagos peritoneais	43
4.2.9 Produção de Óxido Nítrico e citocinas TNF-α, IL10, IL 12 <i>in vitro</i>	44
4.2.10 Análise Estatística	45
RESULTADOS <i>IN VITRO</i>	43
5. RESULTADOS <i>IN VITRO</i>	47

5.1 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO, POTENCIAL ZETA E DA TAXA DE ENCAPSULAÇÃO DOS LIPOSSOMAS	47
5.2 INTERAÇÃO MOLECULAR ENTRE A PLA ₂ -ASP49 E OS LIPÍDEOS QUE CONSTITUEM OS LIPOSSOMOS.....	48
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE PLA ₂ -ASP49-LIPOSSOMAL EM MACRÓFAGOS J774 E ATIVIDADE ANTILEISHMANIA EM PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	49
5.4 AÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PLA ₂ -ASP49-SOLUÇÃO E PLA ₂ -ASP49-LIPOSSOMAL NA PORCENTAGEM DE INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> E A SOBREVIVÊNCIA DOS PARASITAS DENTRO DAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS APÓS TRATAMENTO COM PLA ₂ -ASP49 SOLUÇÃO E PLA ₂ -ASP49-LIPOSSOMAL.....	49
5.5 PLA ₂ -ASP49-LIPOSSOMAL AUMENTA A PRODUÇÃO DE NO E TNF- α PELOS MACRÓFAGOS	51
6. DISCUSSÃO.....	53
ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	55
7. MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
7.1 ANIMAIS.....	59
7.2 PARASITAS	59
7.3 MEIO DE CULTURA	60
7.4 INFECÇÃO <i>IN VIVO</i> E EFEITO DO TRATAMENTO COM PLA ₂ -ASP49-LIPOSSOMAL	60
7.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA LESÃO DA PATA E ÓRGÃOS DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>L. AMAZONENSIS</i>	61
7.5.1 Taxa de recuperação de amastigotas do tecido linfonodo e da lesão de pata dos camundongos infectados e tratados com PLA ₂ -ASP49-solução e encapsuladas em lipossomos.....	61
7.5.2 Produção de citocinas TNF- α , IL10, IL 12 e Óxido Nítrico <i>in vivo</i>	62
7.5.3 Análise Estatística.....	62
RESULTADOS <i>IN VIVO</i>	60
8. RESULTADOS.....	64
8.1 EXPERIMENTO PILOTO	64
8.2 O TRATAMENTO COM PLA ₂ -ASP49-LIPOSOMAL DIMINUI A PROGRESSÃO DA LESÃO DA PATA DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS E TRATADOS.....	64
8.3 O TRATAMENTO COM PLA ₂ -ASP49-LIPOSSOMAL REDUZIU TAXA DE TRANSFORMAÇÃO DE AMASTIGOTAS PARA PROMASTIGOTAS RECUPERADAS DOS TECIDOS LINFONODO E PATA DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS E TRATADOS...	65

8.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA LESÃO DA PATA E ÓRGÃOS DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS.....	67
8.5 O GRUPO TRATADO COM PLA ₂ -ASP49-LIPOSSOMAL FOI CAPAZ DE ATIVAR O SISTEMA IMUNE DOS ANIMAIS PRODUZINDO CITOCINAS COMO TNF-A, IL12 E AS MOLÉCULAS REATIVAS COMO O ÓXIDO NÍTRICO	69
9. DISCUSSÃO.....	73
9. CONCLUSÕES	84
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO 1 ARTIGO PUBLICADO, PARTE <i>IN VITRO</i>	
ANEXO 2 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO, PARTE <i>IN VIVO</i>	
ANEXO 3 AUTORIZAÇÃO CEUA DA FIOCRUZ-RO.....	107

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma importante zoonose que ocorre no Velho Mundo e nas Américas, caracterizando-se como um grave problema de saúde pública nos países pobres e uma das endemias prioritária da Organização Mundial de Saúde (OMS). É descrita em 88 países e, destes, 72 são países em desenvolvimento, incluindo os 13 mais pobres do mundo. A Organização Mundial da Saúde estima que no mundo haja 12 milhões de indivíduos infectados por *Leishmania sp.* e 350 milhões de pessoas sob risco de infecção, sendo registrados aproximadamente dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (WHO/OMS, 2011).

Dentre as espécie de leishmaniose, este estudo foi direcionado para a pesquisa com a leishmaniose tegumentar americana (LTA) que se apresenta como uma doença infecciosa com diferentes formas clínicas, dentre elas as lesões de pele, úlceras, principalmente nas partes expostas do corpo, deixando cicatrizes para a vida toda e muitas vezes, com grave deficiência. Cerca de 95% dos casos de LTA ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Mais de dois terços dos novos casos de LTA ocorrem em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria. Estima-se que 0,7 a 1,3 milhões de novos casos ocorram em todo o mundo anualmente. De acordo com o SINAN, os estados que apresentaram os maiores números de casos e coeficientes de detecção na Região Norte do Brasil foram Rondônia (14.277) e Amazonas (20.388), em dados coletados até 2010 (DNDI, 2014).

Em 2009, o estado de Rondônia notificou 1.035 casos de leishmaniose tegumentar americana, distribuídos em 94% dos municípios do estado, sendo que a cidade de Vilhena, no sul do Estado, apresentou o maior percentual (16,2%). O coeficiente de detecção foi de 68,8 casos por 100.000 habitantes. Com relação à evolução, 75,8% dos casos tiveram alta por cura clínica. O sexo masculino representou 88,4% dos casos, 97,6% ocorreram em maiores de 10 anos e 94,7% foram confirmados por critério laboratorial. (BRASIL, 2011).

As espécies do gênero *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. São transmitidas aos hospedeiros vertebrados por diferentes insetos vetores da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* – no Novo Mundo e *Phlebotomus* – no Velho Mundo (LAINSON e SHAW, 1987). A *Leishmania amazonensis* é um dos principais agentes etiológicos de um grande espectro de formas clínica da leishmaniose e apresenta ampla distribuição geográfica nas Américas, coincidindo com áreas comuns de transmissão de outras espécies de *Leishmania* (BRASIL, 2009).

O aumento da incidência da leishmaniose tegumentar associado às altas taxas de morbidade e a difusão da doença para novas áreas geográficas, trazidas por viajantes, é um

problema crescente. O aumento global de viagens para áreas endêmicas tem aumentando essas taxas, inclusive em áreas urbanas, constituindo um grande problema para a saúde pública.

A doença tem apresentado variações nos padrões de transmissão, pois há incidência não apenas em focos silvestres, mas se encontra presente em regiões peridomiciliares. Associa-se a isso a dificuldade de medidas de controle dos transmissores e as pessoas que procuram atendimento encontram barreiras significativas para o tratamento, incluindo atrasos de diagnóstico e difícil acesso a medicamentos antileishmania (DUNAISKI, 2006; SHOWLER e BOGGILD, 2015).

A Leishmaniose mucocutânea conduz à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Quase 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2015).

A leishmaniose pode ser causada por diferentes espécies tais como: *Leishmania (viannia) braziliensis*, *Leishmania (viannia) guyanensis*, *Leishmania (viannia) naiffi*, *Leishmania (viannia) shawi*, *Leishmania (viannia) lainsoni*, *Leishmania (leishmania) amazonensis*, *Leishmania (L) mexicana*, *Leishmania (v.) panamensis*, e *Leishmania pifanoi*. A espécie envolvida depende da distribuição geográfica e a doença pode aparecer como ulcerações simples ou difundir na pele, principalmente na face, fazendo com que haja mutilações e desfiguração do paciente. A doença pode regredir espontaneamente ou evoluir, exigindo, portanto, tratamento (GRIMALDI, et al., 1991).

Dados divulgados pelo órgão internacional *Drugs for Neglected Diseases Initiative*, relatam que apenas 21 (1,3%) dos 1.556 novos fármacos registrados entre 1975 e 2004 foram desenvolvidos especificamente para doenças tropicais, embora estas sejam responsáveis por 11,4% da carga global de doenças (DNDI, 2014).

Apesar da evolução mundial, o fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses ainda continua sendo o antimônio pentavalente, apresentando severos efeitos colaterais tais como arritmias cardíacas, nefro e hepatotoxicidade. Além disso, o medicamento é administrado por via parenteral (intramuscular ou endovenosa) diariamente, num período de 20 a 40 dias (LIMA, et al., 2007; FIGUEREDO, et al., 2014). A resposta ao tratamento com antimoniais pentavalentes ainda é variável e pode resultar em cura clínica, falha terapêutica ou reincidência da doença após resposta favorável inicial (SANTOS. et al., 2013).

A Organização Mundial de Saúde (WHO, sigla em inglês) (2011), diz que para o controle da leishmaniose ter eficiência são necessários medicamentos seguros e eficazes, com baixo custo e acessíveis, bem como ferramentas de diagnóstico e vacinas, para facilitar a disseminação dos resultados da investigação. Diversos fármacos veiculados em lipossomas foram testados no tratamento das leishmanioses, como os antimoniais trivalentes, antimoniais

pentavalentes, Anfotericina B, Pentamidina, dentre outros. O efeito sinérgico da associação de antimoniais encapsulados em vesículas lipossomais no tratamento das leishmanioses tem sido relatado por vários autores (MIRÓ, et al., 2011; TORRES, et al., 2011).

Na busca de novas alternativas para o tratamento da leishmaniose, pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde da FIOCRUZ-RO possuem vários estudos publicados e em andamento direcionados para pesquisas com compostos naturais extraídos de plantas e bioativos derivados de venenos de serpentes da Amazônia brasileira que apresentaram eficácia anti-*Leishmania spp* com reduzida toxicidade para hospedeiros humanos (FERREIRA, et al., 2010; CALDERON, et al., 2009; MACEDO, et al., 2015; DE MOURA, et. al., 2014; TERRA, et. al., 2015). Estudos estes que tiveram como objetivo investigar novos compostos ou terapias que eliminem o parasito e/ou acelerem a cura das lesões com estimulação do sistema Imunológico.

A partir dessas premissas, o presente projeto tem como objetivo investigar a ação da fosfolipase A₂ Asp-49 encapsulada em vesículas lipossomais sob as formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Acredita-se que a associação possa contribuir de maneira expressiva para a diminuição da parasitemia da lesão ou até mesmo a cura dos camundongos infectados com *L. amazonensis*, por meio do tratamento experimental com os lipossomos desenvolvidos neste estudo.

De forma a proporcionar uma melhor compreensão da disposição dos conteúdos que serão abordados ao longo da presente tese, este trabalho foi dividido em duas partes principais, quais sejam, a primeira parte com os experimentos efetuados *in vitro* e a subsequente, *in vivo*.

Além destas duas partes que aqui denomina-se como principais, dentro dos objetivos do trabalho em tela, há as demais partes obrigatórias para uma tese, quais sejam: a parte introdutória, onde está descrita toda a motivação, objetivos fundamentais e uma breve descrição da disposição dos seus conteúdos, a fim de possibilitar ao leitor entender o que se propõe no estudo. A seguir são apresentados a revisão de literatura onde se apoia este estudo, abordando os elementos essenciais, tais como os lipossomas, as fosfolipases A₂, os fármacos de tratamento disponíveis para os casos clínicos de leishmaniose, a exemplo do Glucantime® e da Pentamidina®, diferentes métodos de preparação e de caracterização de resultados. Na sequência, há a descrição dos materiais e métodos, equipamentos e reagentes utilizados, o protocolo experimental envolvido na preparação e caracterização dos lipossomas. Nessa sequência, chega-se aos experimentos, propriamente dito, onde são descritas todas as etapas das pesquisas, seus resultados e discussões. Em complemento a essa etapa, são apresentadas as conclusões com as análises dos resultados, assim como as potencialidades da utilização das

substâncias analisadas para o tratamento da leishmaniose. Na última parte, está contida a bibliografia utilizada para o apoio e desenvolvimento do presente trabalho.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 As Leishmanioses

As leishmanioses são antropozoonoses que representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. São consideradas problemas de saúde pública, ocorrendo em diferentes continentes, entre eles: Europa, África, Ásia e América, onde apresentam um grau de impacto econômico alto, especialmente em países subdesenvolvidos (BRELAZ, et al., 2012). De acordo com WHO (2015) as leishmanioses são consideradas doenças re-emergentes e são a segunda causa de morte entre as infecções parasitárias (NOGUEIRA, MONTERIO e ESCOBAR, 2013).

A Organização Mundial da Saúde (WHO) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (WHO/OMS, 2015; STOCKDALE e NEWTON, 2013). Vale ressaltar que a importância dessa doença não se deve apenas a sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também à possibilidade de produzir lesões destrutivas e desfigurantes, com importante repercussão no quadro psicossocial do paciente (CARVALHO et al., 1985; WHO, 2015). A *L. amazonensis* é um dos principais agentes etiológicos de várias formas clínicas da leishmaniose e apresenta ampla distribuição geográfica nas Américas, coincidindo com áreas comuns de transmissão de outras espécies de leishmaniose (WHO, 2015).

O aumento da incidência da leishmaniose, associado às altas taxas de morbidade, a difusão da doença para novas áreas geográficas, inclusive urbanas, tem constituído um grande problema para a saúde pública. A doença apresenta variações nos padrões de transmissão, pois incide não apenas em focos silvestres, mas se encontra presente em regiões peridomiciliares. Associa-se a isso a dificuldade de medidas de controle (DUNAISKI, 2006).

A leishmaniose pode ser classificada em duas formas clínicas: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral Americana (LVA). A LTA pode se apresentar de três formas principais: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose cutâneo-difusa. A leishmaniose cutânea - a forma mais comum - é caracterizada por lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém limitadas. As lesões, que acometem a pele, apresentam-se com forma de úlcera, podendo ter bordas elevadas e fundo granuloso, com ou

sem exsudato. No Brasil, é causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* ou *Leishmania (Viannia) guyanensis* (WHO, 2011).

Conforme afirma Maltezou (2010), a forma mucocutânea ocorre entre 1-10% dos pacientes que apresentaram a forma isolada da leishmaniose. O acometimento da mucosa pode surgir com a lesão cutânea em atividade, ou anos após sua cicatrização ou ainda pode acontecer cerca de um a cinco anos após as lesões iniciais se curarem. Produz lesões nas mucosas do nariz, boca e faringe, causando a destruição das cartilagens e dos tecidos moles. São lesões desfigurantes e pode ocorrer a morte em decorrência de infecções secundárias por bactérias e desnutrição. Ainda pode ocorrer metástase para outras partes do corpo distante do local da picada. A LTA induz resposta imune intensa, do tipo hipersensibilidade tardia. As células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) das mucosas são pouco parasitadas. No Brasil, a leishmaniose mucocutânea é causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, porém já foram citados casos na literatura atribuídos à *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e à *Leishmania (Viannia) guyanensis* (TAVARES, et al., 2009; PÉREZ-AYALA, et al., 2009; PAVLI e MALTEZOU, 2010).

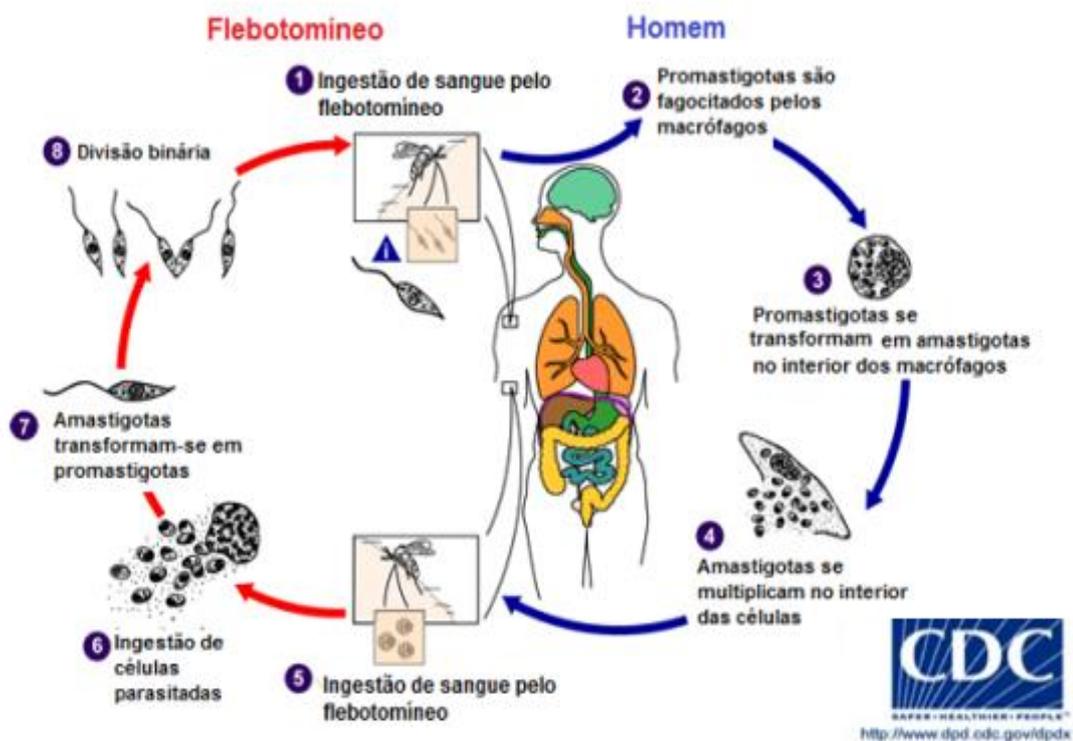
A forma cutânea difusa é uma forma clínica rara e grave, que ocorre em pacientes com deficiência na resposta imune celular e está associada às infecções por *L. amazonensis*. As lesões são formadas por pápulas ou nódulos deformantes sem ulcerações em todas as superfícies do corpo tendo aparência semelhante à hanseníase, dificultando o diagnóstico e tornando o tratamento difícil. Além disso, não possui cura espontânea, tendo a característica de apresentar, em alguns casos, recaídas após o tratamento (PISCOPO e AZZOPARDI, 2006).

A leishmaniose visceral, também conhecida como Calazar, é uma zoonose causada por protozoários pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*, que inclui os parasitos do sub-gênero *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum* em países do Velho Mundo e *Leishmania (Leishmania) chagasi* em países do Novo Mundo (LAISON e SHAW, 1987). Esta doença é fatal na maioria das vezes, pela demora em ser diagnosticada. Quando não tratada, a leishmaniose visceral é acompanhada por uma disseminação generalizada de parasitos no sistema mononuclear fagocitário em órgãos como fígado, baço, linfonodo e medula óssea. As manifestações clínicas aparecem geralmente após três meses de infecção. Os principais sintomas são febre, geralmente noturna e intermitente, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, e perda de peso. Hipoalbuminemia e ativação policlonal com hipergamaglobulinemia (IgG e IgM) são características constantes (GALVÃO, et al., 1984; BARRAL e COSTA, 2011).

1.1.2 Ciclo de vida da *Leishmania* spp

Após o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado, as formas amastigotas existentes dentro de células fagocíticas, tais como os macrófagos, são liberadas no intestino do vetor e diferenciam-se em formas alongadas, flageladas e móveis, denominadas de promastigotas procíclicas, que passam por sucessivas etapas de replicação. Há então um processo denominado de formas promastigotas metacíclicas. Estas não possuem capacidade replicativa, mas altamente infectivas e são as responsáveis pela infecção do hospedeiro vertebrado. O vetor contaminado, no momento de um novo repasto sanguíneo libera, juntamente com sua saliva, algumas centenas de formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro mamífero. Os parasitas são, na sua maioria, fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), como macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans, onde se alojam nos fagolisossomos, que originam os vacúolos parasitóforos. Dentro destas organelas há a diferenciação das promastigotas em amastigotas, que são altamente infectivas e responsáveis pelo desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero (Figura 1) (BATES, 2007).

Figura 1. Ciclo de vida da *leishmania* spp.



Adaptado do Center for Disease Control

1.1.3 Resposta Imune nas leishmanioses

Os mecanismos da resposta imune nas leishmanioses envolvem componentes da imunidade inata e adaptativa, com ativação das respostas humoral e celular do hospedeiro (ROGERS et al., 2002). A primeira resposta à presença de um patógeno é caracterizada por uma reação inflamatória, com migração de células de defesa, alteração na permeabilidade vascular e a formação de mediadores solúveis, tais como as citocinas, quimiocinas e interferons (IFNs) (TRINCHIERI, 2007).

A espécie do parasita e o sistema imune do hospedeiro determinam o tipo de resposta imune e o aparecimento da infecção. Após a infecção por *Leishmania* pode ocorrer uma resposta inata complexa incluindo ativação de células como os neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas (DCs), "Natural Killer" (NK) e a ativação de receptores "toll-like" (HAMZA, 2010).

O macrófago pode controlar e eliminar o parasito por meio de inúmeros mecanismos que envolvem a produção de IL-12, que, por sua vez, estimula linfócitos e células NK a produzirem IFN- γ , que age em sinergismo com TNF- α na estimulação dos próprios macrófagos a produzirem reativos de oxigênio que são tóxicos para o parasito (GORAK , ENGWERDA e KAYE, 1998; KANE e MOSSER, 2001). Além disso, os macrófagos possuem receptores que reconhecem padrões moleculares dos parasitas, como o receptor para fucosemanose, o receptor para fibronectina, o receptor para a porção do fragmento Fc dos anticorpos e o receptor para proteína C reativa, que facilitam a entrada das formas promastigotas metacíclicas, geralmente de maneira silenciosa, na célula hospedeira (NADERER e MCCONVILLE, 2008).

Para infectar o macrófago a forma promastigotas de *Leishmania* utiliza uma variedade de receptores celulares para mediar a endocitose. Uma vez no interior do macrófago a *Leishmania* é protegida da degradação do fagolisossomo, pois possuem uma variedade de adaptações para inibir os mecanismos de defesa celulares (SAHA, et al., 2006).

De maneira geral o sistema imune do hospedeiro quando infectado é ativado e começa a responder positivamente na tentativa de eliminar o patógeno. No caso do gênero *Leishmania* o parasita consegue evadir aos processos microbicidas do organismo hospedeiro utilizando-se de mecanismos como:

- (1) modulação da produção de citocinas e quimiocinas,
- (2) interferência nos processos de migração e apoptose celulares e
- (3) modificação do microambiente intracelular (CASTELLANO, 2005).

Os parasitos possuem diversas características que estão relacionadas diretamente com os mecanismos de defesa do hospedeiro e com a patogênese durante a infecção. Dependendo da espécie, o parasito *Leishmania* consegue escapar da resposta inata e humoral e remodela mecanismos intracelulares em algumas células como macrófagos e células dendríticas, afetando fatores de transcrição e a expressão gênica de citocinas (MURRAY, et al., 2005; CASTELLANO, 2005). Nota-se que os parasitas evoluíram de maneira a explorar o sistema imune do próprio hospedeiro, modulando-o e proporcionando um ambiente favorável para o desenvolvimento da infecção. O desequilíbrio da relação parasito-hospedeiro seria a causa tanto da eliminação da infecção, quanto do processo patogênico nas leishmanioses (CASTELLANO, 2005).

As infecções por *Leishmania* induzem uma ativação específica da resposta imunológica do hospedeiro, levando-o à resistência ou a susceptibilidade à infecção. Essa resistência ou susceptibilidade depende da capacidade dos linfócitos se diferenciarem em células TCD4+ ou TCD8+. As TCD4+ ativam os macrófagos, aumentando a capacidade microbicida e também ativam os linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos, além da ativação de células capazes de produzir citocinas, que são importantes para o desenvolvimento, controle e proteção do sistema imune do hospedeiro (ROGERS, et al., 2002; HOLZMULLER, et al., 2006; ANTONELLI, et al., 2004).

Na relação parasito-hospedeiro observam-se duas subpopulações de células na resposta adaptativa: Linfócitos T “helper” 1 (Th1) e linfócitos T “helper” 2 (Th2). As células Th1 produzem IFN- γ e são associadas à proteção contra os patógenos intracelulares, como as *leishmanias*, logo, quanto mais intensa a resposta de tipo 1, maior a eficiência na eliminação do parasito. Enquanto as células Th2 produzem interleucina (IL) - 4, IL-5 e IL-10 e estão envolvidas nos processos alérgicos e na proteção contra agentes extracelulares. No caso das infecções por micro-organismos intracelulares a ativação das células Th2 leva quase sempre ao agravamento (BELKAID et al., 2001; LOPEZ et al., 2009).

No caso da leishmaniose, a resposta do tipo Th1, necessária para o controle da infecção, caracteriza-se pelo envolvimento de linfócitos CD4 e CD8 e citocinas como IL-12, IFN- γ , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e algumas quimiocinas produzidas por macrófagos. Esta resposta tem como resultado a ativação de macrófagos tornando-os capazes de eliminar o parasito, via IFN- γ , resultando na síntese de intermediários de nitrogênio e oxigênio reativo e, conseqüentemente, na morte dos parasitos intracelulares controlando a infecção (AWASTHI, MATHUR e SAHA, 2004).

Foi demonstrado que camundongos de linhagens susceptíveis, como BALB/c, apresentam uma doença progressiva e severa, com um aumento na expressão de mRNA para

IL-4 e na produção de IL-5, IL-10 e IL-13 (HOWARD, HALE e CHAN-LIEW, 1980; SCOTT e FARREL, 1998; HIMMELRICH, et al., 2000). A IL-4 diminui a regulação da expressão da subunidade β dos receptores da IL-12 nas células Th1, suprimindo o desenvolvimento de IFN- γ , o que leva ao desenvolvimento da resposta Th2 (WANG, et al., 1994; CARRERA, et al., 1996). A IL-10 desempenha um papel fundamental na inibição da ativação macrófagica e contribui para o crescimento do parasito nas lesões, uma vez que camundongos BALB/c IL10-/- mostraram-se capazes de controlar a progressão da doença durante infecção por *L. major* (KANE e MOSSER, 2001).

1.1.4 Quimioterapia

No Brasil, como primeira escolha para o tratamento da leishmaniose cutânea é utilizado o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®). Este fármaco atua na bioenergética das formas amastigotas inibindo a atividade glicolítica e a via oxidativa dos ácidos graxos do parasita (RATH, et al., 2003). A administração é feita por via parenteral, intramuscular ou endovenosa, diariamente, num período de 20 a 40 dias. Apresentam severos efeitos colaterais tais como arritmias cardíacas, nefro e hepatotoxicidade (LIMA, et al., 2007).

A Pentamidina é usada no tratamento de leishmaniose visceral e mucocutânea refratária aos antimoniais pentavalentes. É uma diamina aromática que atua interagindo com o cinetoplasto do parasito e fragmentando a membrana mitocondrial (SUNDAR e CHATTERJEE, 2006; LIMA, et al., 2007). É usada no tratamento da LTA em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano, possuindo maior toxicidade que os antimoniais (MURRAY, et al., 2005). A alta toxicidade deste fármaco, com relatos de morte repentina, é um fator limitante para seu emprego terapêutico. As reações adversas mais frequentes são: dor, induração e abscessos estéreis no local da aplicação, náuseas, vômitos, tontura, mialgias, cefaleia, lipotimias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia. Também pode ocorrer hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (RATH, et al., 2003).

Caso estes tratamentos sejam aplicados em pacientes com menos de seis meses de vida ou mais de 65 anos torna-se necessária a internação hospitalar para a administração destes fármacos. Nesse caso devem ser observados, criteriosamente, os seguintes sinais e sintomas: anemia acentuada, diarreia grave ou prolongada, edema generalizado, desnutrição grave, presença de sangramento e infecções concomitantes. Entretanto, há a possibilidade do surgimento de doenças associadas ao tratamento com este fármaco, tais como: cardiopatia, nefropatia, hepatopatia e hipertensão arterial. Pode também apresentar ausência de resposta ao tratamento (refratariedade primária), casos de recidiva e a presença de icterícia (RATH, et al.,

2003; LIMA, et al., 2007; MURRAY, et al., 2005). Os fármacos usados na segunda linha de tratamento também apresentam elevada toxicidade, podem não curar e causar resistência (LIMA, et al, 2007; CROFTS e COOBMS, 2003).

A Anfotericina B, um antibiótico poliênico, atua na inibição da síntese de ésteres de membrana, ocasionando a morte celular do parasito (BAGINSK, 2005; LIMA, et al., 2007; RATH et al., 2003). É considerada como um fármaco de primeira escolha no tratamento da leishmaniose em gestantes e de segunda escolha quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimônio pentavalentes ou na impossibilidade de seu uso (BRASIL, 2010). A anfotericina B incorporada em lipossomos é fagocitada pelos macrófagos, interagindo diretamente com o ergosterol do parasita, aumentando assim a eficácia da droga e sua tolerabilidade, reduzindo o tempo de uso no tratamento, sendo por isso considerada menos tóxica (SAMPAIO, RIBEIRO e MARSDEN, 1997; BAGINSK, 2005; MURRAY et al., 2005).

Na Tabela 1 estão listados os fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose e seus possíveis mecanismos de ação.

Tabela 1: Fármacos empregados no tratamento da leishmaniose

Nome do fármaco	Ação
Antimoniato de meglumina (Glucantime [®])	Inibição da atividade glicolítica e via oxidativa dos ácidos graxos do parasita.
Gluconato de antimônio (V) sódico ou Estibogluconato de Sódio (Pentostam [®])	Inibição da Atividade glicolítica e via oxidativa dos ácidos graxos do parasita.
Anfotericina B	Inibição da via de síntese de ésteres de membrana.
Pentamidina	Interação com o cinetoplasto.

Fonte: Croft e Coombs (2003)

1.1.5 Toxinas de serpentes – Fosfolipases A₂

No Brasil, as serpentes peçonhentas de interesse médicos são representadas por quatro gêneros da Família Viperidae: serpentes do grupo *Bothrops* (jararaca, jararacussu, urutu, caíçaca, combóia), o qual, atualmente, está agrupado em dois gêneros – *Bothrops* e *Botrocophias*; *Crotalus* (cascavel); *Lachesis* (surucucu-pico-de-jaca); *Micrurus* e *Leptomicrurus* pertence a família Elapidae (coral-verdadeira) (Brasil, 2016).

A *Bothrops jararacussu* é uma serpente peçonhenta que alcança quase dois metros de comprimento, distribuída na região sudeste em florestas tropicais e no cerrado. Essas serpentes habitam, preferencialmente, os ambientes úmidos, como mata e áreas cultivadas;

locais de proliferação de roedores, zonas rurais e periferias de grandes cidades (BERNARDE, 2009).

Estes animais possuem uma variedade de toxinas em suas peçonhas com grandes atividades biológicas, sendo também uma grande fonte natural de bioativos que são extremamente atrativas para os cientistas na investigação e desenvolvimento de novos protótipos para fármacos biológicos ou sintéticos. Todas as peçonhas bothrópicas possuem fosfolipases- A_2 (PLA₂S) metaloproteases, serino proteases, acetilcolinesterases, L-aminoácidos oxidases e hialuronidades. Sendo que dois dos componentes mais importantes de venenos de serpentes são as fosfolipases- A_2 (PLA₂S) e metaloproteases que exibem uma larga variedade de efeitos farmacológicos (KINI, 1997).

Embora as moléculas semelhantes às fosfolipases PLA₂ e toxinas PLA₂ tenham alta semelhança em sequência e estrutura algumas apresentam diferenças na substituição da Asp-49 por uma Lys ou Serina, esta mudança na estrutura promove uma a atividade enzimática que pode ser completamente diferente uma da outra (DE PAULA, 2009).

Recentemente foi demonstrado em um estudo filogenético que as fosfolipases A_2 presentes na peçonha de serpentes da família Viperidae podem ser classificadas em dois grupos I e II de acordo com sua estrutura química (DOS SANTOS et al., 2011). As fosfolipases A_2 foram identificadas com base na sua estrutura primária padrão e na quantidade de ponte de dissulfeto encontrada na sua estrutura. O grupo I inclui a família Elapidae e o grupo II, Viperidae e subfamílias Crotalinae. Miotoxinas isoladas a partir desses venenos pertencem ao grupo IIA e podem ser divididas em dois subgrupos: miotoxinas com atividade enzimática, denominados PLA₂-Asp49 e miotoxinas sem atividade hidrolítica, denominados PLA₂ Lys49 homólogas. KINI e EVANS, 1989; SOARES e GIGLIO 2004; MURAKAMI, SATO e TAKETOMI, 2015).

Ainda conforme alguns autores, as Fosfolipases são proteínas distribuídas amplamente na natureza, e são agrupadas de acordo com suas estruturas. As fosfolipase do grupo A_2 (PLA₂S; EC 3.1.1.4) pertencem a uma superfamília de proteínas que hidrolisam a ligação sn-2 em fosfolipídios da membrana para liberar os ácidos graxos, ácido araquidônico e fosfoglicérideos (BURKE e DENNIS, 2009; MURAKAMI E KUDO, 2004; MURAKAMI, SATO e TAKETOMI, 2011; SIX e DENNIS, 2000).

Segundo os dados da literatura as peçonhas bothrópicas apresentam uma peculiaridade importante que é a de induzir séria reação inflamatória no local da picada onde ocorre uma forte dor com formação de edemas hemorragias e também a mionecrose. O ácido graxo e o ácido araquidônico gerados desta reação são importantes, pois o ácido araquidônico é convertido por enzimas metabólicas em compostos bioativos como as prostaglandinas os

leucotrienos e os eicosanoides, que são mediadores de diversas condições patológicas especialmente nos processos inflamatórios (NEEDLEMAN, et al., 1986).

Este diversificado perfil farmacológico podem ser explicadas pelo modo particular de evolução destas toxinas adquiridos através da seleção positiva nos exons codificadores de proteínas por um processo evolutivo acelerado que resultou em muitas variantes com diversos efeitos farmacológicos (KINI e EVANS, 1989, SOARES e GIGLIO, 2004).

Nas serpentes dos gêneros *Bothrops*, as PLA₂s são os principais componentes de peçonhas produzidas por espécies classificadas neste grupo animal. Além de seu papel de catalisador primário, a PLA₂s da peçonha de serpente mostra outros efeitos importantes tóxico e farmacológico, tais como neurotóxico, miotóxico, edematogênica, hipotensor, agregação de plaquetas, e cardiotoxicas atividades anticoagulantes. Alguns destes efeitos estão correlacionados com a atividade enzimática, mas outras são completamente independentes destas atividades (ANDRIÃO-ESCARSO, et al., 2002; GUTIÉRREZ; LAMONTE e KINI, 1997; KINI, e EVANS, 1989; SOARES e GIGLIO, 2004).

A bothropstoxina-II (BthTX-II) usada neste projeto é uma fosfolipase A₂ isolada da peçonha da *Bothrops jararacussu*, que exibe ação miotóxica, cuja sequência de aminoácidos foi posteriormente caracterizada e identificada como uma PLA₂-Asp49 básica, possui 122 aminoácidos, massa molecular de aproximadamente 14 kDa, apresentando 5 a 8 pontes dissulfeto (SOARES, et al., 2004; HOMSI-BRANDERBURGO, et al., 1998; ANDRIÃO-ESCARSO, et al., 2000).

Com relação ao potencial arsenal terapêutico apresentado por moléculas bioativas de origem animal, as peçonhas de serpentes são misturas complexas de substâncias farmacológicas com proteínas ativas, como as fosfolipases A₂ (PLA₂s), um de seus principais componentes. PLA₂s homólogas cataliticamente inativas, como as Lys49, Arg49 e algumas PLA₂-Asp49 e Lys49-PLAs, que atuam por um mecanismo independente de cálcio ainda não está bem esclarecido (DOS SANTOS, et al., 2011).

As PLA₂-Asp49 constituem componentes do veneno de serpentes e têm sido extensamente estudadas, não só porque são abundantes nestes venenos, mas principalmente porque exibem grande variedade de efeitos biológicos. Além de sua função catalítica primária, as PLA₂ apresentam ainda atividades farmacológicas adicionais tais como: anticoagulante, neurotóxico, miotóxico, formadora de edema, hemolítica, hipotensiva, pré e pró-sináptica, cardiotoxicas, agregadora de plaquetas, bactericida, anti-HIV, antitumoral, antimalárica e antiparasitária (SOARES, 2012). Ainda em um estudo recente, foram relatadas atividades pró-inflamatórias do veneno da *B jararacussu*. Os compostos chamados de pró-inflamatórios,

promovem a inflamação e com isto secretam muito mais mediadores da inflamação como as citocinas. (STÁBELI, et al., 2006, SOARES, 2012, WANDERLEY et al., 2014).

Uma das estratégias experimentais para o estudo da relação e estrutura e função de PLA₂s miotóxicas é a modificação química tradicional de resíduos de aminoácidos específicos (His, Met, Lys, Tyr, Trp e outros). Esta linha de pesquisa tem fornecido informações úteis sobre os determinantes estruturais da ação destas enzimas e, juntamente com outras estratégias, apoia o conceito da presença de domínios farmacológicas distintas do sítio catalítico em PLA₂s miotóxicas do veneno de serpente (SOARES e GIGLIO, 2004).

De acordo com alguns autores, proteínas como as PLA₂, derivadas da peçonha de serpentes, são consideradas citotóxicas, *in vitro*, para *Leishmania* spp, *Tripanosoma* spp, bactérias e *Plasmodium* spp. Vários estudos mostram o potencial antimicrobiano de peçonhas de serpentes neotropicais, especialmente daquelas do gênero *Bothrops* (STÁBELI et al., 2006). Ainda, CISCOTTO, et al., (2009) demonstra que peçonhas de *B. jararaca* apresentaram uma inibição significativa do crescimento de *S. aureus* e também contra outros tipos de bactéria Gram-positivas e Gram-negativas.

1.1.6 Sistemas de liberação modificada de fármacos: lipossomas

Uma das importantes aplicações de nanotecnologia e nanomedicina é o desenvolvimento de novas moléculas com dimensões em nano-escala para aplicações médicas (PARK, et al, 2008). As nanoparticulas têm propriedades que podem ser utilizados para melhorar as propriedades farmacológicas e terapêuticas de drogas. A nano-encapsulação de moléculas bioativas terapeuticamente potentes não apenas fornece um meio para uma melhor distribuição dos fármacos, mas também aumentam a estabilidade, biodisponibilidade e aplicação de fármacos específicos (SAHA, et al., 2014).

O avanço da pesquisa no campo da tecnologia de nanoparticulas tem atraído cientistas para explorar os domínios de potenciais bioativos como biomoléculas de animais. A conjugação de nanoparticulas com toxinas visa direcionar a entrega de bioativos, aumentar a eficácia do medicamento, melhorar o diagnóstico por imagem e gerar alguns medicamentos de baixo custo para a medicina alternativa do futuro (BISWAS, et al., 2012).

Um exemplo desta abordagem seria a de encapsular potentes venenos-toxinas de origem animal em nanoparticulas pelas suas propriedades terapêuticas únicas, aumentando assim o seu valor medicinal, e ao mesmo tempo as nanoparticulas com veneno-toxinas podem atuar como uma ferramenta para melhorar a entrega de drogas, como terapia-alvo, melhorando a interação em nível celular, e aumentando assim a eficácia da toxina-veneno e o valor

medicinal das biomoléculas, e ainda abrindo novos caminhos para encapsular peçonhas de serpentes em lipossomos. (BISWAS, et al, 2012).

Os sistemas carreadores como nanopartículas, lipossomas entre outros são naturalmente fagocitados pelos macrófagos por endocitose e, portanto, podem ser usadas como carreadores de drogas sendo possível de direcionar o bioativo para o sítio da infecção. Este fato levou ao desenvolvimento de vários tipos lipossomas e dispersões coloidais, com base em formulações de complexos lipídicos como do AmBisome, *Amphotec* e Abelcet. Estes fármacos encapsulados têm-se mostrado possuir grande atividade quimioterapêutica superior em tratamento de leishmaniose em relação ao tratamento convencional. Essa superioridade é atribuída ao sistema de entrega intracelular de drogas para os macrófagos. O aumento da eficácia do tratamento foi associado com a diminuição da toxicidade da Anfotericina B incluindo nefrotoxicidade e hipocalcemia (TEMPONE, et al., 2010).

Os lipossomas são vesículas esféricas e microscópicas compostas de fosfolipídios naturais ou sintéticos que se agregam em bicamada. São compostos de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por fases aquosas e englobando um compartimento aquoso interno. Estes podem encapsular substâncias hidrofílicas ou lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso interno e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na membrana lipídica (EDWARDS e BAEUMNER, 2006).

Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicas *per se*, os lipossomas são estruturas versáteis com características de reduzir potenciais toxicidades das substâncias. Além disso, permitem modificações na sua composição lipídica, que permitem o seu endereçamento para alvos celulares específicos (BHOWMICK; RAVINDRAN e ALI, 2009). São de natureza anfótera, pois são constituídos por uma fase externa contendo um sistema de membranas fosfolipídicas e uma fase interna constituída por um meio aquoso. Sendo possível encapsular uma grande variedade de moléculas dentro desses espaços.

Estes sistemas vesiculares representam uma terapia mais eficiente para algumas doenças, como por exemplo, para o tratamento da leishmaniose com Anfotericina B lipossomal. No tratamento desta doença os lipossomas controlam a liberação da droga, aumentando a sua farmacocinética nos tecidos e reduzindo a toxicidade (NICOLETTI, et al., 2009). Estas vesículas são constituídas basicamente por fosfolipídeos, esteróis e um antioxidante (VEMURI e RHODES, 1995).

Os lipídeos mais utilizados nas formulações de lipossomas são os que apresentam uma forma cilíndrica como as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiéline, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. As fosfatidilcolinas são as mais empregadas em estudos de formulação de lipossomas, pois

apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

Barros, et al., (2013) demonstrou que formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* têm seu crescimento inibido, assim como a redução do índice fagocítico, quando submetidas ao tratamento com Lupano-lipossomal. Além disso, foi observado que nos camundongos infectados com *L. amazonensis* e submetidos a tratamento com Lupano-lipossomal houve significativa redução no tamanho das lesões da pata (33%), quando comparadas aos grupos infectados e não tratados. Esse tratamento também se demonstrou capaz de ativar as células na produção de $TNF\alpha$, IL 12 e de inibir a produção de IL 10.

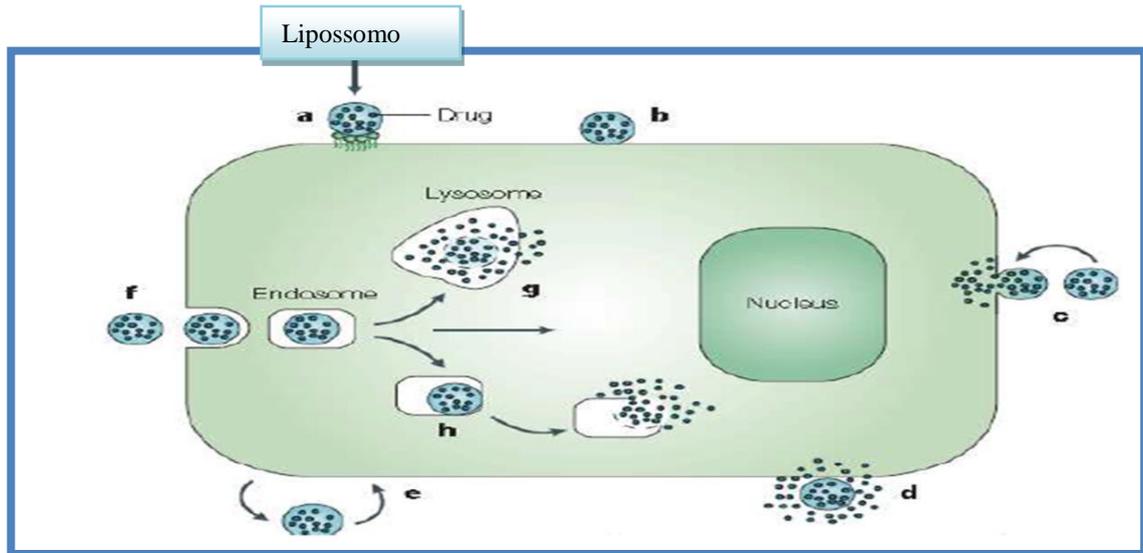
Além de aumentar a resposta das células T CD4+, os lipossomos podem induzir resposta de linfócitos T CD8+ (CHIKH e SCHUTZE-REDELMEIER, 2002). No caso da leishmaniose, principalmente com fins de imunização, esta é uma grande vantagem, pois os linfócitos T citotóxicos também participam da proteção desenvolvida contra a doença (COLMENARES, et al., 2004).

A interação dos lipossomos com as células no organismo é a base da sua aplicação no transporte da molécula ativa. A liberação do fármaco pode acontecer de várias maneiras (Figura 2). O lipossomo pode ser adsorvido à membrana celular, onde ocorrerá a liberação de alguns componentes no fluido extracelular, alguns dos quais podem passar através da membrana, entrando na célula. As vesículas lipossomais podem ser capturadas pelo processo de fagocitose ou endocitose e então serem degradadas pelos lisossomos, liberando seu conteúdo no citoplasma. O conteúdo lipossomal pode também entrar na célula diretamente e o lipossoma se fundir com a membrana celular e os lipossomas podem ainda intercambiar seus lipídeos com os da membrana celular (LASIC, 1993).

Os lipossomas constituídos de fosfolipídios naturais e colesterol possui uma farmacocinética caracterizada por alta velocidade de depuração do plasma. Essas vesículas são rapidamente removidas da circulação por macrófagos (FRANK, 1993).

Os lipossomas funcionam como um sistema de liberação de fármacos até os tecidos-alvo, disponibilizando apenas uma fração controlada do fármaco para o sítio de ação. (MACHADO; GNOATO; KLUPPEL, 2007). A captura dos lipossomas pelas células-alvo ocorre pelo processo de opsonização, assim que os lipossomas entram em contato com os componentes do sangue. Nesta fase, as proteínas do complemento C3b ligam-se à superfície dos lipossomas e servem como sinal para os macrófagos fagocitarem (BORBOREMA, et al., 2011).

Figura 2: Interação entre o lipossomo e células do organismo



Os lipossomos podem interagir especificamente com a célula (a) ou fundir-se na superfície da célula (b). Pode ocorrer a adsorção dos lipossomos à superfície da célula (c), onde os lipossomos podem ser submetidos a troca direta ou transferência mediada por proteínas dos componentes lipídicos com a membrana celular. Via pinocitose, o fármaco pode entrar e ser liberado na célula (d). Os lipossomos podem realizar intercâmbio molecular entre a parede dos lipossomos e a parede da célula (e). Por endocitose (f), o lipossoma pode ser entregue pelo endossomo ao lisossomo e o fármaco ser liberados no citoplasma (g). Ou ainda o lipossomo pode provocar desestabilização no endossomo, que resulta na liberação do fármaco no citoplasma da célula (h). (Fonte: (BORBOREMA, et al., 2011) com modificações.

Estudos têm apontado novas e práticas formas de utilização dos lipossomas como transportadores de substâncias terapêuticas como ferramentas alternativas nos tratamentos de doenças. Atualmente os lipossomas ocupam uma posição de destaque no tratamento de leishmanioses, esquistossomose, doença de Chagas e câncer. Encontram ainda largo emprego como transportadores de imunobiológicos e de medicamentos antimicrobianos. Os resultados obtidos nessas situações sugerem que esse é um sistema transportador ideal para direcionar medicamentos aos sítios afetados. As pesquisas atuais estão focadas na obtenção de lipossomas com alto grau de seletividade e especificidade para tecidos e que apresentem tempo de permanência no local significativamente prolongado (MACHADO; GNOATO; KLUPPEL, 2007). Dentre essas alternativas, peçonhas naturais e suas toxinas isoladas, existentes nas serpentes, podem ser potencialmente encapsuladas em lipossomas.

Devido ao grande impacto da leishmaniose na saúde pública mundial, a ampliação da incidência da doença, incluindo a difusão para novas áreas geográficas - inclusive urbanas - as dificuldades associadas aos tratamentos empregados e a ausência de tratamentos eficazes, torna-se relevante a busca de novas medidas curativas e preventivas.

A pobreza está intrinsecamente relacionada com a ocorrência de doenças tropicais negligenciadas (DTNs). Os principais países com os menores índices de desenvolvimento humano (IDH) e a maior carga de DTNs estão nas regiões tropicais e subtropicais do globo

terrestre (DNDI, 2014). A importância dessa doença não se deve apenas a sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também à possibilidade de produzir lesões destrutivas e desfigurantes, com importante repercussão no quadro psicossocial do paciente. Essas doenças são consideradas negligenciadas devido à falta de investimento no desenvolvimento de novas drogas e vacinas e também pela pouca eficácia dos programas de controle (LINDOSO e LINDOSO, 2009).

As limitações no uso dos fármacos leishmanicidas atuais e o aumento da resistência do parasita a fármacos convencionais, bem como a presença de proteínas de grupos diferentes em peçonhas de serpentes justificam o desenvolvimento deste trabalho na busca novos compostos bioativos antileishmania a partir de peçonha/toxinas da serpente *B. jararacussu*, encapsulados em sistema lipossomal.

Estudos voltados para explorar o potencial terapêutico dos lipossomas no tratamento contra a leishmaniose revestem-se de importância, pois estas vesículas podem ajudar a minimizar os efeitos colaterais/adversos causados pelas atuais terapêuticas e também podem servir de veículo para processos de vacinação, favorecendo assim o desenvolvimento de novas tecnologias que auxiliarão no tratamento do paciente.

Acredita-se que o encapsulamento da PLA₂-Asp49 possa contribuir de maneira expressiva para a diminuição da parasitemia da lesão ou até mesmo a cura dos camundongos infectados com *L. amazonensis*. O desenvolvimento de novos protótipos de fármacos é o grande desafio mundial do momento e este estudo tem por objetivo avaliar o efeito antileishmania de uma PLA₂-Asp49 encapsulada da peçonha de *Bothrops jararacussu* sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* e *in vivo* a potencial atividade antileishmania *amazonensis* da PLA₂-Asp-49 de *Bothrops jararacussu* encapsulada em sistema lipossomal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar:

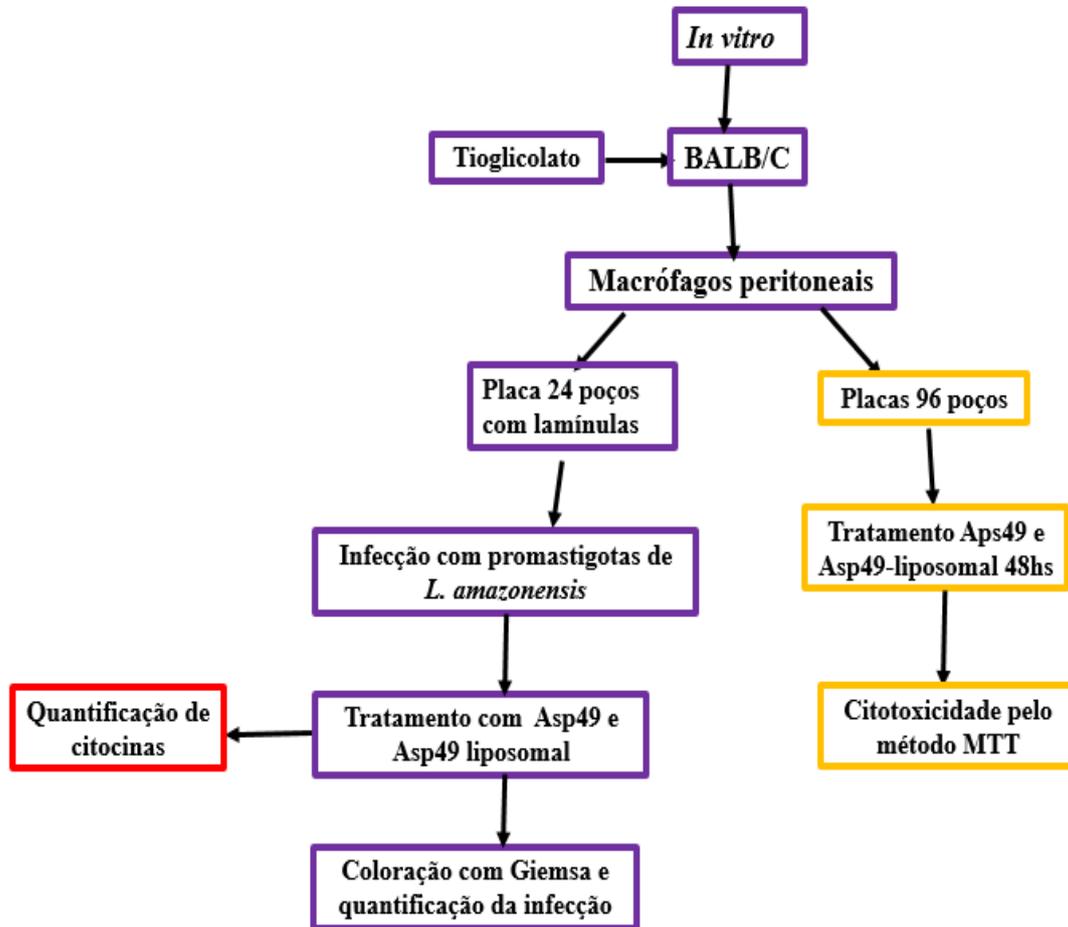
- A caracterização *in vitro* dos lipossomas através do tamanho, potencial Zeta e taxa de encapsulação.
- A citotoxicidade *in vitro* da Fosfolipase PLA₂-Asp49 utilizando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e promastigotas de *L. amazonensis*.
- O crescimento e a sobrevivência *in vitro* de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais murinos após incubação com lipossoma contendo a fosfolipase PLA₂ -Asp49.
- A produção das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-12 e óxido nítrico no sobrenadante dos macrófagos peritoneais murinos incubados com os lipossomos e também no soro de camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com a PLA₂-Asp49 lipossomal.
- A ação da PLA₂-Asp49 encapsulada em lipossoma na infecção experimental em camundongos BALB/c.
- A redução do tamanho da lesão após o tratamento com PLA₂-Asp49 lipossomal.
- A recuperação de amastigotas dos tecidos linfonodo e pata e histologia dos tecidos a fim de observar o efeito do tratamento.
- A produção *in vivo* de TNF α , IL-10 e IL-12 óxido nítrico no sobrenadante do macerado dos tecidos linfonodo, pata e soro de camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal.
- Em concentrações diferentes de fosfolipases e em diferentes tamanhos de lipossomas na busca dos melhores resultados dos objetivos acima.

ESTUDOS *IN VITRO*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS COM PLA₂-ASP49

Figura 3: Esquema do fluxograma *in vitro*



3.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, machos, com 8-10 semanas de idade, pesando de 20-28g, obtidos do Biotério do IPEPATRO/FIOCRUZ-RO. Os animais foram mantidos em condições padronizadas de biotério. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPEPATRO-FIOCRUZ-RO, mediante aprovação do projeto de pesquisa sob nº 2013/1.

3.3 PARASITAS

Neste trabalho foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), cuja cultura original foi cedida pelo Dr. Francisco Juarez Ramalho Pinto, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

As culturas foram mantidas a partir de camundongos BALB/c, previamente inoculados com 10^5 promastigotas de *L. amazonensis*, pela via subcutânea, na pata traseira direita. Depois de dois meses de infecção os animais foram eutanasiados e as patas contendo a lesão foram removidas e a pele necrosada retirada, em condições estéreis. Em seguida as patas foram maceradas em meio RPMI liberando as amastigotas de *L. amazonensis*. Essa cultura foi mantida a 24°C para a transformação das amastigotas em promastigotas.

O material obtido da maceração foi centrifugado a 1000 RPM por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o *pellet*, ressuspensão em meio RPMI/SFB (RPMI suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino).

Para a propagação *in vitro* destas promastigotas, uma alíquota de parasitas, em fase estacionária de crescimento, foi diluída em eritrosina B (0,04%) e contada em câmara de Neubauer espelhada, em microscópio óptico (aumento de 400X). Os parasitas corados de vermelho foram considerados mortos e aqueles birrefringentes e móveis foram considerados vivos. O cálculo foi feito utilizando-se a fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de parasitas} = \text{n}^\circ \text{ de parasitas contados} \times \text{inverso da diluição} \times 10^4$$

Após a realização dos cálculos, 5×10^5 promastigotas/mL foram colocadas em meio RPMI/SFB. Os parasitas foram mantidos a 24°C e repicados, a cada cinco dias, por sucessivas passagens, até um máximo de oito passagens.

3.4 MEIO DE CULTURA

O meio de cultura utilizado para a propagação *in vitro* das promastigotas de *L. amazonensis* foi o RPMI 1640 (Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco™, Invitrogen). O RPMI 1640 foi preparado, reconstituindo-se o pó em 1 L de água destilada, adicionando 20mM de HEPES (N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2,2, ácido etanosulfônico; GIBCO BRL) e 50µg/mL de gentamicina. Depois de preparado, o meio RPMI 1640 foi esterilizado por filtração em membrana de nitrocelulose de poro 0,22µm (Millipore).

3.5 FOSFOLIPASE A₂ A SER ENCAPSULADA

A PLA₂-asp49 utilizadas neste trabalho foi isolada da peçonha da serpente *B. jararacussu* e gentilmente cedida pelo Centro de Estudos de Biomoléculas aplicadas a saúde (CEBio), da universidade Federal de Rondônia (UNIR) e Fundação Osvaldo Cruz Rondônia, Porto velho-RO. Autorização CGEN, nº 010627/2011-1

4. METODOLOGIA

4.1 PURIFICAÇÃO DA FOSFOLIPASE A₂

A BthTX-II (PLA₂-Asp49) utilizada neste trabalho foi obtida conforme procedimento descrito por Andrião-Escarso, e colaboradores (2002) e Stabelli, et al., (2012), com modificações. De forma sucinta, 40mg de peçonha bruta da serpente *B. jararacussu* foi solubilizada em tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 50 mM, pH 8,0 e centrifugadas por 10 minutos a 10.000 xg para sedimentação do material insolúvel.

O sobrenadante foi aplicado em coluna contendo resina CM-Sepharose© (1cm x 40cm) previamente equilibrada com o tampão utilizado para solubilizar a amostra. O fracionamento cromatográfico foi realizado em sistema Akta Purifier 10©, sob gradiente linear de AMBIC 50 a 500 mM por 5 volumes de coluna, sob fluxo de 1 mL/minuto. A eluição das proteínas foi monitorada em 280 nm e as frações coletadas manualmente. Gentilmente cedida pelo Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Medicina (CEBIO), da Universidade Federal de Rondônia (UNIR) e Fundação Oswaldo Cruz Rondônia, Porto Velho-RO.

4.2 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram preparados conforme descrito por Barros, et al., (2013) com modificações. Na preparação dos lipossomas foram utilizados os lipídios dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS) e colesterol, na proporção (5:1:3 m/m). Os lipídios foram dissolvidos em 1 mL de solução clorofórmio/metanol (1:1 v/v). Em seguida, o tubo foi submetido ao vórtex e banho ultrassom (2 minutos vórtex/2min. banho), repetidas vezes, até os lipídios se dissolverem por completo formando uma emulsão. Com a dissolução dos lipídios, a solução clorofórmio/metanol foi removida através de evaporação, dando origem a um filme de lipídeos na parede interna do recipiente. Este filme foi secado a vácuo em um dessecador, por cerca de 18h e posteriormente, os lipídeos foram ressuspensos em 1mL de tampão PBS 1X, pH 7,4. A solução foi incubada por 1 h a 60°C, com agitações em vórtex a cada 10 minutos.

A emulsão foi submetida a um extrusor (LiposoFastTM, Avestin, Canadá) com uma membrana de policarbonato com poros de 200 nm de diâmetro, por 30 vezes, para produzir uma população de lipossomas de tamanho uniforme. Para a preparação de PLA₂-Asp49-lipossomal, 2 mg de PLA₂-Asp-49 diluído em 1 mL de PBS 1X, pH 7,4 foram adicionados à solução de lipídeos no início da preparação.

4.2.1 Determinação do tamanho e potencial zeta dos lipossomas

A determinação do tamanho das vesículas foi realizada a 25°C, por meio de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS). A distribuição do tamanho é obtida pelo índice de polidispersão (IP). O potencial zeta é medido por um instrumento no qual é inserida uma pequena amostra da suspensão, oferecendo leitura em mV, que pode ser um número positivo ou negativo. O valor medido fornece uma indicação a respeito da estabilidade da suspensão.

As medidas do potencial zeta médio das vesículas foram realizadas a 25°C, pela técnica de micro eletroforese associada à anemometria Doppler. As medidas foram realizadas com amostras diluídas na faixa de vinte vezes, utilizando água destilada como meio de dispersão, em equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, Inglaterra).

4.2.2. Determinação do teor de proteínas de PLA₂-Asp49 em lipossomas

A taxa de PLA₂-Asp49 encapsulada nos lipossomas foi determinada pelo método indireto, em que a fosfolipase livre foi determinada no sobrenadante, enquanto a concentração total foi quantificada após quebra do lipossoma em suspensão. Para a determinação da concentração total de toxina nos lipossomas foi adicionado Triton X-100[®] (3%) a uma alíquota da suspensão, mantendo em banho-maria a 37°C por 30 minutos para quebra dos lipossomos. Após esse período a suspensão foi centrifugada para a separação das fases e uma alíquota foi coletada da fase aquosa para quantificação.

A PLA₂-Asp49 livre foi determinada no sobrenadante após a centrifugação de outra alíquota da suspensão (100xg; 30 min). Em seguida foi realizada uma diluição em placa de 96 poços da seguinte maneira: uma alíquota (10µl) do sobrenadante foi coletado e adicionado em cada poço da placa contendo 200 µL do mix do reagente de BCA 50:1 (196 µL do reagente A + 4 µL do reagente B). Foi incubado por 30 min a 37°C. Curva padrão com albumina bovina (BSA), utilizando a solução de BSA padrão incluída no kit. A curva padrão foi preparada em eppendorfs, sendo transferido um volume para a placa de 96 poços para quantificação, conforme descrito na tabela a seguir:

Tabela 2: distribuição dos volumes curva padrão

Tubo	Água (µL)	BSA Sol (µL)	Volume usado (µL)*	[BSA] (µg/mL)
1	0	300 do estoque	10	2000
2	125	375 do estoque	10	1500
3	375	325 do estoque	10	1000
4	175	175 do tubo 2	10	750
5	325	325 do tubo 3	10	500
6	325	325 do tubo 5	10	250
7	325	325 do tubo 6	10	125
8	400	0	10	0= branco

Referência Olson e Markwell, (2007).

A taxa de dosagem de proteínas de PLA₂-Asp49-liposomal determinada pelo método BCA (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'- biquinolina), por meio de curva padrão obtida através das concentrações de 2000 até 125µg/mL de soro albumina bovina (BSA) (OLSON e MARKWELL, 2007).

A leitura de absorbância das amostras foi realizada por leitora de placas de 96 poços (ASYS, UVM 340) em 595 nm. Os dados de absorbância das soluções da curva padrão foram plotados e uma curva correspondente à absorbância x concentração proteica foi construída. Os dados de absorbância das amostras foram substituídos na equação da reta e a concentração proteica de cada amostra foi obtida em µg/mL.

4.2.3 Obtenção dos macrófagos peritoneais

Para a obtenção de macrófagos peritoneais, camundongos BALB/c foram inoculados, por via i.p., com 2 mL de solução Tioglicolato 3%. Após cinco dias os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Em seguida, 5 mL de meio RPMI gelado foram injetados na cavidade peritoneal e em seguida recuperados com pipeta de Pasteur. O lavado peritoneal foi centrifugado a (239xg) por 10 min a 4°C e o sobrenadante, desprezado. Em seguida, o ‘pellet’ foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI e as células obtidas, contadas em câmara de Neubauer.

Os macrófagos (2,5 x 10⁵/poço) foram plaqueados em placa de 24 poços contendo lamínulas estéreis e incubados a 37°C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (Estufa modelo RCO3000TVBB, REVCO Technologies, Asheville, USA).

4.2.4 Análise in silico (docking)

Para a pesquisa e a recuperação da estrutura de proteínas foi utilizado o *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.pdb.org>). O alvo da busca foi a estrutura da BthTX-II de *B. jararacussu* depositada em PDB (ID: 3JR8) para ser analisada com Chebi: 79098, (Fosfotidilcolina), Chebi: 16.113 (colesterol) e PubChem: 24898720 (Fosfotidilserina). Para identificar potenciais locais de ligação dos compostos, foi realizado um processo de *docking*-molecular automatizado utilizando o *software Swiss Dock* (GROSDIDIER; ZOETE e MICHIELIN, 2011; 2011). O acoplamento foi realizado utilizando o parâmetro "exato", sem nenhuma região de interesse definida (encaixe cego).

As estruturas dos compostos foram extraídas da base de dados ChEB (https://www.ebi.ac.uk/chebi/init.do) e Pubchem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/). A visualização interativa, análise e conversão de estruturas moleculares foram realizadas em *Swiss-PDB viewer* (GUEX e PEITSCH, 1997) e *UCSF Chimera* (GODDARD; HUANG e COUCH, (2004) enquanto que as imagens da estrutura com *Persistence of Vision Raytracer* (POV-ray) 3.62 (<http://www.povray.org>).

4.2.5 Ensaio de citotoxicidade

Os macrófagos J774 foram plaqueados ($2,5 \times 10^5$ células/poço) em placas de 96 poços. Após 24 horas foram adicionadas diferentes concentrações de lipossomos em cada poço. Após incubação de 48 horas foram adicionados 10 μ L de solução de MTT (5 mg/mL).

Após 4 horas de incubação a 37°C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ foram adicionados 100 μ L de DMSO para dissolver os cristais de formazan formados. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa a 570 nm. Os valores de IC₅₀ (50% de inibição de crescimento celular) foram calculados utilizando a análise de Probabilidade (MINITAB® 14.1. Minitab Inc. 2003 Statistical Software).

Os cálculos foram realizados utilizando-se a equação 1:

$$\% \text{ inibição} = 1 - \frac{D.O. \text{ amostra}}{D.O. \text{ controle}} \times 100$$

4.2.6 Atividade antileishmania *in vitro* de PLA₂-Asp49-liposomal

A atividade antileishmania *amazonensis* foi determinada pelo método MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5 difeniltetrazólio). As promastigotas (5×10^5 células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após plaqueamento, diferentes concentrações (100, 50, 12,5, 6,25 µg/mL) de PLA₂-Asp49 solução, PLA₂-Asp49-liposomal, e lipossoma controle foram adicionados em cada poço, além do fármaco Pentamidina® (5 µg/mL) como controle de referência. Após 48 horas de incubação, foram adicionados 10 µL de solução de MTT (5mg/mL). A seguir, a placa foi incubada em estufa B.O.D. a 24°C, por 4 horas. Decorrido o tempo foram adicionados 100 µL de DMSO. Após 1 hora foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro de placa a 570 nm. Os resultados foram expressos conforme equação descrita no item anterior.

4.2.7 Determinação do índice de seletividade

Para avaliar o índice de seletividade de PLA₂-Asp49-lipossomal, foram realizados ensaios de citotoxicidade com os macrófagos J774 e as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os ensaios de MTT foram realizados conforme o item 4.2.5 descrito por NICOLETE et al. (2009).

Os cálculos foram realizados utilizando-se a equação 2:

$$IS = \frac{LC50 (Macrófagos)}{IC50 (promastigotas)}$$

IS = índice de seletividade

IC = Concentração capaz de inibir 50%

LC = Concentração letal 50%

4.2.8 Infecção e tratamento de macrófagos peritoneais

Para avaliação da atividade antileishmania da PLA₂ (Asp49) foram realizados ensaios de infecção em macrófagos peritoneais. Estes ensaios foram realizados conforme descrito por Silva-Jardim, et al., (2004). Os macrófagos, depois de 24 horas de incubação, foram lavados duas vezes com meio RPMI e, em seguida, infectados com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas x 1 macrófago. As células infectadas foram incubadas “overnight” a 33°C em estufa com atmosfera úmida contendo a 5% de CO₂.

Após esse período os poços foram novamente lavados com RPMI e tratados com 100, 50, 12,5 e 6,25 µg/mL de uma solução estoque de 2.000 µg/mL de PLA₂-Asp49-solução,

lipossomo controle e PLA₂-Asp49-lipossomal a 25%. Para o controle contendo uma droga de referência foram adicionados 150 µL de Glucantime® (300 µg/mL), em um volume final de 500 µL/poço. Para controle positivo da infecção foram utilizadas células infectadas não tratadas. As culturas infectadas e tratadas foram mantidas por 48 h a 33°C. Após esse período, o sobrenadante das culturas foi coletado e congelado para posterior dosagem de citocinas e NO.

A taxa de infecção e o número de parasitas intracelulares foram avaliados pela contagem de 100 macrófagos, em microscópio óptico - aumento de 1000X, após coloração das lâminas pela técnica May Grünwald-Giemsa (MGG) (modificado de GIAIMIS, et al., 1992). Resumidamente, as células foram coradas com kit panótico (New Prov). Inicialmente, foi colocada a solução nº 1 dentro do poço por 10 seg. e retirada, a seguir colocada a solução nº 2 por 20 seg. e retirada e por fim colocada a solução nº 3 e em seguida retirada. Finalmente, a lamínula foi lavada rapidamente com água destilada e, depois de seca, montada com bálsamo sobre uma lâmina de vidro. O índice fagocítico foi determinado utilizando-se a equação:

$$\text{Índice fagocítico} = \% \text{ de macrófagos infectados} \times \text{n}^\circ \text{ total de Leishmania}$$

4.2.9 Produção de Óxido Nítrico e citocinas TNF- α , IL10, IL 12 *in vitro*

As citocinas TNF- α , IL-10 e IL-12 foram quantificadas nos sobrenadantes de cultura dos macrófagos e no sobrenadante dos macerados do tecido da pata e dos linfonodos. Para cada citocina as dosagens foram realizadas através do teste imunoenzimático ELISA de captura. Para isso foi utilizado o kit BD OptEIA™ (BD Biosciences), de acordo com instruções do fabricante. A produção de óxido nítrico (NO) pelos camundongos infectados com parasitos, tratados ou não, a concentração de nitritos como medida indireta da produção do gás NO foi quantificado nos sobrenadantes do macerado dos tecidos, pata, linfonodos e soro.

O acúmulo de nitrito no sobrenadante foi medido pelo método de Griess, que consiste em adicionar 100 µL do reagente de Griess recém preparado a igual volume dos sobrenadantes das culturas. As concentrações de nitritos nos sobrenadantes das culturas foram calculadas a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) com concentrações variando de 100 a 0,29 µM. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Labsystems Multiscan) em um comprimento de onda de 540 nm. Em todos os experimentos foram utilizados controles sem adição de droga e controles com e sem estímulo. Todos os testes foram realizados em duplicata.

4.2.10 Análise Estatística

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas considerando-se as Médias \pm Desvio Padrão obtidos. A análise de variância foi realizada com determinação do nível de significância para $p < 0,05$, aplicando-se teste de comparações múltiplas (One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni). Foi utilizado o software GraphPad prism 5 Demo 5.03; SPSS Inc. GPW5-614601-RAG-1147, 2013.

RESULTADOS *IN VITRO*

5. RESULTADOS *IN VITRO*

5.1 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO, POTENCIAL ZETA E DA TAXA DE ENCAPSULAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Neste estudo utilizamos vesículas unilamelares grandes (LUVs), que são lipossomos formados por uma única bicamada lipídica e com tamanhos superiores a 200 nm. Foram preparados lipossomos contendo o composto bioativo e os lipídios estruturais, formando assim PLA₂-Asp49-lipossomal; e para controle foram preparadas vesículas de lipossomo contendo somente os lipídios sem o composto ativo, denominados Lip-controle. O potencial Zeta é uma ferramenta útil, para prever e controlar a estabilidade do tamanho e o potencial zeta das vesículas. São também usadas na elucidação do mecanismo de associação de substâncias ativas às vesículas (ALONSO, et al., 1991). A medida desta propriedade permite obter informações sobre a estabilidade do sistema e de como as propriedades superficiais são modificadas nos processos e formulações.

Logo após a preparação dos lipossomos foram realizados os estudos dos tamanhos das vesículas pelo Zetasizer Nano ZS (Malvern, Inglaterra), onde a partícula com carga superficial negativa, cujo potencial elétrico em relação a uma superfície de referência pode ser medido em miliVolts (mV). Esta superfície, contendo cargas elétricas negativas, atrairá as cargas elétricas positivas presentes na suspensão, formando em torno de si um envoltório com cargas positivas que possui um potencial elétrico em relação à mesma superfície de referência medido em mV. Após análise, os resultados demonstraram que houve uma população de vesículas entre 205,2 para lip-controle e uma população homogeneia de 241,9 para PLA₂-Asp-lipossomal.

Tabela 3: Resultados das análises de tamanho, potencial zeta e taxa de encapsulação de lipossomas.

Formulação	Tamanho (nm) ± DP	IP ± DP	Potencial Zeta (mV) ± DP	Taxa de encapsulação (%) ± DP
Lip-controle	241,9 ± 32,6	0,128 ± 0,06	-18 ± 3,01	---
PLA ₂ -Asp49-lipossomal	205,2 ± 29,5	0,218 ± 0,05	-25,4 ± 1,13	69,6 ± 2,90

Tamanho do lipossomo controle e de lipossomos que contêm A₂ (Asp49-lipossomasal) em (nm) e o potencial Zeta em (mV). As medidas foram realizadas com amostras diluídas cerca de vinte vezes, utilizando água destilada como meio de dispersão, a 25°C. Os valores foram obtidos a partir de quatro lotes diferentes.

PI = Índice de Polidispersão.

5.2 INTERAÇÃO MOLECULAR ENTRE A PLA₂-ASP49 E OS LIPÍDEOS QUE CONSTITUEM OS LIPOSSOMOS

Com o objetivo de investigar as possíveis interações entre PLA₂-Asp49 e os lipídeos presentes na composição do lipossoma foi realizado um estudo *in silico* de *docking* molecular. A acoplagem do *molecular docking* dos compostos resultou em 32, 28 e 46 *clusters* para ChEBI: 79098, ChEBI: 16,113 e PubChem: 24898720, respectivamente. A maioria dos *clusters* estão localizados no mesmo local da BthTX-II. Os top-score dos clusters, para cada composto, teve a menor FullFitness (GROSDIDIER; ZOETE e MICHIELIN, 2007) do que em outros clusters (Tabela 4). Este local de ligação é formado por resíduos na extremidade do N terminal (resíduos 1-30) e parte da α hélice (resíduos 45-52), seguida por uma curva (resíduos 68-70) (Figura 4).

Tabela 4. Resultados obtidos após análise de *Docking* molecular

Compostos Lipídicos	Nº de Clusters	Melhor FullFitness	ΔG Estimado (kcal/mol)	Ligação H
ChEBI: 79098 Fosfotidilcolina	32	- 933.00	- 10.15	Gly30
ChEBI: 16113 Colesterol	28	- 803.08	- 8.02	PLA ₂ -Asp49
Pubchem: 24898720 Fosfotidilserina	46	- 985.48	- 11.52	PLA ₂ -Asp49

Número de clusters gerados, mostra os melhores resultados de encaixe de função FullFitness e ligações das pontes de hidrogênios entre BthTX-II e os três compostos.

Figura 4. Interação molecular entre as fosfolipases e os lipídeos – análise docking

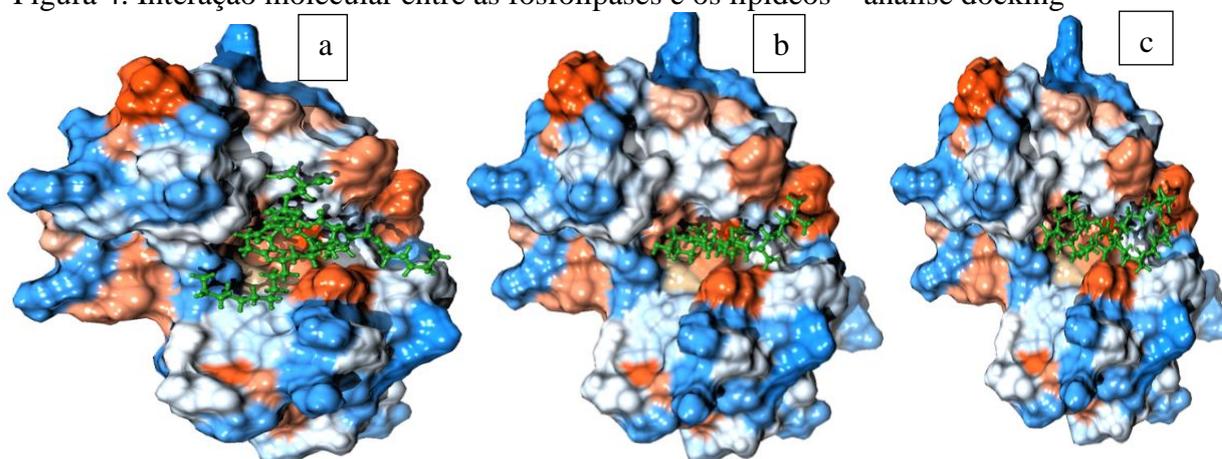


Figura 4. O sítio de ligação de BthTX-II é demonstrado pela superfície de cor laranja que é considerada mais hidrofóbica. Visão geral do melhor resultado da ancoragem de (a) Chebi: 79098, (b) Chebi: 16.113 e (c) PubChem: 24898720. Os compostos são apresentados em esferas e bastões verdes. Fosfotidilcolina (a), Colesterol (b) e Fosfotidilserina (c).

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE PLA₂-ASP49-LIPOSSOMAL EM MACRÓFAGOS J774 E ATIVIDADE ANTILEISHMANIA EM PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS*

Na tabela 5 é possível observar que na PLA₂-Asp49-solução houve um índice de seletividade de aproximadamente 0,827µg/mL; o PLA₂-Asp49-lipossomal ficou em torno de 10,65µg/mL. Na citotoxicidade nos macrófagos de linhagem J774 os dados mostram um resultado de LC₅₀ de 153µg/mL para PLA₂-Asp49-solução e viabilidade de 100% para PLA₂-Asp49-lipossomal.

A inibição contra as formas promastigotas com PLA₂-Asp49-solução resultou em IC₅₀ de 185µg/mL e para A₂ Asp49-lipossomal um IC₅₀ de 14,36µg/mL.

A porcentagem de inibição em formas promastigotas quando tratadas com PLA₂-Asp49-solução teve um resultado em torno de 82% e 40% nas concentrações de 100 e 12,5µg/mL, e para PLA₂-Asp49-lipossomal foi de aproximadamente de 78% e 60% nas mesmas concentrações.

Tabela 5: Resultado da atividade citotóxica de PLA₂-Asp49-lipossomal em macrófagos J774 e formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

	PLA ₂ -Asp49-solução	PLA ₂ -Asp49-lipossomal
Índice de Seletividade (IS)	0,827	10,65
Índice de Viabilidade J774 C.C	CC ₅₀ 153ug/mL Concentração	100%
% Formas promastigotas	IC ₅₀ de 185ug/mL Concentração	IC ₅₀ de 14,36µg/mL. Concentração
% Inibição/promastigotas	[] 100ug/mL = 82% [] 12,5ug/mL = 40%	[] 100ug/mL = 78% [] 12,5ug/mL = 60%

A citotoxicidade para macrófagos e promastigotas foi comparada utilizando o índice de seletividade (IS), que consiste na razão entre a Concentração Citotóxica 50% (CC50) para células e (IC50) = Concentração capaz de inibir em 50% o número de protozoários em cultura. Os macrófagos J774 e promastigotas de *leishmania amazonenses* foram plaqueados a 2,5x10⁵ e 5x10⁵ células/poço em placas de 96 poços. Foram adicionadas diferentes concentrações de PLA₂-Asp49-solução, PLA₂-Asp49-lipossomal e Lip-controle em cada poço. Após 48 horas, foram adicionados 10 µL de solução de MTT na concentração de 5ug/mL. Após 4 horas de incubação a 37°C com 5% de CO₂, 100µL de sobrenadante foi removido e o cristal de formazan formado foi dissolvido em DMSO. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm. Os dados representam a média dos experimentos feito em sextuplicata.

5.4 AÇÃO *IN VITRO* DE PLA₂-ASP49-SOLUÇÃO E PLA₂-ASP49-LIPOSSOMAL NA PORCENTAGEM DE INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *L. AMAZONENSIS* E A SOBREVIVÊNCIA DOS PARASITAS DENTRO DAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS APÓS TRATAMENTO COM PLA₂-ASP49 SOLUÇÃO E PLA₂-ASP49-LIPOSSOMAL.

Na figura 5 foi observado que, o índice de macrófagos infectados reduziu em 28%

quando tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal, comparado com o grupo controle sem tratamento e lip-controle. Porém, quando comparado ao grupo Glucantime este índice foi de 10%. Quando PLA₂-Asp49-lipossomal foi comparado a PLA₂-Asp49-solução este índice foi de 15%. O grupo Glucantime apresentou uma diferença de cerca de 30% em relação ao grupo de macrófagos infectados e não tratados. Nas figuras 5 (A) e (B) pode ser visualizado que o grupo tratado com PLA₂-Asp49-lipossomal apresentou uma redução significativa de 9,3 amastigotas por macrófagos após 48h de tratamento, com uma diferença de 55% em relação ao grupo controle, de 30% em relação ao grupo lipossoma controle é de 35% em relação ao grupo glucantime ($p < 0,05$).

Por outro lado, o grupo lipossomo controle apresentou uma redução significativa de 35% ($p < 0,05$) em relação ao grupo infectado. Entretanto o grupo tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal quando comparado ao grupo PLA₂-Asp49-solução apresentou uma redução de 17% ($p < 0,05$), em uma média 11 amastigotas por macrófagos. Na figura (6) representação fotomicrográficas do ensaio de infecção de macrófagos por *L. amazonensis*, e tratados com Glucantime, PLA₂-Asp49-solução, lip-controle e PLA₂-Asp49-lipossomal visualizados em microscopia de campo claro, com aumento de 1000 X. Foi observado que o grupo tratado com PLA₂-Asp49-lipossomal inibiu a quantidade de amastigotas no interior dos macrófagos e ainda preservou as células que não estavam infectadas. Os demais grupos quando comparado ao grupo controle infectados também foi observado uma redução na quantidade de macrófagos infectados.

Figura 5. Índice fagocítico de macrófagos peritoneais.

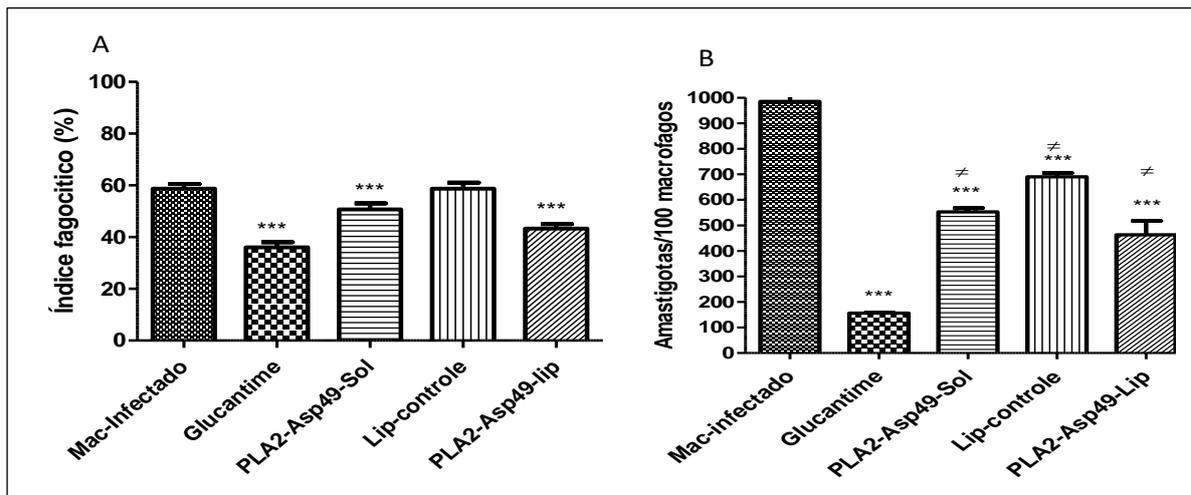


Figura 5 (A) Índice fagocítico de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C. Na (B), Análise do crescimento e da sobrevivência dos parasitas dentro das células hospedeiras após tratamento com PLA₂-Asp49-lipossomal. O controle são macrófagos infectados sem tratamento. Cada barra representa a média \pm SD de dois experimentos independentes, realizados em triplicata. Diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle infectado são indicadas pelo símbolo (***) ; quando comparado ao grupo glucantime pelo símbolo (\neq).

Figura 6. Representação fotomicrográfrica dos grupos avaliados *in vitro*.

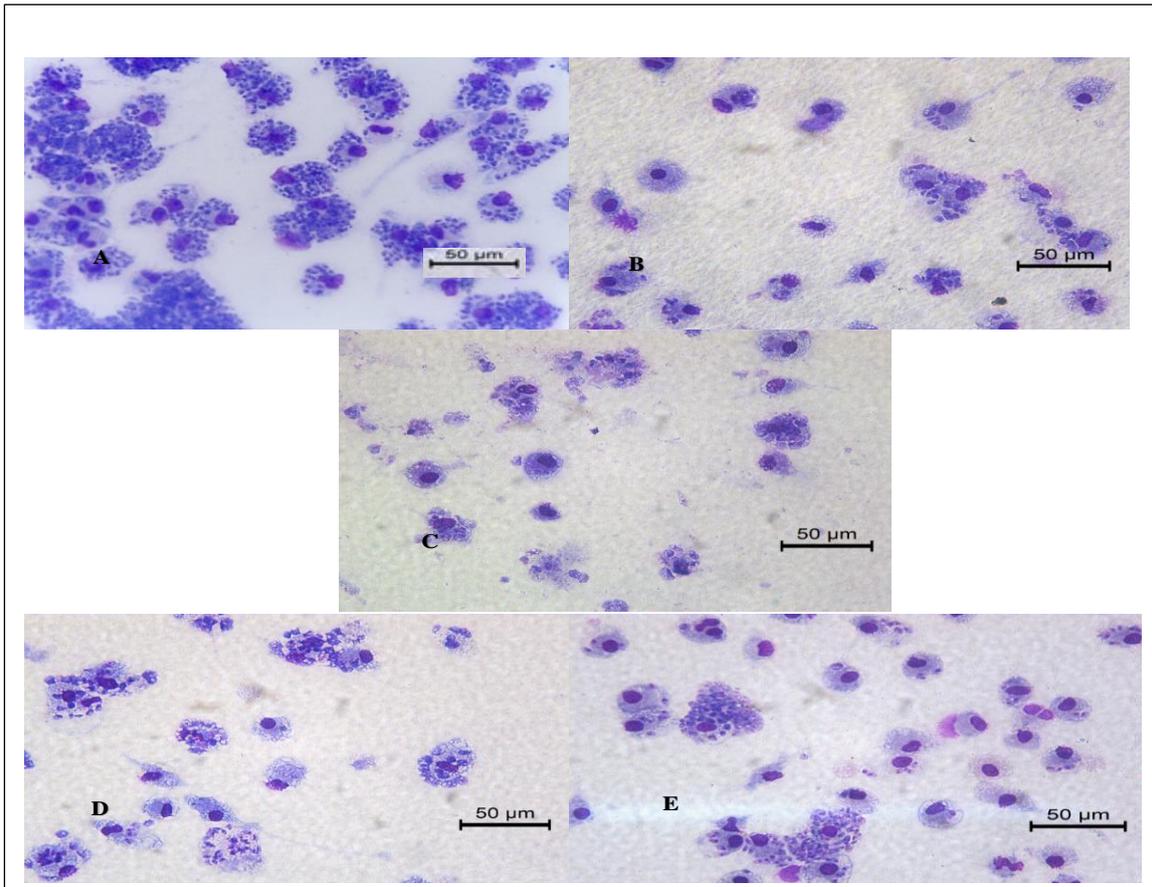


Figura 6. Representação micrográfrica dos grupos avaliados. Macrófagos infectados (A); macrófagos infectados + Glucantime (B); macrófagos infectados + PLA₂-Asp49-solução (C); macrófagos infectados + lip-control (D) e macrófagos infectados + Asp49-lipossomal. Os macrófagos peritoneais infectados foram tratados com 100 µg/mL de lip-control, PLA₂-Asp49-solução, PLA₂-Asp49-lipossomal e Glucantime (300 µg/mL). Para determinar a porcentagem de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*, as lamínulas foram coradas e 100 macrófagos foram contados entre infectados e não infectados em microscópio óptico.

5.5 PLA₂-ASP49-LIPOSSOMAL AUMENTA A PRODUÇÃO DE NO E TNF- α PELOS MACRÓFAGOS

Podemos observar, pela análise da figura 7A a produção de óxido nítrico, em 48 horas após tratamento os macrófagos do grupo controle infectado, PLA₂-Asp49-solução e lip-control liberaram cerca de 60 µM de óxido nítrico. Já no grupo infectado e tratado com PLA₂-Asp49-lipossomal a produção foi de aproximadamente 160 µM de óxido nítrico em relação a todos grupos diferença estatística ($p < 0,05$) para PLA₂-Asp49-lipossomal. Entretanto não ocorreu a produção de óxido nítrico com o grupo tratados com Glucantime®. Observa-se, no entanto, que no tratamento de referência não foi detectado o óxido nítrico.

Na figura (B) observamos a produção de TNF- α no grupo infectado e não tratado produziu, aproximadamente, 60 pg/mL dessa citocina. Já os grupos macrófago, Glucantime®,

PLA₂-Asp49-solução e lip-controle produziram somente os níveis basais. O grupo tratado com PLA₂-Asp49-lipossomal apresentou nível de TNF- α de aproximadamente 270 pg/ml desta citocina, sendo considerado estatisticamente significativa em relação ao grupo infectado e não tratados e também aos demais grupos. ($p < 0,05$) para PLA₂-Asp49-lipossomal.

Figura 7. Níveis de nitritos produzidos por macrófagos infectados e tratados com PLA₂-Asp49.

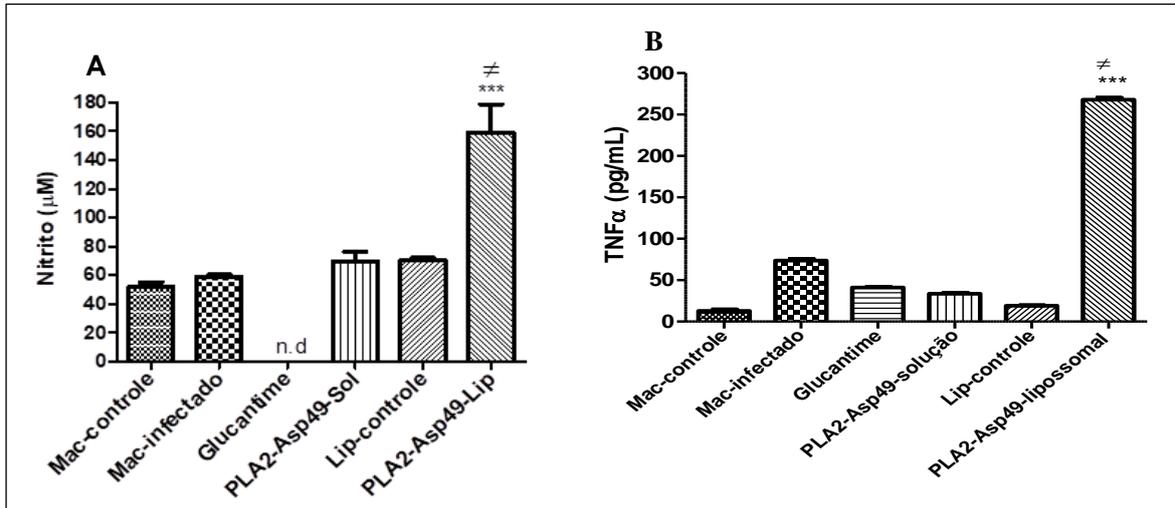


Figura 7 (A) Níveis de nitritos (μM) e (B) TNF- α (pg/mL) produzidos pelos macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal. Foram determinados nos sobrenadantes em cultura de macrófagos infectados e incubados com PLA₂-Asp49-solução, lipossomo controle e PLA₂-Asp49-lipossomal. Dados como sendo média \pm SD de dois experimentos independentes. O símbolo (***) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, grupo infectado, e em relação ao Glucantime pelo símbolo (\neq) e diferença estatística ($p < 0,05$) para PLA₂-Asp49-lipossomal.

6. DISCUSSÃO

As limitações no uso das drogas leishmanicidas atuais e o aumento da resistência do parasita a drogas convencionais, bem como a presença de proteínas de grupos diferentes em peçonhas de serpentes justificam a busca deste trabalho em estudar novos compostos bioativos antileishmania a partir de peçonha/toxinas da serpente *B. jararacussu*. Com o intuito de desenvolver novas terapias experimentais capazes de controlar o desenvolvimento do parasita da leishmaniose, bem como de estimular a resposta imune do hospedeiro, apresentando menos efeitos adversos, a PLA₂-Asp49 isolada da serpente *B. jararacussu*, denominada BthX-II, foi encapsulada em vesículas lipossomais como nova estratégia terapêutica contra a doença.

A quimioterapia antimonial convencional para leishmaniose sofre várias limitações, como a necessidade de doses de injeções diárias, surgimento de efeitos adversos/colaterais, resistência e desistência do tratamento. As propriedades farmacológicas dos lipossomos fazem destes sistemas transportadores ideais para direcionar/carrear medicamentos leishmanicidas para os sítios de infecção e aumentar sua eficácia no tratamento (FRÉZARD, et al., 2005).

O desenvolvimento de novos medicamentos é uma das atividades mais promissoras da indústria farmacêutica. Para contornar sua toxicidade, uma abordagem tecnológica é encapsular toxinas de animais potencialmente terapêuticas em nanopartículas. O encapsulamento de toxinas de serpentes em lipossomos pode melhorar sua liberação, para ser usado como terapia-alvo e para melhorar a interação ao nível celular, aumentando assim a eficiência da biomolécula com valor medicinal (BISWAS, et al., 2012). Em relação às fosfolipases encapsuladas em vesículas lipossomais, a maioria das fosfolipases PLA₂-Asp49 têm atividades catalíticas ativas, como afirmam vários autores. (PEREIRA, et al., 1998; TOYAMA, et al., 1999; CORRÊA, et al., 2008; ANDRIÃO-ESCARSO, et al., (2002).

Corrêa, et al., (2008) mostrou em seu estudo que a região do loop de ligação ao cálcio na estrutura do BthTX-II é distorcida para ambos os monômeros quando comparadas com outros tipos PLA₂-Asp49 clássicos (PLA₂-Asp49 cataliticamente ativas). Esta distorção foi associada à baixa atividade enzimática exibida pela proteína, uma vez que a literatura indica que a PLA₂-Asp49 são proteínas miotóxicas com baixa atividade catalítica (PEREIRA, et al., 1998; TOYAMA, et al., 1999; CORRÊA, et al., 2008).

Conforme relatado por Andrião-Escarso, et al., (2002) a BthTX-II é uma PLA₂-Asp49 com alta miotoxicidade, mas possui baixa atividade catalítica, não sendo capaz de fazer rupturas em lipossomas, sugerindo que seus resíduos são menos importantes para a atividade de hidrólise na estrutura de fosfolipídios. A cadeia lateral do resíduo Tyr28, presente nesta

região, está na posição oposta na PLA₂-Asp49 cataliticamente ativo. Estas modificações impedem a ligação de íons de cálcio e, portanto, podem ser responsáveis pela baixa atividade catalítica encontrada em BthTX-II (CORREIA, et al., 2008). Ainda Dos Santos, et al., (2011) diz que, quando realizaram experiências com cultura celular, usando a BthTX-II, esta se mostra desprovida de atividade catalítica, como já observado em outras variantes PLA₂-Lys49.

Os lipossomos convencionais são compostos de fosfatidilserina, fosfatidilcolina e colesterol, nos quais os lipídeos são carregados negativa ou positivamente para evitar a agregação de vesículas, aumentando assim a estabilidade da suspensão. As características físico-químicas, como o tamanho da vesícula, são importantes para a eficácia do lipossomo.

Neste estudo, vesículas lipossomais foram desenvolvidas e os seus tamanhos foram determinados pela técnica de espalhamento da luz. Os tamanhos das vesículas produzidas estão próximos de 200 nm, que é o tamanho poroso da membrana de policarbonato utilizada na técnica de extrusão. A análise das vesículas lipossomais composta apenas de lipídios, denominada de lipossomos controle, resultou em um tamanho de 241,9 nm, enquanto o PLA₂-Asp49-lipossomal resultou em um tamanho de 205,2 nm. Além disso, na análise de polidispersão (IP), os resultados mostraram um valor baixo, tanto de Lip-controle quanto de PLA₂-Asp49-lipossomal indicando que as preparações têm um alto grau de homogeneidade.

Além do diâmetro e da distribuição das partículas, o Potencial Zeta (PZ) também é um indicativo da estabilidade das partículas. Em geral, devido à repulsão eletrostática, partículas com carga se agregam menos durante a estocagem (ÜNER, et al., 2007). A determinação do Potencial Zeta é uma ferramenta usada na elucidação do mecanismo de associação de substâncias ativas às vesículas (ALONSO, et al., 1991).

A medida desta propriedade permite obter informações sobre a estabilidade do sistema e de como as propriedades superficiais são modificadas nos processos e formulações. Desta forma, foi observado que, o efeito eletrostático, que evita a agregação provocada por colisões ocasionais, foi confirmado pelas cargas negativas que vêm dos fosfolipídios, quando a PLA₂-Asp49 foi adicionada às vesículas, a carga superficial negativa foi mantida ficando entre -18 mV para o lip-controle e -25,4 mV para PLA₂-Asp49-lipossomal de acordo com o controle, indicando que a toxina não interfere com o PZ das vesículas. Valores elevados indicam formulações mais estáveis fisicamente, pois a repulsão entre as vesículas previne a agregação (GODDARD, HUANG e COUCH, 2004).

A determinação da taxa de encapsulação para dosagem de proteína foi realizada utilizando o método colorimétrico de BCA, que é um reagente cromogênico específico para íons cobre. O método BCA é mais tolerante aos detergentes iônicos e não iônicos, tais como NP-40,

Triton X-100 e agentes desnaturantes. Os resultados da caracterização físico-química comprovam que a PLA₂-Asp49 foi eficientemente encapsulada nos lipossomos (69,6%).

O *docking* molecular é um método de análise *in silico* utilizado por várias décadas devido à sua importância em prever por técnicas computacionais a força de associação ou afinidade de ligação entre as moléculas (COTRIM, et al., 2011). Novaes e Scott, 2015) adicionaram novas informações sobre este método que prevê a orientação preferencial de uma molécula a uma segunda, quando ligados entre si para formar um complexo estável. O conhecimento da orientação preferida por sua vez pode ser utilizado para prever a força de associação ou a afinidade de ligação entre duas moléculas.

Neste estudo, os lipídeos fosfatidilcolina e fosfatidilserina, utilizados para produzir a estrutura lipossomal, mostraram uma conexão positiva com o local ativo do complexo PLA₂-Asp49. O *docking* molecular demonstrou que os lipídeos interagem com o sítio ativo da enzima PLA₂-Asp49 (BthTXII), com fortes ligações entre -10,15 kcal/mol para a fosfatidilcolina, que ainda apresentou uma população de 32 *clusters* fazendo interação com a glicina na posição 30. A fosfatidilserina também manteve uma ligação forte em torno de -11,52 kcal/mol ligando-se com PLA₂-Asp49 e formando uma população de 46 *clusters*. Tanto a fosfatidilcolina quanto a fosfatidilserina apresentaram uma ligação favorável com o complexo do sítio ativo da PLA₂ quando comparados com o colesterol, que apresentou energia livre de interação de -8.02 kcal/mol e um menor número de *clusters*.

Conforme afirmado por Dos Santos, et al., (2011) a PLA₂-Asp49 não é capaz de estabelecer uma ligação com Ca²⁺, o que indica que ela tem baixa atividade catalítica. Outros autores demonstraram que sPLA₂-Asp49, não possuem atividades de fosfolipase como seria de esperar para qualquer PLA₂-Asp49, pois retém todos os resíduos considerados importantes para a atividade catalítica e fosfolipásica. Nesse contexto, os resultados aqui obtidos sugerem que, quando encapsulada em vesículas de lipossomos, esta toxina está bem acomodada dentro da estrutura do lipossoma e não interage com a membrana lipossomal, preservando a integridade desta. Além disso, PLA₂-Asp49 apresentaram baixas atividades catalíticas e de ruptura de lipossomas, corroborado por relatado de estudos de Andrião-Escarso, et al., (2002).

Nos ensaios com as formas promastigotas e macrófagos, os valores de IC₅₀ e IS foram determinados com diferentes concentrações de PLA₂-Asp49-solução, lipossomos-controle e PLA₂-Asp4-lipossomal. Essa avaliação serviu para verificar se a toxina poderia ou não afetar também as células hospedeiras, representadas pelos macrófagos da linhagem J774.

Quando o índice de seletividade foi comparado entre a toxina solução e as encapsuladas, os resultados mostraram que o PLA₂-Asp49 lipossomal apresentou maior IS em comparação com a PLA₂-Asp49-solução (10.65 µg/mL vs. 0,82µg/mL), indicando toxicidade

seletiva contra promastigotas de *L. amazonensis*, preservando a viabilidade dos macrófagos. Esta avaliação é crítica, uma vez que a eficácia de um composto contra protozoários intracelulares, como *Leishmania*, depende da sua capacidade de transpor as bicamadas lipídicas e destruir os parasitas sem afetar a célula hospedeira.

Peichoto et al., (2011), verificou que a PLA₂Trimorphin, uma PLA₂-Asp-49 isolada de *Trimorphodon biscutatus lambda*, exibe potente efeito citotóxico contra *Leishmania (L.) major*, inibindo o crescimento de 50% dos parasitos na concentração de 3,6 µg/mL. Foi relatado por Costa (2008), ao avaliar uma fosfolipase isolada da serpente *Bothrops brazili* (PLA₂-Asp49 MTX-II), que esta apresentou um efeito antileishmania de aproximadamente 90% na concentração de 100 µg/mL. Estas pesquisas corroboram o estudo e os resultados obtidos neste trabalho. Laing, et al., (2003), estudando a *jararhagin*, uma metaloproteinase isolada do veneno de *B. jararaca*, também verificou morte celular por apoptose e indução gênica de mediadores inflamatórios em células endoteliais.

Estudos realizados por vários autores corroboram os resultados aqui obtidos, sugerindo que PLA₂-Asp49-solução inibe o crescimento das formas promastigotas e ainda que a PLA₂-Asp49-lipossomal inibe as formas promastigotas e preserva a viabilidade dos macrófagos (STÁBELI, et al., 2006; SOARES, 2012; WANDERLEI, et al., 2014; NUNES, et al., 2013; BHATTACHARYA, et al., 2013).

O efeito da PLA₂-Asp49-solução e Asp49-lipossomal na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos também foi avaliado *in vitro* e *in vivo*, uma vez que este é um importante mediador nos processos de sinalização e infecção por parasitas, como na leishmaniose murina. O gás NO desempenha um papel crucial na morte de parasitas *in vitro* e *in vivo* (LIEW, WEI e PROUDFOOT, 1997). Também foi demonstrado por Liew et al., (1990) que os macrófagos possuem a enzima iNOS, que sintetiza NO, e ainda que estas células possuem a capacidade de eliminar os parasitas do gênero *Leishmania*. Neste trabalho foi demonstrado que a fosfolipase (PLA₂-Asp49) encapsulada em lipossomos é capaz de ativar a produção de NO pelos macrófagos infectados e tratados apresentando uma concentração de 160 µM, sugerindo assim a morte dos parasitos intracelularmente.

Quanto a outras moléculas antimicrobianas, TNF-α é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos e linfócitos ativados que desempenha um importante papel no controle da multiplicação de parasitas intracelulares, na fase inicial da infecção por *Leishmania*, mas que também está associada com o desenvolvimento da lesão (LIEW, et al., 1990; KÖRNER, et al., 2010). O presente estudo demonstrou que, quando os macrófagos infectados foram tratados com PLA₂-Asp49-solução e PLA₂-Asp49-lipossomal, a infecção foi reduzida, diminuindo o número de amastigotas intracelulares e que ainda os macrófagos peritoneais

produziram quantidade significativa de TNF- α (270 pg/mL). Uma vez que os macrófagos são células envolvidas na inflamação, esses resultados podem indicar um efeito pró-inflamatório através da ativação de macrófagos e conseqüentemente, a liberação de citocinas que, por meio de efeitos autócrinos e parácrinos, provocam a proliferação de macrófagos no local da infecção.

Vários estudos experimentais em seres humanos e em camundongos mostraram que a resistência à infecção por *Leishmania* está associada a uma resposta do padrão Th1 com produção de citocinas como o TNF- α , IL-12 e IFN- γ , enquanto a susceptibilidade é devido a uma resposta reguladora com produção de IL-4, IL-10 e TGF- β (CLISSA, et al., 2006; MURRAY, et al., 2002).

Ainda no contexto da produção de TNF- α e efeito antileishmania, outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa mostrou que, quando os macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *L. amazonensis* foram tratados com a toxina crotamina, encapsulada em micropartículas, observou-se que houve um aumento de 12% no índice de fagocitose e também nos níveis de TNF- α (196 pg/mL). A conclusão é a de que o encapsulamento de toxinas ou frações de veneno em partículas de polímero pode reduzir sua toxicidade, conseguindo assim efeito antileishmania mais acentuado (MACEDO, et al., 2015).

Vários estudos têm demonstrado o uso dos lipossomos como uma ferramenta terapêutica promissora. As vesículas carreadoras lipossomais têm sido importantes para o tratamento de várias doenças, incluindo a leishmaniose, devido ao fato de reterem os princípios ativos encapsulados e direcioná-los aos alvos celulares específicos, reduzindo sua toxicidade e impedindo sua degradação antecipada.

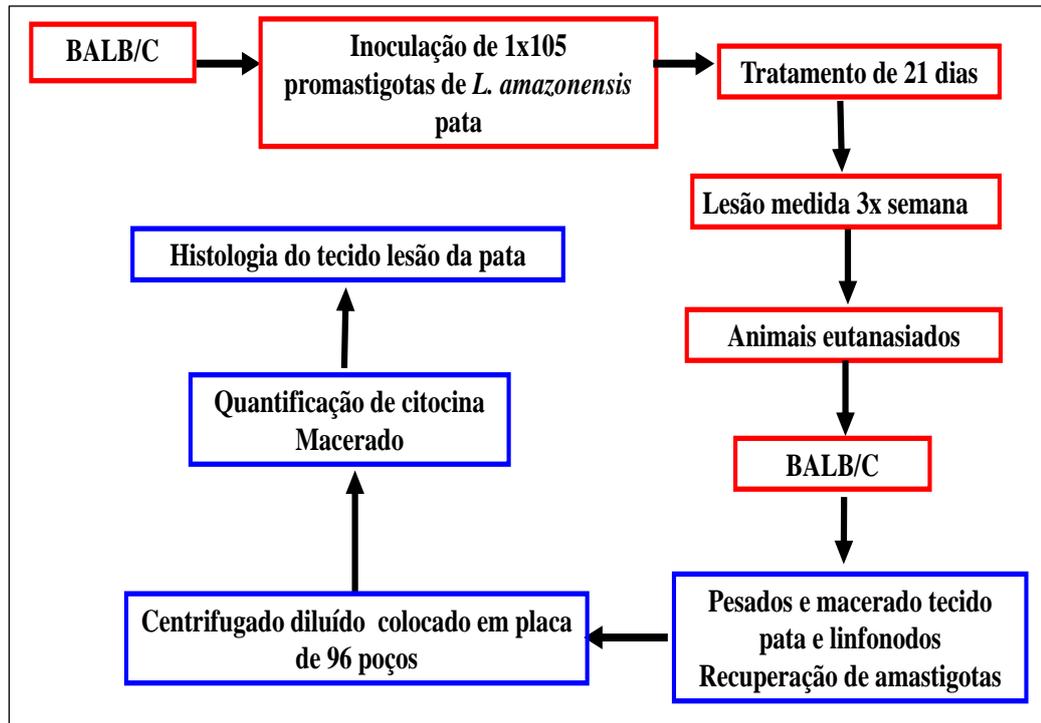
Atualmente, os fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose apresentam inúmeros efeitos colaterais, tais como toxicidades renal, hepática e cardíaca. Assim, a utilização de compostos encapsulados em lipossomos torna-se uma alternativa viável para diminuir estes efeitos, tornando o tratamento mais fácil de ser continuado pelo paciente.

Assim, o uso de compostos encapsulados em lipossomas, especialmente aqueles com efeitos biológicos distintos, como mostrado por toxinas de serpentes (por exemplo, PLA₂-Asp49) tornam-se uma alternativa viável para diminuir esses efeitos colaterais, aumentando a atividade microbicida dos macrófagos infectados com *Leishmania* e, em consequência, aumentando o potencial biotecnológico para ser empregado como um novo candidato à fármaco com ação antileishmania.

ESTUDOS *IN VIVO*

7. MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 8. Esquema do fluxograma *in vivo*.



7.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, machos, com 8-10 semanas de idade, pesando de 20-28g, obtidos do Biotério do IPEPATRO/FIOCRUZ-RO. Os animais foram mantidos em condições padronizadas de biotério. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPEPATRO-FIOCRUZ-RO, mediante aprovação do projeto de pesquisa sob nº 2013/1.

7.2 PARASITAS

Neste trabalho foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), cuja cultura original foi cedida pelo Dr. Francisco Juarez Ramalho Pinto, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

As culturas foram mantidas a partir de camundongos BALB/c, previamente inoculados com 10⁵ promastigotas de *L. amazonensis*, pela via subcutânea, na pata traseira direita. Depois de dois meses de infecção os animais foram eutanasiados e as patas contendo a lesão foram removidas e a pele necrosada retirada, em condições estéreis. Em seguida as patas

foram maceradas em meio RPMI liberando as amastigotas de *L. amazonensis*. Essa cultura foi mantida a 24°C para a transformação das amastigotas em promastigotas.

O material obtido da maceração foi centrifugado a 1000 RPM por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o *pellet*, ressuspenso em meio RPMI/SFB (RPMI suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino).

Para a propagação *in vitro* destas promastigotas, uma alíquota de parasitas, em fase estacionária de crescimento, foi diluída em eritrosina B (0,04%) e contada em câmara de Neubauer espelhada, em microscópio óptico (aumento de 400X). Os parasitas corados de vermelho foram considerados mortos e aqueles birrefringentes e móveis foram considerados vivos. O cálculo foi feito utilizando-se a fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de parasitas} = \text{n}^\circ \text{ de parasitas contados} \times \text{inverso da diluição} \times 10^4$$

Após a realização dos cálculos, 5×10^5 promastigotas/mL foram colocadas em meio RPMI/SFB. Os parasitas foram mantidos a 24°C e repicados, a cada cinco dias, por sucessivas passagens, até um máximo de 08 passagens.

7.3 MEIO DE CULTURA

O meio de cultura utilizado para a propagação *in vitro* das promastigotas de *L. amazonensis* foi o RPMI 1640 (Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco™, Invitrogen). O RPMI 1640 foi preparado, reconstituindo-se o pó em 1 L de água destilada, adicionando 20nM de HEPES (N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-22, ácido etanosulfônico; GIBCO BRL) e 50 µg/mL de gentamicina. Depois de preparado, o meio RPMI 1640 foi esterilizado por filtração em membrana de nitrocelulose de poro 0,22 µm (Millipore).

7.4 INFECÇÃO *IN VIVO* E EFEITO DO TRATAMENTO COM PLA₂-Asp49-LIPOSSOMAL

As promastigotas de *L. amazonensis* transformadas recentemente foram diluídas em PBS e injetadas intradérmica na pata traseira direita (1×10^5) de camundongos BALB/c machos entre 10 a 12 semanas, com aproximadamente 25 a 30 gramas. Após seis semanas, os animais foram divididos em 5 grupos com 6 animais cada. O grupo I (controle - infectados sem tratamento) recebeu apenas PBS intraperitoneal. O grupo II (controle positivo) foi tratado com 20µg/kg por via intraperitoneal de Glucantime®, fármaco padrão para leishmaniose. O grupo III foi tratado com 12ug/camundongos de PLA₂s (Asp-49) solução. O grupo IV foi tratado com 12ug/camundongo de Lipossomas-controle e o grupo V, com 12ug/camundongo de PLA₂s

(Asp-49) encapsuladas em lipossomas. Todos os tratamentos foram realizados em dias alternados durante 21 dias.

A progressão da lesão foi monitorada através da medida do tamanho das patas, com o auxílio de um paquímetro manual. Os animais foram avaliados três vezes por semana, por um período de 21 dias, pela comparação do tamanho da lesão da pata infectada com a pata contralateral não infectada.

7.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA LESÃO DA PATA E ÓRGÃOS DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *L. AMAZONENSIS*

Após decorrido o tempo de tratamento os animais foram eutasiados. Os tecidos da pata, linfonodos e soro foram coletados, sendo macerado parte dos tecidos da pata e linfonodo, enquanto que o sobrenadante foi coletado para quantificação de citocina e óxido nítrico e para recuperação das amastigotas. As patas foram coletadas e os linfonodos foram fixados em formol 10% por um período de 24 horas. Decorrido este período, as patas foram estocadas em formalina tamponada (10% v/v) até o processamento histológico. Os cortes foram desidratados e diafanizados em concentrações crescentes de álcoois e xilóis, corados com hematoxilina e eosina e cobertos com lamínulas e meio de montagem permanente com bálsamo do Canadá sintético para posterior análise em microscopia de luz em aumento de 400 vezes para avaliar o padrão e intensidade das alterações teciduais e infiltração celular.

7.5.1 Taxa de recuperação de amastigotas do tecido linfonodo e da lesão de pata dos camundongos infectados e tratados com PLA₂-asp49-solução e encapsuladas em lipossomos.

Os camundongos foram eutanasiados e as patas e os linfonodos removidos em condições estéreis. Em seguida partes dos tecidos das patas e linfonodos foram maceradas em meio RPMI completo liberando as amastigotas de *L. amazonensis* e outra parte foi pesada e acondicionada em formol para futura análise histológica. Ao término o macerado foi diluído 100x em meio RPMI completo e plaqueado em placa de 96 poços com um volume final de 200µl.

O macerado concentrado foi centrifugado a 1000 RPM por 10 minutos a 4°C. Parte do sobrenadante foi removido cuidadosamente e acondicionado em eppendorf a -20°C para posterior quantificação de citocinas. Após 6 dias, uma alíquota destes parasitas foi diluída em eritrosina B (0,04%) para contagem em câmara de Neubauer espelhada em microscópio óptico

(aumento de 400X). Os parasitas corados de vermelho foram considerados mortos e aqueles birrefringentes e móveis foram considerados vivos.

O cálculo foi realizado utilizando-se duas equações:

$$N^{\circ} \text{ de parasitas} = n^{\circ} \text{ de parasitas contados} \times \text{inverso da diluição} \times 10^4$$

$$N^{\circ} \text{ de parasitas} = \frac{n^{\circ} \text{ de parasitas contados}}{\text{peso tecido (mg)}} / 100$$

7.5.2 Produção de citocinas TNF- α , IL10, IL 12 e Óxido Nítrico *in vivo*.

As citocinas TNF- α , IL-10 e IL-12 foram quantificadas nos sobrenadantes de cultura dos macrófagos e no sobrenadante dos macerados do tecido da pata e dos linfonodos. Para cada citocina as dosagens foram realizadas através do teste imunoenzimático ELISA de captura. Para isso foi utilizado o kit BD OptEIA™ (BD Biosciences), de acordo com instruções do fabricante. A produção de óxido nítrico (NO) pelos camundongos infectados com parasitos, tratados ou não, a concentração de nitritos como medida indireta da produção do gás NO foi quantificado sobrenadantes do macerado dos tecidos, pata, linfonodos e soro.

O acúmulo de nitrito no sobrenadante foi medido pelo método de Griess, que consiste em adicionar 100 μ L do reagente de Griess recém preparado a igual volume dos sobrenadantes das culturas. As concentrações de nitritos nos sobrenadantes das culturas foram calculadas a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2) com concentrações variando de 100 a 0,29 μ M. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Labsystems Multiscan) em um comprimento de onda de 540 nm. Em todos os experimentos foram utilizados controles sem adição de droga e controles com e sem estímulo. Todos os testes foram realizados em duplicata.

7.5.3 Análise Estatística

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas considerando-se as Médias \pm Desvio Padrão obtidos. A análise de variância foi realizada com determinação do nível de significância para $p < 0,05$, aplicando-se teste de comparações múltiplas (One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni). Foi utilizado o software GraphPad prism 5 Demo 5.03; SPSS Inc. GPW5-614601-RAG-1147, 2013.

RESULTADOS *IN VIVO*

8. RESULTADOS

8.1 EXPERIMENTO PILOTO

Inicialmente, com o intuito de descobrir se a concentração utilizada causaria danos aos órgãos ou causaria a morte dos camundongos, foram realizados experimentos pilotos durante meses e em concentrações diferentes. Os animais foram divididos em três grupos, com seis camundongos cada grupo, tratados via intraperitoneal por 21 dias em dias alternados da seguinte forma: G1 (PBS 1x; controle), G2 (tratados com 6,25 ug de PLA₂-Asp49-solução/camundongo) e G3 (tratados com 12,5 ug de PLA₂-Asp49-solução/camundongo). Após 21 dias todos os camundongos permaneceram vivos. Comparados com o grupo controle, todos os sinais vitais, peso e pelo estavam sem nenhuma alteração. Além disso, a análise histológica realizada nos grupos G2 e G3 demonstrou que não ocorreram danos nos tecidos do fígado em nenhuma das concentrações de PLA₂-Asp49-solução utilizadas. Desta forma, prosseguiu-se ao experimento *in vivo* utilizando Pla₂-Asp49-lipossomal. Dados não mostrados

8.2 O TRATAMENTO COM PLA₂-Asp49-LIPOSOMAL DIMINUI A PROGRESSÃO DA LESÃO DA PATA DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS E TRATADOS.

A figura 9 mostra o aumento da lesão das patas dos camundongos no decorrer de 21 dias. O aumento do tamanho da lesão é uma das características da leishmaniose nos camundongos BALB/c sem tratamento. Foi observado que no 21º dia que os animais dos grupos Lip-controle e PLA₂-Asp49-lipossomal apresentaram uma diminuição do tamanho da lesão quando comparado ao grupo controle sem tratamento. O grupo PLA₂-Asp49-lipossomal apresentou uma redução de aproximadamente 18% e o grupo Lip-controle de cerca de 8%. Também pode ser observado que até o 18º dia os grupos PLA₂-Asp49-solução e Glucantime diminuíram o tamanho da lesão, porém no 21ª dia a lesão voltou a crescer, não sendo considerado um resultado significativo. Pode-se notar que no 21º dia, os animais dos grupos Lip-controle e PLA₂-Asp49-lipossomal apresentaram redução significativa do tamanho da lesão da pata quando comparado ao grupo controle sem tratamento. (p< 0,05).

Figura 9. Gráfico evolução dos grupos na infecção experimental

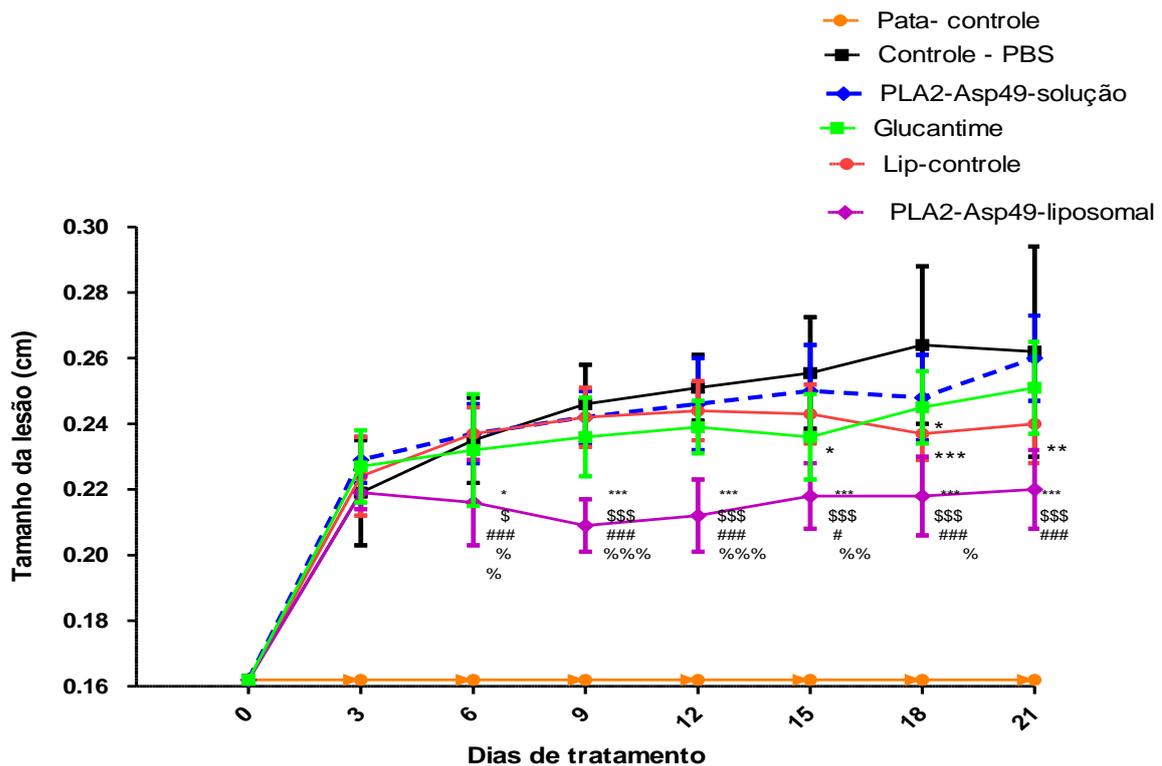


Figura 9: Análise do efeito do PLA₂-Asp49-lipossomal na infecção experimental de camundongos BALB/c com *L. amazonenses*. Camundongos BALB/c foram inoculados com promastigotas de *L. amazonenses* e após seis semanas foram tratados por via intraperitoneal, durante 21 dias com 300µl de PBS (controle), 300µl de lipossomo, 300µl de PLA₂-Asp49-lipossomal (12,5µg/camundongo), e 300µl de Glucantime (20µg/kg). O tamanho da lesão da pata foi monitorado com o auxílio de um paquímetro durante 21 dias sendo três medidas por semana. Os dados representam a média aritmética ± desvio padrão dos valores obtidos para as lesões em três experimentos sendo dois só com PLA₂-Asp49-solução como pilotos. Em cada experimento foram utilizados seis animais por grupo. O grupo controle infectado é comparado ao PLA₂-asp49-lipossomal pelo símbolo (***) . O (##) compara a diferença entre o glucantime e PLA₂-Asp49-lipossomal. O símbolo (\$\$\$) compara PLA₂-Asp49-solução com PLA₂-Asp49-lipossomal. O símbolo (%) compara o grupo PLA₂-Asp49-lipossomal comparado Lip-controle. O símbolo (***) indica a diferença estatisticamente significativa a partir do 15^a dia de tratamento entre o grupo Lip-controle e a partir do 6^o dia para PLA₂-Asp49-lipossomal diferença estatística (***). (p<0,05) indica diferenças estatísticas significativas.

8.3 O TRATAMENTO COM PLA₂-Asp49-LIPOSSOMAL REDUZIU TAXA DE TRANSFORMAÇÃO DE AMASTIGOTAS PARA PROMASTIGOTAS RECUPERADAS DOS TECIDOS LINFONODO E PATA DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS E TRATADOS.

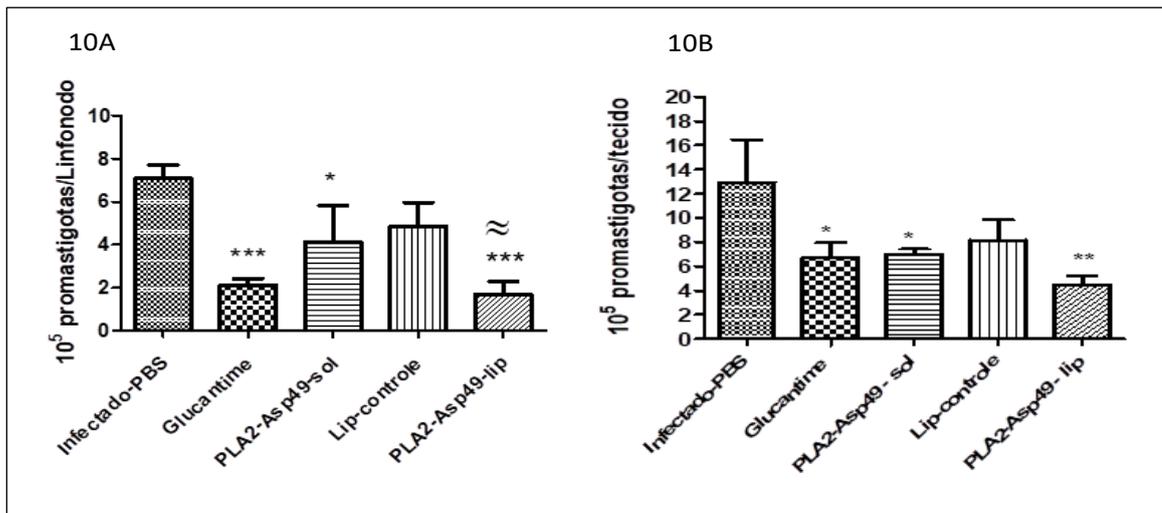
Para avaliar a eficácia dos tratamentos *in vivo* realizou-se a coleta de tecido linfonodo da pata dos camundongos suscetíveis (BALB/c) como descrito no item 7.5.1, em materiais e métodos. As figuras 10A e 10B representam o macerado dos tecidos derivados dos linfonodos, onde no sexto dia o grupo infectado e não tratado apresentou $7,8 \times 10^6$ promastigotas, o grupo Glucantime® $2,9 \times 10^2$, o grupo PLA₂-Asp49-solução aproximadamente $4,1 \times 10^4$, o grupo Lip-controle 5×10^5 e o grupo PLA₂-Asp49-lipossomal reduziu em aproximadamente

$1,6 \times 10^1$ as promastigotas ou (73.5%). Assim, verifica-se que entre os grupos tratados o grupo PLA₂-Asp49-liposomal apresentou uma diminuição estatisticamente significativa nas contagens de promastigotas comparado aos demais grupos.

Ainda na figura 10B, que representa o resultado do macerado do tecido da pata, o grupo infectado e não tratado apresentou $17,78 \times 10^{12}$ de promastigotas no sexto dia; o grupo Glucantime® e o grupo PLA₂-Asp49-solução, aproximadamente $7,15 \times 10^7$; o grupo Lip-controle, $8,17 \times 10^5$ e o grupo PLA₂-Asp49-liposomal reduziu, em aproximadamente, $4,5 \times 10^4$ as promastigotas no tecido ou (57,1%).

Embora o tratamento não tenha eliminado totalmente as promastigotas, observamos que houve uma diminuição estatisticamente significativa quando comparamos os grupos tratado PLA₂-Asp49-liposomal em relação aos grupos infectados e não tratados, Glucantime®, PLA₂-Asp49- solução e lip-controle.

Figura 10. Análise do índice de amastigotas recuperadas.



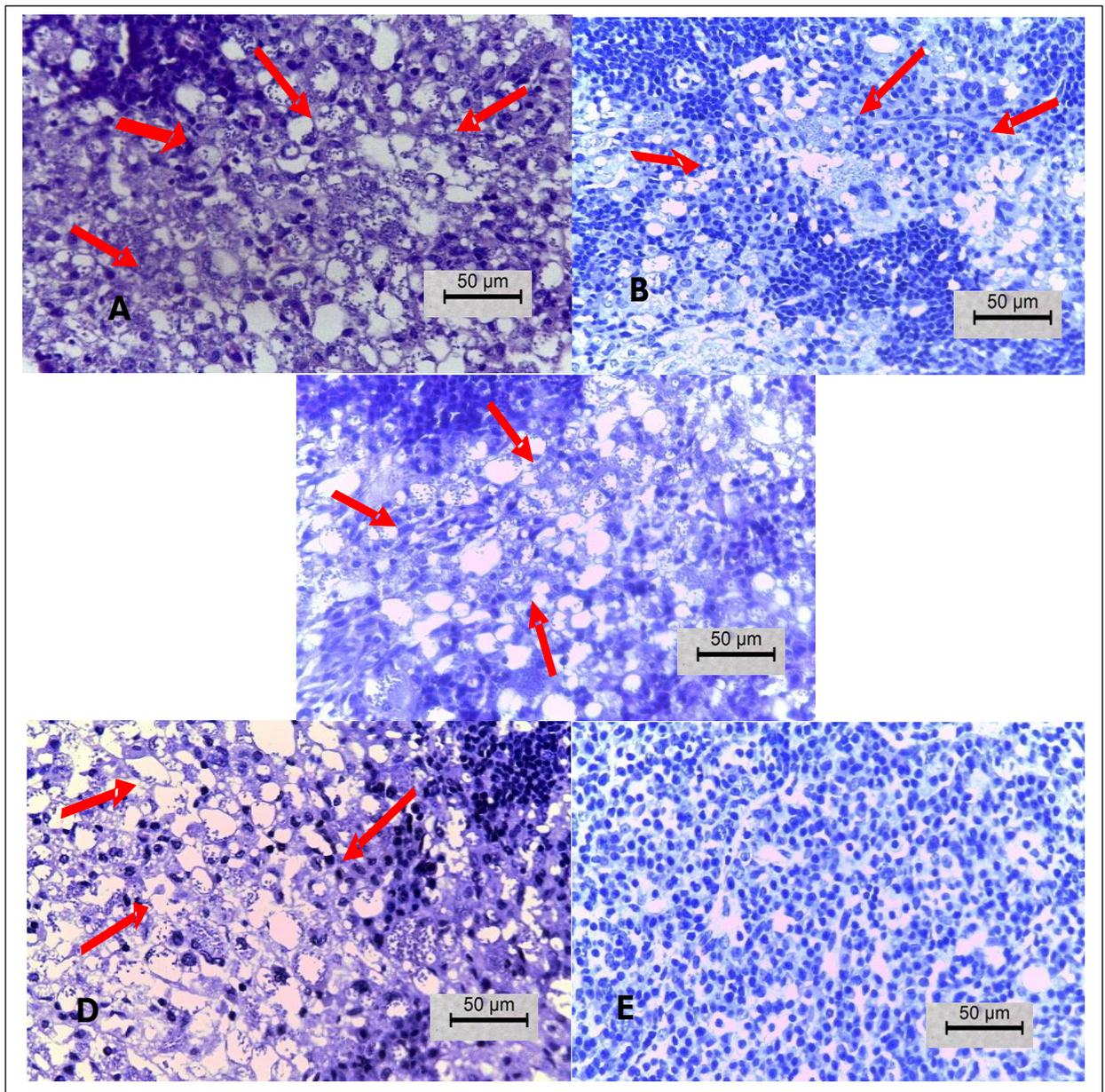
Figuras 10A e 10B: Análise do índice de amastigotas recuperadas do macerado do linfonodo dos camundongos BALB/C tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal. Macerado dos tecidos dos linfonodos infectados e tratados como descrito em materiais e métodos. Cada barra representa a média ± erro padrão de 6 N. O símbolo (***), indica a diferença estatísticas entre os grupo PLA₂-Asp49-liposomal, Glucantime e PLA₂-Asp49-solução comparado ao grupo controle infectado sem tratamento, Figura 10A e 10B. Quando PLA₂-Asp49-lipossomal comparado Glucantime pelo símbolo figura 10A (~). Em relação aos demais grupos não houve diferenças significativas estatisticamente. (p<0,05) significa a diferença estatística significativa em relação ao grupo infectado.

8.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA LESÃO DA PATA E ÓRGÃOS DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS

A análise histológica foi realizada com o intuito de observar se a PLA₂-Asp49-lipossomal seria capaz de diminuir a quantidade de amastigotas de *L. amazonensis* no tecido do linfonodo e da pata dos camundongos infectados e tratados.

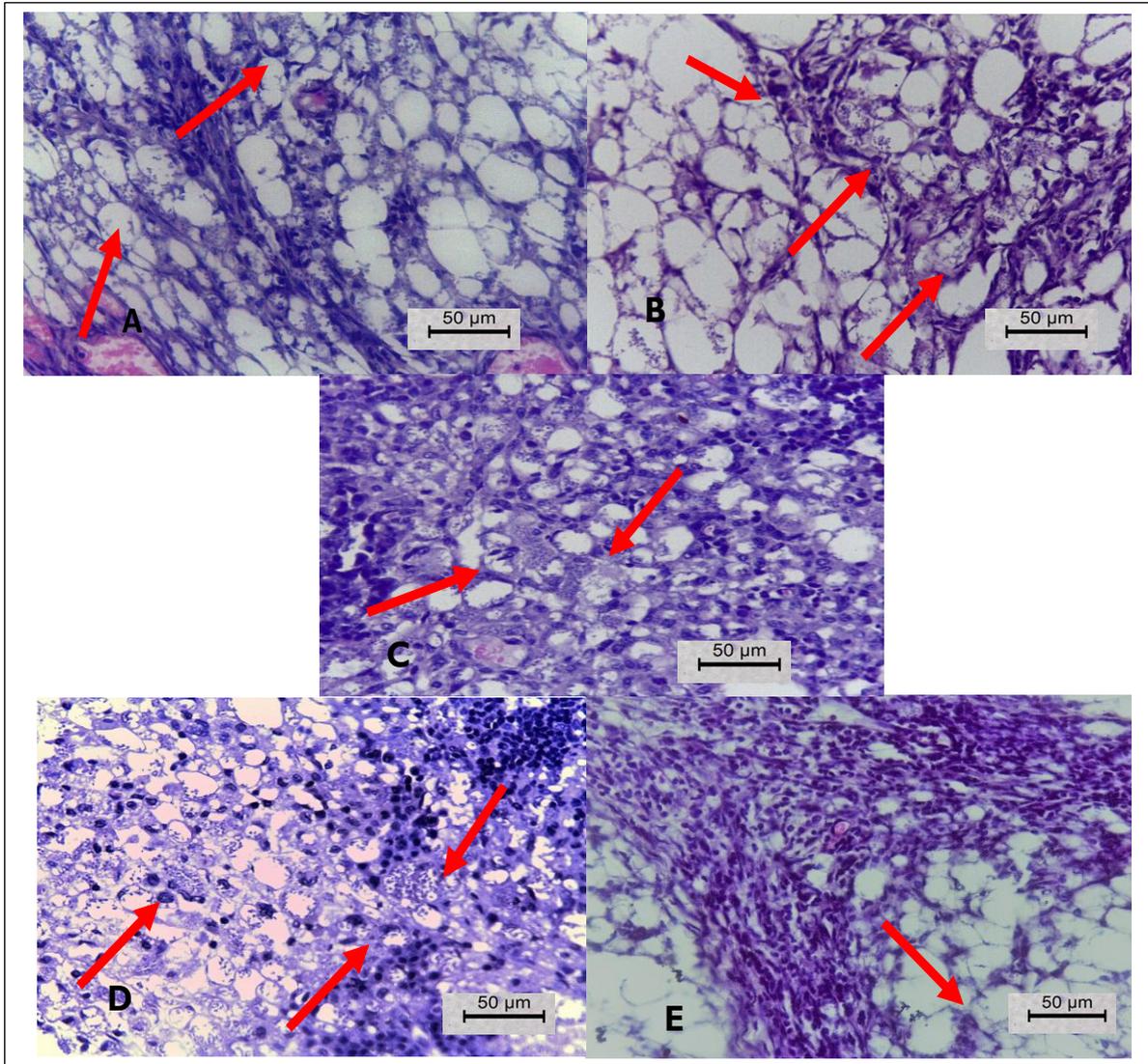
As fotomicrografias, apresentadas na página seguinte, nas formas das figuras 11A, 11B, 11C, e 11D representam a histopatologia do macerado dos linfonodos. Para uma melhor visualização inseriu setas vermelhas para destacar a presença de ninhos de amastigotas. Pode ser observado que o grupo controle infectado sem tratamento, o grupo tratado com Glucantime®, o grupo PLA₂-Asp49-solução e o grupo Lip-controle, em ambas as secções, exibem ninhos de amastigotas no tecido do linfonodo. Entretanto, no grupo infectado e tratado com PLA₂-Asp49-lipossomal (Figura 11E) não se visualiza tais ninhos de amastigotas. Esta fotomicrografia sugere, portanto, que o tratamento com a fosfolipase conseguiu inibir o desenvolvimento das formas amastigotas nas células teciduais dos linfonodos.

Da mesma forma, nas fotomicrografias 12A, 12B, 12C, e 12D, nota-se que no grupo controle infectado sem tratamento, no grupo tratado com Glucantime®, no grupo PLA₂-Asp49-solução e no grupo Lip-controle, ambas as secções exibem vários ninhos de amastigotas no tecido da pata indicados pelas setas vermelhas. Assim como na fotomicrografia anterior, no grupo infectado tratado com PLA₂-Asp49-lipossomal observou-se na Figura 12E uma diminuição significativa nos ninhos de amastigotas. Além de apresentarem um menor número de parasitas e também um número menor de macrófagos com aumento de vacuolização, quando comparados aos demais grupos. Assim como na figura 11D, o resultado sugere que a fosfolipase utilizada é capaz de inibir o desenvolvimento da forma amastigotas nas células dos tecidos da pata infectada com o parasito.

Figuras 11. Histopatologia da lesão linfonodo *in vivo* – fotomicrografia.

Figuras 11A, 11B, 11C, 11D e 11E: Micrografias histológicas dos linfonodos representada pelas figuras com indicação pelas setas vermelhas (11A) controle infectado, (11B) Glucantime, (11C) PLA₂-Asp49-solucão, (11D) lip-control, (11E) PLA₂-Asp49-liposomal.

Figuras 12. Histopatologia da lesão da pata *in vivo* – fotomicrografia.



Figuras 12A, 12B, 12C, 12D e 12E: Micrografias histológicas dos tecidos das patas, representada pelas figuras (12A) controle infectado, (12B) Glucantime, (12C) PLA₂-Asp49-solução, (12D) lip-controle, (12E) PLA₂-Asp49-lipossomal.

8.5 O GRUPO TRATADO COM PLA₂-Asp49-LIPOSSOMAL FOI CAPAZ DE ATIVAR O SISTEMA IMUNE DOS ANIMAIS PRODUZINDO CITOCINAS COMO TNF- α , IL12 E AS MOLÉCULAS REATIVAS COMO O ÓXIDO NÍTRICO

Ao analisar a liberação de citocinas pode-se observar nas figuras 13A e 13B (sobrenadantes do macerado do linfonodo e pata), no macerado do linfonodo, que houve liberação de níveis significativo, de aproximadamente 1.100 pg/mL, na produção de IL-12 nos grupos experimentais tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal e que no grupo Lip-controle a liberação foi de cerca de 300 e 400 pg/mL; quando comparados aos grupos controle somente infectado, estes liberaram somente 100pg/mL. Na figura 13B do macerado do tecido pata, no

grupo infectado e no grupo tratado com Glucantime® e PLA₂-Asp49-solução a produção foi de aproximadamente 100pg/mL; no grupo tratado com lip-controle houve uma produção dessa citocina em, aproximadamente, 300 pg/mL; ao mesmo tempo, no grupo tratado com PLA₂-Asp49-lipossomal essa produção apresentou nível aumentado significativamente de, aproximadamente, 400 pg/mL de IL12. Pode-se observar neste quesito em análise a eficácia nos resultados neste último grupo, ao ser comparado com os grupo controle-PBS, ao grupo tratado com Glucantime®, o tratamento de referência, Lip-controle, PLA₂-Asp49-solução.

A figura 14A, 14B (sobrenadante do macerado linfonodo, pata) mostra uma diferença significativa dos níveis de TNF- α nos grupos dos animais tratados com Glucantime®, PLA₂-Asp49-solução e Lip-controle, que apresentaram níveis significativos em relação ao grupo infectado sem tratamento de aproximadamente em média 25 pg/mL. Entretanto, o grupo tratado com PLA₂-Asp49-lipossomal apresentou uma produção significativa desta citocina em relação ao demais grupos e ao grupo infectado sem tratamento. Na figura 13B (sobrenadante do macerado do tecido da pata) foram observados praticamente os mesmos eventos nos mesmos grupos tratados. Entretanto o grupo tratado com PLA₂-Asp49-lipossomal foi observado uma liberação de aproximadamente 100 pg/mL de TNF- α quando aos demais grupos.

Foi observado na figura 15A, e 15B que os grupos infectados sem tratamento, Asp49-solução e lip-controle apresentaram baixos níveis de nitritos, de aproximadamente 10 μ M. Entretanto, observa-se que os grupos tratados com Glucantime apresentaram um nível de aproximadamente 20 μ M óxido nítrico, no sobrenadante linfonodo comparados aos controle-PBS, PLA₂-Asp49-solução e Lip-controle. Entretanto, pode-se observar que nos grupos tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal houve uma liberação significativa de aproximadamente 32 μ M de óxido nítrico.

Na figura 15B (sobrenadante do macerado do tecido da pata) foram observados praticamente os mesmos eventos nos mesmos grupos tratados, exceto no que continha o experimento encapsulado. Nos grupos tratados com PLA₂-Asp49-solução foi observado uma produção de aproximadamente 20 μ M de óxido nítrico quando comparado aos grupos controle-PBS, Glucantime e Lip-controle. Porém no grupo tratado com PLA₂-Asp49-lipossomal notamos um aumento significativo de óxido nítrico, nos sobrenadantes da pata, quando comparados aos demais grupos, de aproximadamente 36 μ M. Estes resultados sugerem que este tratamento pode estar ativando o sistema imune, conduzindo assim a um efeito leishmanicida nos animais. Finalmente, com relação à produção de IL 10 pelos animais tratados e infectados, não observado a produção desta citocina.

Figuras 13A e 13B. Produção de IL 12 no sobrenadante.

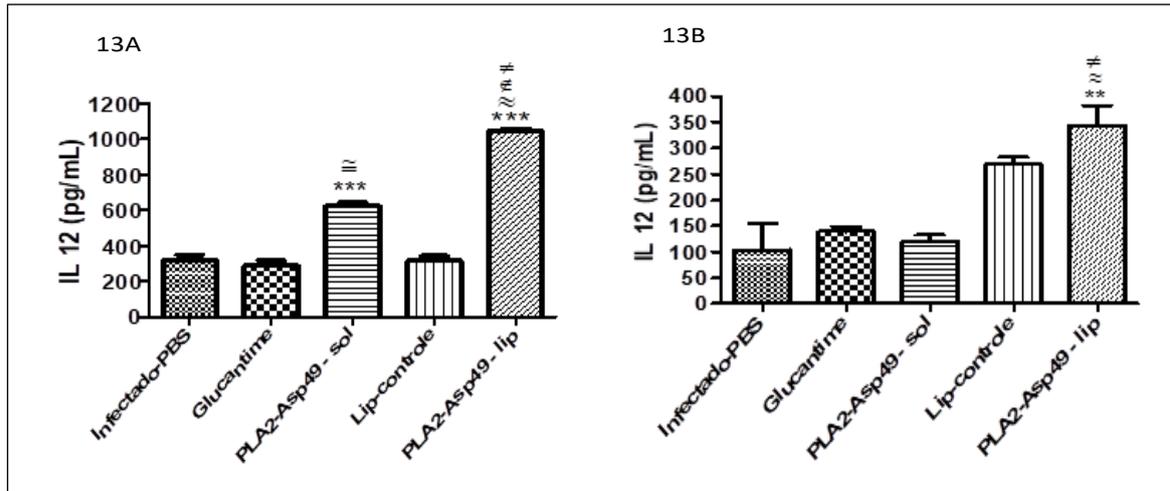
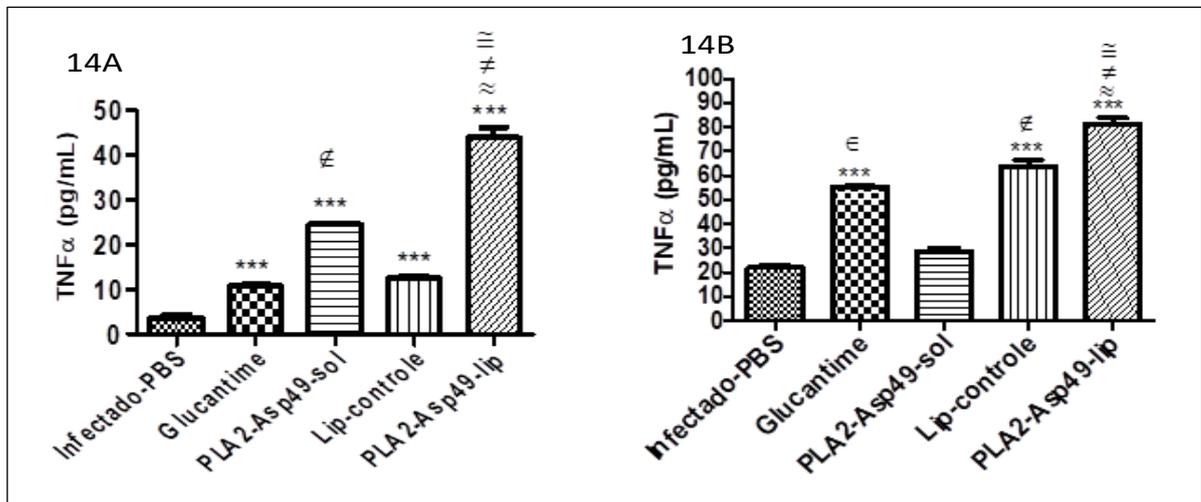


Figura 13A, 13B: Produção de IL-12 no sobrenadante do macerado tecido do linfonodo e pata, dos camundongos BALB/C infectados *Leishmania amazonensis* e tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal. Sobrenadantes do macerado dos tecidos do linfonodo, pata infectados e tratados como descrito em materiais e métodos. As concentrações das citocinas foram determinadas por ELISA de captura (BD OptEIA™). Cada ponto no gráfico representa a média ± erro padrão da produção da citocina, em pg/ml. (≠). Figura 13A (linfonodo) O grupo PLA₂-Asp49-lipossomal comparado ao grupo controle infectado (**), PLA₂-Asp49-lipossomal comparado ao Glucantime (≈) PLA₂-Asp49-lipossomal comparado ao lip-controle (≠). 13B (pata). O grupo PLA₂-Asp49-solução e PLA₂-Asp49-lipossomal comparado ao grupo controle infectado (***), PLA₂-Asp49-solução comparado ao Glucantime (≡). PLA₂-Asp49-lipossomal relação ao Glucantime (≈). PLA₂-Asp49-lipossomal comparado a PLA₂-Asp49-solução (≠), PLA₂-Asp49-lipossomal comparado ao lip-controle (p<0,05) indica diferenças significativas estatisticamente.

Figuras 14A e 14B. Avaliação da produção *in vivo* de citocinas TNF- α .

Figuras 14A e 14B: Avaliação da produção *in vivo* de citocinas TNF- α por camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis* e tratados com o PLA₂-Asp49-lipossomal. (A) linfonodo e (B) tecido pata. As concentrações das citocinas foram determinadas por ELISA de captura (BD OptEIA™). Cada ponto no gráfico representa a média da produção da citocina, em (pg/ml). O símbolo (***) indica a diferença estatisticamente em relação ao controle infectado grupo glucantime, lip-controle e PLA₂-Asp49-lipossomal para figura A e B. Figura 14A macerado tecido linfonodo quando o grupo PLA₂-Asp49-lipossomal comparado ao Lip-controle (≈), comparado PLA₂-Asp49-solução (≠), comparado ao Glucantime® (≡). O grupo PLA₂-Asp49-solução em relação Glucantime® (≠). Figura 14B macerado tecido pata comparação do grupo PLA₂-Asp49-lipossomal ao Lip-controle (≈), comparado PLA₂-Asp49-solução (≠), comparado ao Glucantime® (≡). O grupo Lip-controle em

relação Glucantime® (\neq). O grupo Glucantime® em relação a PLA₂-Asp49-solução (\in). $P < 0,005$ indica diferença estatisticamente significativa de PLA₂-Asp49-lipossomal em comparação ao grupo controle infectado.

Figuras 15A e 15B. Níveis de nitrito.

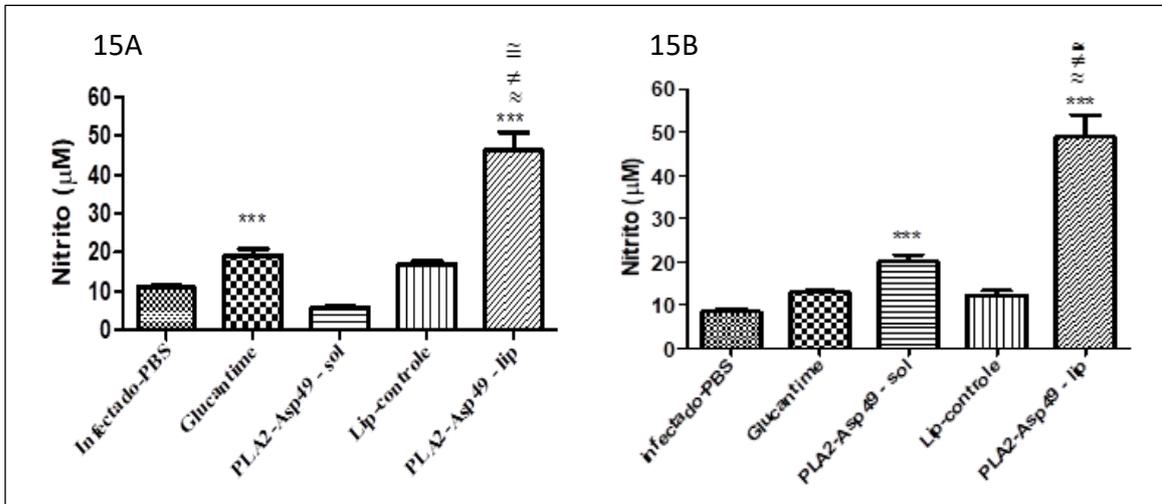


Figura 15A, 15B: Níveis de nitritos (µM) produzidos pelos macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal. Figura 15A (linfonodo) PLA₂-Asp49-lipossomal comparado ao Lip-controle (\approx). PLA₂-Asp49-lipossomal comparado a PLA₂-Asp49-solução (\neq), PLA₂-Asp49-lipossomal comparado ao Glucantime (\cong). Figura 15B (pata). PLA₂-Asp49-lipossomal comparado ao Lip-controle (\approx). PLA₂-Asp49-lipossomal comparado a PLA₂-Asp49-solução (\neq), PLA₂-Asp49-lipossomal comparado ao Glucantime (\cong). PLA₂-Asp49-lipossomal comparado a PLA₂-Asp49-solução (\neq), PLA₂-Asp49-lipossomal comparado ao Glucantime. Diferença estatística ($p < 0,05$) para PLA₂-Asp49-lipossomal.

9. DISCUSSÃO

A *Leishmania amazonensis* é um parasita intracelular obrigatório, responsável pela leishmaniose cutânea crônica. A defesa do hospedeiro vertebrado se inicia com células do sistema imune inato no início da infecção, com influxo predominante de neutrófilos ativadas. É realizada por “fagócitos profissionais” que fagocitam microrganismos, eliminando-os no seu interior (SOUZA-LEMOS, et al., 2011). A leishmaniose é uma doença parasitária em que os macrófagos e outras células do sistema reticuloendotelial (RES) servem como hospedeiro, bem como o sítio de replicação dos parasitas. Como estes parasitas vivem dentro dos macrófagos, tem-se a dificuldade dos fármacos antileishmania em atingi-los intracelularmente para promover, de forma eficaz, a eliminação do parasito. Este é o principal obstáculo encontrado para o tratamento da leishmaniose. (SINGODIA, et al., 2012; ALSAADI, 2012).

Assim, torna-se necessário a busca de uma forma de tratamento que ofereça uma melhor eficácia, otimizando o efeito do fármaco no combate ao parasito e, ao mesmo tempo, que não atinja com a mesma intensidade as demais células do organismo do paciente. A distribuição de fármacos via sistemas de entrega para macrófagos reflete uma estratégia promissora objetivando essa eficiência farmacológica. Como por exemplo, nanopartículas biocompatíveis, incluindo os lipossomos, que mudam suas propriedades em resposta ao microambiente que circundam ou a um estímulo externo (AROURI e MOURITSEN, 2013).

Quanto à busca por fármacos que tenham um melhor resultado no tratamento de doenças diversas, as peçonhas de animais possuem uma variedade de toxinas e são também uma fonte de bioativos extremamente atraentes pelo fato de apresentarem várias atividades biológicas, que estão relacionadas aos mecanismos catalíticos procedentes destas enzimas. Assim, são também utilizadas para a investigação e desenvolvimento de novos fármacos biológicos ou sintéticos. (KINI, 2003; MARCUSSI, et al., 2007). As peçonhas de serpentes possuem moléculas que compreendem cerca de 90% a 95% do seu peso seco, incluindo muitas proteínas tóxicas e não tóxicas. Nas serpentes do gênero *Bothrops* encontram-se as metaloproteinases, serinoproteases, fosfolipases, desintegrinas, miotoxinas e neurotoxinas, que são os principais componentes químicos.

De acordo com Correia, et al., (2008) e outros autores, as PLA₂s são proteínas multifuncionais capazes de participar como mediadoras de vários processos inflamatórios, podendo ser aplicadas em diversas áreas da medicina, por exemplo, na detecção de pré-eclâmpsia severa, nas ações gerais de anestésicos, no tratamento de artrites reumatóides, atuando como agentes bacteriológicos em glândulas lacrimais e outros tecidos, bloqueando a entrada do vírus dentro da célula hospedeira e destacando-se como um potencial agente

antimalárica (UHL et al., 1997; MOREIRA et al., 2002 e SOARES e GIGLIO, 2004). Dentre estes componentes são encontrados as fosfolipases, em que a A₂ (PLA₂) é a mais estudada devido as suas características estruturais e por possuir diversos efeitos farmacológicos (CUNHA, FULY e ARAUJO, 2011).

Três enzimas foram purificadas do veneno de *Botrops jararacuçu*: uma Lys49-PLA₂ (BthTX-I), com atividade miotóxica, e duas PLA₂-Asp49, sendo uma ácida (BthA-I) com alta atividade catalítica, mas não miotóxica, e outra básica (BthTX-II), que, embora seja uma PLA₂-Asp49, possui baixa atividade catalítica, mostrando-se, porém, miotóxica. (ANDRIÃO-ESCARSO, et al., 2002; CORRÊA, et al., 2008). Ainda foi demonstrado que os mesmos resíduos que são determinantes da miotoxicidade do BthTX-I também estão envolvidos na hiperalgesia e inflamação, enquanto que os resíduos responsáveis pela atividade citolítica só contribuem para o efeito nociceptivo da proteína (ZAMBELLI, et al., 2017).

Lomonte, Ângulo e Moreno (2010) dizem que apesar de existir diferenças sobre as fosfolipases A₂-asp49 e a Lys-49, no que diz a respeito das atividades enzimáticas, ambas possuem a capacidade de induzir miotoxicidade e respostas inflamatórias. Ou ainda de maneira similar induzem perturbação das membranas por mecanismos ainda não elucidados.

Há em desenvolvimento vários novos sistemas transportadores incluindo lipossomas, niosomas, microesferas, nanopartículas, nanotubos de carbono, entre outros, que estão sendo explorados para tratamentos em que são fagocitados por meio de macrófagos em ambos os sentidos, tanto passiva quanto ativamente e, portanto, podem direcionar os fármacos passivamente para o sitio alvo (ALSAADI, 2012; SINGODIA, et al., 2012; JAIN, et al., 2013). A administração orientada nos macrófagos de doxorubicina utilizando sulfato de dextrano em micropartículas de quitosana mostrou um declínio significativo no número de parasitas de *Leishmania* em hamsters sírios dourados (KUNJACHAN, et al., 2011).

A formulação lipossomal à base de fosfatidilserina de buparvaquona se mostrou também de grande potencial para a terapia dirigida para leishmaniose (REIMÃO, et al., 2012). Andresen, Jensen e Jorgensen, (2005), demonstraram que a utilização de sPLA₂ encapsuladas em lipossomos para a distribuição seletiva de fármacos anticancerígenos é uma abordagem promissora proporcionada pela sua aplicabilidade *in vivo*. Além disso, outros autores mostram que a liberação do fármaco ocorre gradualmente durante o processo de hidrólise, em que os defeitos ou aberturas da membrana tendem a se reorganizar rapidamente devido ao rearranjo difuso rápido dos componentes da membrana (DAVIDSEN, MOURITSEN e JORGENSEN, 2002, ROSHOLM et al., 2012).

Nos últimos anos, foram descritas por vários autores que as sPLA₂ possuem várias aplicações farmacológicas, incluindo uma atividade potencial contra parasitas (COSTA,

DANTAS e TOYAMA, 2010; DEREGNAUCOURT e SCHREVEL, 2000; GUILLAUME, et al., 2004, 2015; PASSERO, et al., 2008). Ainda buscando um pouco mais de referencial observamos que outros autores como Hansen, Mouritsen e Arouri (2015), demonstraram que a utilização de lipossomas susceptíveis a sPLA₂ é uma ferramenta de abordagem promissora pela sua aplicabilidade que sugere proporcionar uma distribuição seletiva de fármacos para tratamento anticancerígenos *in vivo*. Já outros autores descreveram a capacidade da PLA₂ derivado da peçonha de serpente em inibir bactérias, fungos e parasitas, como a *Leishmania* spp, *Giardia duodenalis*, *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum* (ADADE, et al., 2010; GUILLAUME, et al. 2004, SANTA MARIA, et al., 2005, SHINOHARA, et al., 2006).

Os macrófagos são fagócitos naturalmente agressivos, onde sistemas carreadores como nanopartículas, lipossomas, entre outros, são por eles fagocitados por endocitose. Portanto, os macrófagos podem ser usados como alvo de fármacos, sendo possível direcionar o carreador para o sítio da infecção com o objetivo de aumentar a eficácia do fármaco. Houve uma extensa busca da pesquisa na década passada para desenvolver ferramentas para entregar ativamente os fármacos à célula-alvo em concentrações suficientemente elevadas (PARK, 2014). Um exemplo são as nanopartículas biorresponsivas, incluindo lipossomas, que alteram suas propriedades em resposta ao microambiente circundante ou a um estímulo externo (AROURI, MOURITSEN, 2013).

Dentro deste contexto, neste estudo, o sistema de liberação PLA₂-Asp49-lipossomal foi desenvolvido como uma terapia antileishmania, uma vez que este micro-organismo sobrevive dentro deste sistema fagocitário. Portanto, sugere-se que o lipossomo seja uma ferramenta essencial, porque uma vez na circulação ou microambiente tecidual, será fagocitado pelos macrófagos e degradado dentro do vacúolo parasitóforo, ou seja, no sítio da infecção.

O desenvolvimento do PLA₂-Asp49-lipossomal foi realizado com o intuito de avaliar se a fosfolipase A₂ (Asp-49) também possui atividade antileishmania *in vivo* quando encapsuladas em lipossomos, uma vez que esta já demonstrou uma taxa de inibição bastante significativa *in vitro* (55% em relação ao grupo controle).

No presente estudo podemos observar que quando os camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis* foram tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal, os macrófagos conseguiram controlar melhor o crescimento das amastigotas. Isto porque houve o processo de internalização macrofágica da substância, cuja ação direta promoveu uma significativa redução na evolução das lesões, que estabilizaram e regrediram a partir do sexto dia de tratamento, enquanto que nos demais grupos, tanto o controle quanto o Glucantime®, a lesão continuou se desenvolvendo. Mesmo o Glucantime® sendo o tratamento de primeira escolha, sozinho não mostrou eficácia em inibir o crescimento das patas.

Pode-se notar no 21º dia que os animais dos grupos Lip-controle e PLA₂-Asp49-lipossomal apresentaram uma diminuição do tamanho da lesão quando comparados ao grupo controle sem tratamento. Na figura 9 pode ser constatado uma redução de aproximadamente 18% do tamanho da lesão da pata do grupo tratado com PLA₂-Asp49-lipossomal, quando comparado com o grupo controle, e ao ser comparado com o grupo Lip-controle esta diferença foi de aproximadamente 10%. Também foi observado que no grupo Glucantime® e no grupo PLA₂-Asp49-solução houve a diminuição do tamanho da lesão até o 15º dia. Porém, a partir daí não foi mantida essa tendência, com a consequente inversão e a volta do aumento do tamanho da lesão.

No modelo murino da doença por *Leishmania amazonensis* a redução da espessura da pata infectada muitas vezes está relacionada com a diminuição da carga parasitária no local da infecção. Estes resultados sugerem que os tratamentos com PLA₂-Asp49-lipossomal foram capazes em inibir o crescimento de formas amastigotas de *L. amazonensis* quando comparados com os outros grupos tratados, reforçando o fato de que a fosfolipase-A₂ (Asp49) encapsulada em lipossomos afeta diretamente o crescimento intracelular de *L. amazonensis*. Ainda foi observado nos grupos tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal, que esta não possui toxicidade para os camundongos, comparada aos fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.

Os ensaios experimentais realizados neste estudo mostram que a carga parasitária diminui ficando em torno de $1,6 \times 10^1$ promastigotas, conforme demonstrado na figura 10, resultante do macerado do tecido do linfonodo, bem como nas fotomicrografias da figura 11E, onde verifica-se que nos grupos tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal não foi possível visualizar células contendo ninhos de amastigotas. Ainda, foram analisados o macerado do tecido da pata, onde se observa a inibição em aproximadamente $4,5 \times 10^4$, diferentemente do que foi observado na curva de diferenciação do grupo controle sem tratamento, onde o número de promastigotas foi muito maior, ficando em torno de $17,78 \times 10^{12}$.

Corroborando com estes resultados, as fotomicrografias do controle mostram vários ninhos de amastigotas com muitos macrófagos vacuolizados, porém, quando analisado o grupo tratado com PLA₂-Asp49-lipossomal, observou-se claramente uma redução do número de amastigotas intracelulares, bem como a visualização de membrana dos macrófagos, vacuolização e núcleo definido, no tratamento com a dose de $1,47 \mu\text{g/mL}$. Este resultado sugere que a PLA₂-Asp49-lipossomal foi capaz de diminuir a carga parasitária dos macrófagos, diminuindo ainda a o processo inflamatório. Moraes e Silveira, (1994) afirma que foram realizados estudos com mais de 30 casos da forma leishmaniose cutânea causada por *L. (L.) amazonensis* na Amazônia, no qual o principal achado foi a presença de grande quantidade de macrófagos vacuolizados, ricamente parasitados, junto ao infiltrado celular linfoplasmocitário.

Segundo Silveira et al., (2008), em uma revisão bibliográfica da histopatologia da infecção causada por *L. amazonensis*, a principal característica observada é de que há grande predomínio de macrófagos vacuolizados, ricamente parasitados.

Corroborando o resultado antileishmania deste trabalho, Barbosa, et al., (2005), afirma que a miotoxina II do veneno de *B. jararacussu* apresentou alta atividade bactericida, causando ruptura na parede celular e membrana bacteriana de *Xanthomonas axonopodis*. Ainda Toyama, et al., (2006), demonstraram que as miotoxinas tem ação significativa em cepas de *Leishmania sp.* Além disso, Costa Filho, et al., (2008), relataram que duas PLA₂ miotóxicas do veneno de *Bothrops brazili* (MTXI, cataliticamente ativo, e MTX-II, cataliticamente inativas) exibiram atividade parasiticida efetiva contra espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis* e *L. braziliensis*). Ciscotto, et al., (2009) publicou estudos em que demonstra que os experimentos realizados *in vivo* com venenos de serpente do gênero *Bothrops* mostraram ser mais potentes como anti-*Stafilococcus*, tendo uma ação bactericida notável contra *stafilococcus aureus* na concentração de 12.5mg/mL. Notavelmente, os venenos de *B. jararacussu* e *B. jararaca* demonstraram a maior atividade.

Zuliani, et al., (2005), Wei, et al., (2013), Taketomi, et al., (2013) sugerem que as sPLA₂ de serpentes podem contribuir também para a regulação das respostas inflamatórias de acordo com a capacidade que estas peçonhas possuem de aumentar a atividade fagocíticas e microbicidas de macrófagos e ainda em induzir produção de células dendríticas e também dos mastócitos induzindo o recrutamento e desgranulação de mastócitos.

Pereira, et al., (2011) demonstrou que a crotamina isolada de *Crotalus durissus terrificus* apresenta eficácia contra células de melanoma em camundongos com 5µg/ml, sendo letal para células de linhagem B16-F10, Mia PaCa-2 e SK-Mel-28, após 21 dias de tratamento, porém, inofensiva contra células normais. Apresentando ainda seletividade para células tumorais e sendo bem tolerada sistemicamente.

Rosas, et al., (2013), em ensaios experimentais, confirmou que a peçonha da *B. jararaca* apresentou a IC₅₀ de 103.9 a 241.9 µg/mL em promastigotas e 137.6 a 234.1 µg/mL em tripomastigotas. Nas amastigotas de *L. chagasi* e *T. cruzi* as IC₅₀ foram de 55.6 a 90.9 µg/mL e 209.2 a 496.8 µg/mL, respectivamente. Ainda, a peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, *O. scutellatus*, *Naja nigricolis* e *Naja mossambica* vêm demonstrando que a sua PLA₂ possui potente ação contra o vírus HIV-1 (MATA et al., 2017). Bhattacharya, et al., (2013) em experimento realizados com veneno de *Bungarus caeruleus*, quando em corte histológico sugeriu que ocorreu diminuição na contagem de amastigotas em 54,9% e 74,2% no baço e 41,4% e 60,4% no fígado de camundongos BALB/c infectados.

As principais funções desta célula na defesa do organismo são limitar a disseminação inicial ou crescimento de agentes infecciosos e modular as reações imunológicas subsequentes, tendo função tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa (STAFFORD, NEUMANN e BELOSEVIC, 2002). Os macrófagos desempenham um papel crucial na infecção por leishmania e um tratamento bem-sucedido de todas as formas de leishmaniose depende da eliminação eficiente dos parasitas por macrófagos ativados.

Sabe-se que a derme do hospedeiro possui células macrofágicas as quais, além da proteção contra os micro-organismos, também são células hospedeiras de *Leishmania spp.* Estas células fagocíticas participam no sistema de defesa imunológico através do reconhecimento e eliminação de agentes patogênicos e também de células auto senescentes. A resposta imunitária à *Leishmania* é iniciada no local de entrada do parasito, através das células sentinelas, onde as formas promastigotas são interiorizadas, promovendo a ativação da resposta imunitária (FREITAS e PINHEIRO, 2010).

Freitas e Pinheiro (2010) adicionaram mais informações sobre a infecção causada por *Leishmania spp.*, a resposta imunitária é modulada por um sistema integrado que potencializa a imunidade inata e adquirida. TRINCHIERI (2003; 2007) descreve em seus estudos que trabalhos experimentais em humanos e especialmente em camundongos demonstraram que a resistência à infecção por *Leishmania* está associada a uma resposta Th1 com a produção de citocinas (TRINCHIERI, et al., 2003; TRINCHIERI, 2007).

Coelho-Castelo et al., (2009), afirmam que para que haja o estabelecimento de uma infecção, em um hospedeiro suscetível, é necessário o envolvimento de vários mecanismos, sendo um dos mais relevantes o modo de interação do micro-organismo com o sistema imune e a resposta desse contra o agente invasor. Esta interação do sistema imune com os agentes infecciosos ocorre de uma maneira dinâmica, com mecanismos de controle da infecção e de escape sofisticados. Estes eventos fazem com que o sistema imune do hospedeiro reaja produzindo citocinas, e a IL-12 pode ser uma destas citocinas.

A IL-12 é uma citocina heterodimérica secretada por macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos (APCs). Ela é essencial para o desenvolvimento de células Th1, que por sua vez produzem IFN- γ e, assim, ativam os macrófagos. Durante o seu estabelecimento no hospedeiro, o parasita contraria o desenvolvimento da resposta imune do tipo Th1, através da modulação da produção de citocinas pelo macrófago: suprime a expansão da sub-população Th1 por inibição da produção de IL-12 e estimula os macrófagos a produzirem TGF- β e IL-10, as quais, por sua vez, inibem as funções efetoras dos macrófagos e das células NK (BOGDAN e RÖLLINGHOFF, 1999).

Conforme experimentos realizados por Tuon et al., (2008) *in vivo*, a IL-12 é uma citocina muito importante na resposta imune contra *Leishmania*. Esta citocina desenvolve um padrão Th1 e pode ser ativada por TLR9. Muitos outros fatores podem influenciar o desenvolvimento de uma ou de outra sub-população após a infecção, nomeadamente o tipo de células apresentadoras de antígenos (APCs) (KONECNY, STAGG e JEBBARI, 1999), a natureza dos antígenos reconhecidos (SKEIKY, et al., 1998) e diferenças nas interações entre as moléculas do MHC II e receptor das células T (TCR) (KAYE, VASQUEZ e HEDRICK, 1992).

Quando ativado, o sistema imune do hospedeiro é quem vai determinar a resistência ao desenvolvimento da leishmaniose, esta resposta inicia-se com a produção da citocina IL 12 por células macrofágicas no local. Esta citocina atua sobre células natural killer (NK), que passam a produzir IFN- γ . O IFN- γ , juntamente com IL-12, induzem a diferenciação de células CD4⁺ Th0 para o fenótipo Th1 (KEMP, 1997).

Nesse contexto, os dados obtidos neste trabalho mostraram que a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 pelo grupo tratado com PLA₂-Asp49-lipossomal foi estatisticamente significativa, quando comparados com os demais grupos, após 21 dias de tratamento. Como consequência do evento, pode ter ocorrido um favorecimento do desenvolvimento de uma resposta TH1, por estar inibindo a produção de IL-10 e induzindo a produção de IL-12, esta favorável ao sistema imune do hospedeiro para debelar a doença. Foi observado na figura 12 que nos animais tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal houve uma produção significativa de IL-12, de aproximadamente 1.100 pg/mL no sobrenadante do macerado do tecido do linfonodo. Os mesmos eventos foram observados nos sobrenadantes do macerado da pata, com uma quantidade de aproximadamente 400 pg/mL (figura 13B). A IL-12 é o principal mediador da resposta imune natural inicial a micro-organismos intracelulares e também o indutor essencial, para a ativação das células natural killer (NK) para uma resposta imune mediada por células. A resposta imune adquirida, contribui, desta forma, para uma rápida ativação dos mecanismos do sistema imune do hospedeiro vertebrado (TUON, et al., 2008).

Alguns autores afirmam que nos animais tratados experimentalmente com fofolipases A₂ nos locais onde são injetadas, acontece mionecrose e inflamação caracterizada por edema intenso. Ainda que esta inflamação é decorrente em parte de ação de estímulos das fosfolipases em células que reside nos tecidos, como as células fagocíticas macrofágicas, as células endoteliais e os mastócitos estimulados, que liberam uma cascata de mediadores que induzem o processo inflamatórios. (WEY, et al., 2013; LOMONTE, ÂNGULO, MORENO,

2010; GUTIERREZ, et al., 1984, 2009). Esses processos inflamatórios induzem ativação dos macrófagos e estes, ativados, produzem a citocina TNF- α .

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória e está relacionada a eventos que ocorrem na defesa do hospedeiro contra numerosos patógenos intracelulares por meio da estimulação de diferentes células efetoras que participam de vários mecanismos antimicrobianos (BEUTLER e CERAMI, 1997). Conforme descrito em Brito (2012) o TNF- α age sobre o crescimento, diferenciação e apoptose de células imunes e não imunes; age nas respostas agudas às infecções e no restabelecimento da homeostase (KASSIOTIS e KOLLIAS, 2001). Quando o TNF- α é produzido e liberado, este vai ligar a receptores específicos denominados de receptores de TNF (p 55 e p 75 TNFR) que são encontrados em diferentes células para produzir seu efeito biológico (MCDONNELL; ABBOTT e MOHLER, 2001).

O TNF- α é produzido por monócitos e macrófagos ativados quando ocorre uma resposta a produtos de membrana que se ligam a receptores *toll-like*, sendo também produzido por células natural killer (NK). O Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina usualmente presente na resposta imunológica mediada por células, assim descrita na literatura com base em estudos realizados em camundongos. Sendo também uma das diversas citocinas usualmente encontradas em manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar (THOMAS, 2001).

Esta citocina também participa do dano tecidual em inflamações crônicas, doenças infecciosas e autoimunes. O perfil de citocinas produzido durante a infecção por *Leishmania* é determinante para a suscetibilidade ou resistência do animal (AFONSO e SCOTT, 1993). Este estudo sugere que o tratamento com PLA₂-Asp49-lipossomal foi capaz de produzir uma resistência protetora nos grupos dos animais que receberam este tratamento, já que além de produzir citocinas do perfil TH1, ainda manteve o tamanho da lesão próximo ao da primeira medida avaliada.

Com o objetivo de avaliar a influência do tratamento com PLA₂-Asp49-lipossomal em ativar o sistema imune dos animais infectados para produzir citocinas como o TNF- α , quantificou-se esta citocina nos sobrenadantes do macerado dos tecidos das patas e dos linfonodos. Podemos observar nas figuras (14A e 14B) que ocorreu uma significativa produção de aproximadamente 50pg/mL desta citocina no sobrenadante do macerado da pata, e de aproximadamente 80 pg/mL no macerado do sobrenadante do linfonodo. Bhattacharya, et al., (2013) em seus estudos observou que o tratamento com veneno da serpente *Bungarus caeruleus* em animais infectados com *leishmania donovani* aumentou significativamente a produção de TNF- α , e ainda que em estudos histológicos mostraram diminuição da formação de granulomas no fígado tratado, quando comparado com o controle. TNF- α tem um papel fundamental na

patogênese, pois células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes com LM secretam altos níveis de TNF- α em relação aos indivíduos com Leishmaniose cutânea (OLIVEIRA e BAFICA, 2011).

A literatura descreve que experimentos com *L. amazonensis* demonstraram que macrófagos infectados com essa espécie de *Leishmania* fagocitam neutrófilos humanos em apoptose, causando um aumento na carga parasitária, dependentes de TGF- β e PGE2. Mas, quando macrófagos infectados fagocitam neutrófilos em estado de necrose é favorecida a morte de *L. amazonensis*, um processo dependente de TNF- α e elástase produzido pelos neutrófilos o qual está associado à produção de peróxido (AFONSO, et al., 2008).

Gawronska-Kozak, et al., (2006), em estudo realizado com camundongos nocaute mostrou que a participação dos mecanismos do sistema imune vai além da proteção dos tecidos com lesão contra possíveis infecções, reforçando sua participação na manutenção e reparo pela secreção de citocinas e fatores de crescimento (PARK e BARBUL, 2004).

Além das citocinas, outra molécula importante na resposta à infecção por parasito de leishmania é o óxido nítrico (NO). Devido a estes fatores, a resposta imune do hospedeiro é fundamental para resolver a infecção. A ativação do macrófago, através da resposta imune CD4 Th1, resulta na produção do óxido nítrico (NO), que juntamente com o stress oxidativo representa importante mecanismo de eliminação do parasito (PANARO, et al., 2001).

Portanto, a eliminação das amastigotas da *leishmania*, quando encontradas dentro das células fagocíticas, parece ser mediada por uma cascata de mecanismos dependente da via metabólica importante que é a explosão respiratória (burst) no fagolisossomo dos macrófagos ativadas (ZAMUNER, et al., 2001). Esse evento é caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio e consequente geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o ânion superóxido (O₂⁻) (CURNUTTE, 2004).

Alguns autores afirmam que BthTX I e II (PLA₂s) induzem a migração leucocitária *in vivo*, sendo que BthTX II (PLA A₂) parece mais potente nesse aspecto (DE CASTRO et al., 2000; PEREIRA et al., 2009). Quando ocorre uma inflamação no local desta, os neutrófilos são ativados e realizam fagocitose. Esta atividade desencadeia uma série de eventos, que induzem a sinalização para os macrófagos a expressarem genes pró-inflamatórios, como o óxido nítrico sintetase (iNOS) (HENDRA, et al., 2011).

A produção de NO no sobrenadante do macerado de tecido do linfonodo e pata (Figura 15A, 15B) nos camundongos infectados com *L. amazonensis* mostrou-se significativamente maior nos grupos tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal, de aproximadamente, 36 (μ M). Conclui-se que um complexo de padrão de síntese e secreção de citocinas e óxido nítrico ocorreu quando estes animais receberam o tratamento. Este evento

sugere que este tratamento é capaz induzir a produção de espécies reativas de oxigênio em resposta à infecção. Todos os demais tratamentos também produziram valores de níveis basais de óxido nítrico, porém não foram considerados significativos quando comparado com o tratamento PLA₂-Asp49-lipossomal, sugerindo uma modulação da resposta celular para a produção acentuada de NO (Figura 14A e 14B). Petricevich, et al., (2000) em ensaio experimental observou que a peçonha *B. asper* and *B. jararaca* induziu a produção de óxido nítrico em uma concentração de 150(μM). Bhattacharya, et al., (2013) em experimento realizados com peçonha de *Bungarus caeruleus* sugeriu que o tratamento aumentou a produção de NO em camundongos infectados.

Além disso, sugere-se que alguns mediadores, como o TNF-α, a IL-1 e o óxido nítrico possam desempenhar um papel relevante na fisiopatologia das alterações sistêmicas induzidas por estas peçonhas (PETRICEVICH, et al., 2000). Gonçalves et al., (2002) sugere que a peçonha de *bothrops jararaca* cause uma alteração na mitocôndria do parasito e com isto altera a cadeia respiratória e, conseqüentemente, diminui os níveis de moléculas de ATP. Com isto, leva a falta de energia para a célula e por meio deste evento a morte do parasito. Giudice et al., (2007), sugerem que a resistência da *leishmania* ao óxido nítrico confere o benefício de sobrevivência dos parasitas dentro do macrófago e, possivelmente, exacerba o curso clínico da leishmaniose humana.

O óxido nítrico é uma das ferramentas microbicidas dos macrófagos de camundongos susceptível a doenças, e o tratamento com PLA₂ de *crotalus durissus terrificus* foi capaz de estimular estes reativos (SAMPAIO; LUCAS e COSTA FILHO, 2007). Portanto, algumas espécies de *Leishmania* como *Leishmania amazonensis* e *chagasi* são capazes de inibir a produção de óxido nítrico (LUZ, et al., 2012). Neste contexto, durante a infecção por *Leishmania*, são produzidas citocinas como IL-12, TNF-α e outros mediadores produzidos pela resposta Th1 protetora que são importantes para prevenir o crescimento e a sobrevivência dos parasitas intracelulares (formas amastigotas) e controlar a sua disseminação para outros tecidos e órgãos. O sucesso da infecção em macrófagos depende da capacidade do parasita de aderir e serem fagocitados por estas células, escapando dos mecanismos microbicidas (ALEXANDER e RUSSELL, 1992).

Sharma, et al., e Jaafari, (2006) afirmam que antígenos sozinhos são geralmente pouco imunogênicos e necessitam de um adjuvante para induzir uma imunidade protetora. Porém, uma proteína deve não somente ser protegida da degradação extracelular, mas precisa também ser apresentada para células alvos relevantes do sistema imune. Lipossomos são úteis como adjuvantes imunológicos para vários antígenos de *leishmania* sendo usados como uma

estratégia para aumentar o efeito da vacina e liberar especificamente o antígeno no órgão alvo (KANEDA, 2000; SINGH e O'HAGAN, 2003).

Estes dados da literatura corroboram com os resultados obtidos neste estudo, pois os camundongos infectados e sem tratamento não produziram as citocinas e as moléculas reativas protetoras do sistema imune. Ainda, houve o aumento do tamanho da lesão e quando foi realizado a recuperação de amastigotas nos tecidos do linfonodo e pata, observou-se que estes possuíam uma maior quantidade de parasitos, dados que também são mostrados nas microfotografias histológicas. Por outro lado, o grupo tratado com PLA₂-Asp49-lipossomal foi capaz de ativar a resposta imune celular dos animais tratados, produzindo citocinas como TNF- α , IL12 e as moléculas reativas como o óxido nítrico.

Além disso, foi capaz de diminuir o tamanho da lesão da pata e induziu uma inibição acentuada na quantidade de amastigotas nos tecidos do linfonodo e pata. Finalmente, foi observado que quando as amastigotas foram colocadas em cultura, ocorreu menor número de transformação em promastigotas, quando comparado ao grupo controle sem tratamento. Estes resultados sugerem que o PLA₂-Asp49-lipossomal pode ser uma eficiente abordagem terapêutica antileishmania. Os resultados obtidos neste trabalho pode, ainda, ser de utilidade para a continuidade de novas pesquisas em formulações lipossomais com as PLA₂-Asp49, bem como proporcionará uma base para prever o perfil de liberação dos lipossomas *in vivo* no local da inflamação. Entretanto, o efeito do PLA₂-asp49-lipossomal sobre a ativação do sistema imune ainda não havia sido determinada. Para que possam ser considerados ideais para o uso terapêutico, os lipossomas devem apresentar algumas características: proteger o fármaco dos processos metabólicos, proteger os tecidos adjacentes e aumentar a captação do fármaco pelas células alvo, ampliando sua eficácia (FUSAI et al., 1995).

Neste contexto, após todo processo de pesquisa e de análise, os resultados deste estudo sugere que PLA₂-asp49, encapsuladas em lipossomas, podem ser úteis como adjuvantes imunológicos. Ao longo da pesquisa foi observado que, nos grupos de animais tratados com PLA₂-asp49-lipossomal, houve a produção de citocinas do tipo TH1, resultados estes que trazem eficácia ao tratamento da leishmaniose.

O controle de algumas infecções por *Leishmania* está associado ao desenvolvimento da resposta imune adaptativa a antígenos específicos, com produção de INF- γ pelos linfócitos T e a subsequente ativação de macrófagos com produção de óxido nítrico BOGDAN & RÖLLINGHOFF, (1998).

9. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste estudo *stricto sensu*, pode-se concluir que:

- ✓ A PLA₂-Asp49 foi eficientemente encapsulada nos lipossomas com a obtenção do índice de 69,6% de encapsulamento;
- ✓ O *docking* molecular demonstrou que os lipídeos presentes nos lipossomas interagem fortemente com o sítio ativo da enzima PLA₂-Asp49, conferindo estabilidade para a estrutura;
- ✓ A PLA₂-Asp49-lipossomal demonstrou ao longo dos estudos ser um eficiente inibidor das formas promastigotas, ao mesmo tempo em que manteve preservada a viabilidade dos macrófagos *in vitro*.
- ✓ PLA₂-Asp49-solução e PLA₂-Asp49-lipossomal são capazes de inibir o crescimento das formas amastigotas intracelulares;
- ✓ PLA₂-Asp49-lipossomal aumenta a produção de NO e TNF- α pelos macrófagos infectados, resultando na redução dos parasitos ali presentes;
- ✓ O tratamento com PLA₂-Asp49-lipossomal diminui a progressão da lesão da pata dos camundongos infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e tratados.
- ✓ Os grupos tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal apresentaram uma redução significativa na quantidade das amastigotas de *Leishmania amazonensis* quando a taxa da carga parasitaria foi determinada tanto no macerado do tecido do linfonodo quanto no tecido da pata dos camundongos (Balb/c) após infecção e tratamento.
- ✓ A análise histopatológica da lesão da pata e órgãos dos camundongos infectados com *L. amazonensis* demonstra que os grupos tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal reduziram estatisticamente a quantidade de amastigotas presentes no interior dos macrófagos.
- ✓ Nos animais tratados com PLA₂-Asp49-lipossomal houve a ativação da resposta imune celular, resultando na produção de citocinas como TNF- α , IL-12 e moléculas reativas como o óxido nítrico.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADADE, C.M.; CONS, B. L.; MELO, P. A.; SOUTO-PADRON, T. Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology** 138, 46–58, 2010.

AFONSO, L. C.; BORGES, V. M.; CRUZ, H.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; DOS REIS, G. A.; DUTRA, A. N.; CLARÊNCIO, J.; DE OLIVEIRA, C. I.; BARRAL A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKY, C. I. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **J Leukoc Biol.** Aug;84(2):389-96. 2008.

AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 7, p. 2952-9. 1993.

ALEXANDER J.; RUSSEL D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **J. Adv. Parasito.** 31, 175-254, 1992.

ALONSO, M. J.; LOSA, C.; CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; Approaches to improve the association of amikacin sulphate to poly (alkylcyanoarylate) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics.** v. 68, p. 69 – 76, 1991.

ALSAADI, M. The efficacy of aerosol treatment with non-ionic surfactant vesicles containing AmB in rodent models of leishmaniasis and pulmonary aspergillosis infection. **J. Control. Release** 160, 685–691, 2012.

ANDRESEN, T. L.; JENSEN, S. S.; JORGENSEN, K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. **Prog. Lipid Res.**, Oxford, v. 44, p.68-97, 2005.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H; SOARES, A. M; FONTES, M. R. M; FULY, A. L; CORRÊA, F. M. A.; ROSA, J. C; GREENE, L. J; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom, **Biochem. Pharmacol.** 64, 723–732, 2002.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ÂNGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, R. J. Myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, 82: 755–763. 2000.

ANTONELLI, L. R.; DUTRA, W. O.; ALMEIDA, R. P.; BACELLAR, O.; GOLLOB, K. J. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clin. Exp. Immunol**, 136: 341-348, 2004.

AROURI, A.; HANSEN, A. H.; RASMUSSEN, T. E.; MOURITSEN, O. G. Lipases, liposomes and lipid-prodrugs. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 18, 419–431, 2013.

AROURI, A.; MOURITSEN, O. G. Membrane-perturbing effect of fatty acids and lysolipids. **Prog. Lipid Res.** 52, 130–140, 2013.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to Leshmania infection. **Indian J. Med. Res.**, 1-19, 2004.

BAGINSK, M. Molecular modeling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. **Acta. Biochin, Pol.**, v. 52, n. 3, p. 655-658, 2005.

BARRAL, A.; COSTA, J. *Leishmanias* e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas, **Cadernos Coloniais**, 25: 8-235, 2011.

BARROS, N. B.; MIGLIACCIO, V.; FACUNDO, V.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R.G.; NICOLETE, R.; SILVA-JARDIM, I. Liposomal-lupane system as alternative chemotherapy against cutaneous leishmaniasis: Macrophage as target cell. **Experimental Parasitology**, 135, 337–343. 2013.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotas by phlebotomine sand flies **International Journal for Parasitology**, 37 1097–1106, 2007.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da Arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Vol. 43, n. 2, 2007.

BELKAID, Y.; HOFFMANN, K. F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M. C.; WYNN, T. A.; SACKS, D. L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J. Exp. Med.**, 194:1497-1506. 2001.

BERNARDE, P. S. **Acidentes ofídicos**. Laboratório de Herpetologia - Centro Multidisciplinar - Campus Floresta Universidade Federal do Acre – UFAC. Disponível em: <www.herpetofauna.com.br/ofidismobernarde.pdf>. Acesso em 31 ago 2016.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin: more than a tumour necrosis factor. **N. Engl. J. Med.** 316, 379. 1997.

BHATTACHARYA, S.; GHOSH, P.; GOMES, A.; DUNGUNG, S. R. In vivo and In vitro antileishmanial activity of Bungarus caeruleus snake venom through alteration of immunomodulatory activity, **Experimental Parasitology** p 126-133. 2013.

BHOWMICK, S.; RAVINDRAN R.; ALI, N. gp63 in Stable Cationic Liposomes Confers Sustained Vaccine Immunity to Susceptible BALB/c Mice Infected with *Leishmania Donovanii* **American Society for Microbiology**, 2009.

BISWAS, A.; GOMES, A.; SENGUPTA, J.; DATTA, P.; SINGHA, S.; DASGUPTA, A. K. R.; GOMES, A. Nanoparticle-conjugated animal venom-toxins and their possible therapeutic potential. **Journal of Venom Research**, 3, 15–21. 2012.

BORBOREMA, S. E. T.; SCHWENDENER, A. R.; ANDRADE, H. F. J. R.; OSSO, J. A. Jr.; ANDRADE, H. F. Jr.; NASCIMENTO, N. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in *Leishmania (Leishmania) major*-infected macrophages. **International Journal of Antimicrobial agents**, 38: 341– 347. 2011

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação**: Rondônia. Brasília: Ministério da Saúde, 5 ed, p. 16, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/Ministério da Saúde**. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRELAZ, M. C. A.; OLIVEIRA, A. F.; ALMEIDA, M. A.; SOUZA, A. C. R. MEDEIROS, M. E. F; BRITO, V. R. A. Leishmania (Viannia) braziliensis antigenic fractions: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasite Immunology**, 34, 236–239, 2012

BRITO, M. G. O. Imunoterapia na Leishmaniose Cutânea. Dissertação. Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia 2012; 86. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/12964/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o_ICS_Maria%20das%20Gra%C3%A7as%20de%20Oliveira%20Brito.pdf> Acesso em: 05 set 2016.

BURKE, J. E., DENNIS, E. A. Phospholipase A2 biochemistry. **Cardiovasc Drugs Ther.** 2009 Feb;23(1):49-59. 2009.

CALDERON, L. A.; SILVA-JARDIM, I.; ZULIANI, J. P.; SILVA, A. A.; CIANCAGLINI, P.; PEREIRA DA SILVA L. H.; STÁBELI R. G. Amazonian biodiversity: a view of drug development for Leishmaniasis and Malaria. **J Braz Chem Soc.**, 20: 1011-1023, 2009.

CALDERON, L. A.; SOBRINHO, J. C.; ZAQUEO, K. D.; MOURA, A.; GRABNER, N. A.; MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; NOMIZO, A.; FERNANDES, C. F.; ZULIANI, J. P.; CARVALHO, B. M.; DA SILVA, S. L.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. **BioMed Research International**, 19. 2014.

CARRERA L.; GAZZINELLI, R. T.; BADOLATO, R.; HIENY, S.; MULLER, W; KUHN, R.; SACKS, D. L. Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **J. Exp. Med.**, 183: 515-526. 1996.

CARVALHO, E. M.; JOHNSON, W. D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P. D.; COSTA, J. L.; REED, S.; ROCHA, H. Cell-mediated immunity in American Cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Journal of Immunology**, 135:4144-4148, 1985.

CASTELLANO, L. R. C. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão. **VITA E**, v. 12, n. 25, 2005.

CHIKH G.; SCHUTZE-REDELMEIER, M. P. Liposomal delivery of CTL epitopes to dendritic cells. **Biosci Rep.**, 22:339–353, 2002.

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

CLISSA, P. B.; LOPES-FERREIRA, M.; DELLA-CASA, M. S.; FARSKY, S. H. P.; MOURA-DASILVA, A. M. Importance of jararhagin desintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. **Toxicon**, 47: 591-596. 2006.

COELHO-CASTELO, A. M.; TROMBONE, A. P. F.; ROCHA C. D.; LORENZI, J. C. C. **Immune response to infectious diseases**. Departamento de Bioquímica e Imunologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 42(2): 127-42. 2009.

COLMENARES, M. A. L.; CORBI, A. L.; TURCO, S. J. L.; RIVAS L. The Dendritic Cell Receptor DC-SIGN Discriminates among Species and Life Cycle Forms of *Leishmania*. **The Journal of Immunology**, 172: 1186–1190. 2004.

CORRÊA, L. C.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; CINTRA, A. C. O.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Crystal structure of a myotoxic Asp-49-phospholipase A2 with low catalytic activity: Insights into Ca²⁺ - independent catalytic mechanism. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1784, p. 591-599, 2008.

COSTA FILHO; VELOSO, A.; CAMPOS, Í.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** vol.41, n.4. 2017-06-10, pp.424-427. 2008.

COSTA, T. R.; DANTAS, T. R.; TOYAMA, M. 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.

COTRIM, C. A.; OLIVEIRA, S. C. B.; DIZ FILHO, E. B. S.; FONSECA, F. V.; BALDISSERA, L. JR.; ANTUNES, E.; XIMENES, R. M.; SERRA-AZUL, M. H.; RABELLO, M. M.; ZALDINI, M.; TOYAMA, D. O.; TOYAMA, M. H. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. **Chemico-Biological Interactions**, 2011; **189**: 9–16.

CROFT, S.; COOMBS, G. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol** 19: 502-508. 2003.

CUNHA, K. C. S.; FULY, A. L.; ARAUJO, E. G. A phospholipase A(2) isolated from *Lachesis muta* snake venom increases the survival of retinal ganglion cells *in vitro*. **Toxicon** 57- 580–585. 2011.

CURNUTTE, J. T. Superoxide production by phagocytic leukocytes: the scientific legacy of Bernard Babior. **The Journal of Clinical Investigation**. 8, 1054-1057, 2004.

DAVIDSEN, J.; MOURITSEN, O. G.; JORGENSEN, K. Synergistic permeability enhancing effect of lysophospholipids and fatty acids on lipid membranes, **Biochim. Biophys. Actas Biomembranes** 1564, 256-262. 2002.

DE CASTRO, R. C.; LANDUCCI, E. C.; TOYAMA, M. H.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; et al. Leukocyte recruitment induced by type II phospholipases A2 into the rat pleural cavity. **Toxicon**, v. 38, p. 1773-1785, 2000.

DE MOURA, A. A.; KAYANO, A. M.; OLIVEIRA, G. A.; SETÚBAL S. S.; RIBEIRO, J. G.; BARROS, N. B.; NICOLETE, R.; MOURA, L. A.; FULY, A. L.; NOMIZO, A.; DA SILVA, S. L.; FERNANDES, C. F.; ZULIANI, J. P.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; CALDERON, L. A. Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops mattogrossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and tumor cells. **BioMed Research International**, 19, 5356-13. 2014,

DNDI – Drugs for Neglected Diseases Initiative. Disponível em: <<http://www.dndi.org.br/>>. Acesso em: 23 dez 2014.

DENNIS, E. A. Diversity of groups types, regulation and function of phospholipases A2, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 13057–13060. [2] Dennis E.A., Phospholipases A2: basic and clinical aspects in inflammatory diseases. **Karger Edn.**, 1997, pp. 1–10.

DE PAULA, R. C.; CASTRO, H. C.; RODRIGUES, C. R.; MELO, P. A.; FULY, A. L. Structural and pharmacological features of phospholipases A2 from snake venoms. **Protein Pept Lett.** 2009;16(8):899-907.

DEREGNAUCOURT, C.; SCHREVEL, J. Bee venom phospholipase A2 induces stage-specific growth arrest of the intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* via modifications of human serum components. **J Biol Chem** 275:39973–39980, 2000.

DOS SANTOS, J. I.; CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; BORGES, R. J.; FERNANDES, C. A. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A2 class. **Proteins**, 79: 61–78. 2011.

DUNAISKI, M. **Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na região do Vale do Ribeira – Paraná: cães reservatórios ou hospedeiros acidentais?** Pag. 4-7, 2006.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, London, v. 68, n. 5, p. 1432-1441. 2006.

FERREIRA, M. G. P. R.; KAYANO, A. M.; SILVA-JARDIM, I.; SILVA, T. O.; ZULIANI, J. P.; FACUNDO, V. A.; CALDERON, L. A.; ALMEIDA-E-SILVA, A.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R. G. Antileishmanial activity of 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propanoic acid purified from Amazonian *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) fruit. **Rev Bras Farmacogn**, 20: 1003-1006, 2010.

FIGUEREDO, F. G.; TINTINO, S. R.; VIEIRA DE BRITO, D. I.; BRAGA, M.F. B. M.; LEITE, N. F.; LUCENA, B. F. F.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; GOMEZ, M. C. V.; COUTINHO, H. D. M. Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 35(1):149-154. 2014.

FRANK, M.M. The reticuloendothelial system and bloodstream clearance. **J. Lab. Clin. Med.**, 122:487-8. 1993.

FREITAS, J. C. C.; PINHEIRO, D. C. S. N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 109, p. 11-20, 2010.

FRÉZARD, F.; CHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quím. Nova**, vol. 28 Nº 3. 2005.

FUSAI, T.; DURAND, R.; BOULARD, Y.; PAUL, M.; BORIES, C.; RIVOLLET, D.; HOUIN, R.; DENIAU, M. Importance des médicaments vectorisés dans le traitement de la leishmaniose viscérale. **Med. Trop.**, v. 55, p. 73-79, 1995.

GALVÃO-CASTRO, B.; SÁ FERREIRA J. A.; MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human American visceral leishmaniasis. **Cli. Exp. Immunol.**; 56:58. 1984.

GAWRONSKA-KOZAK, B.; BOGACKI, M.; RIM, J. S.; MONROE, W. T.; MANUEL, J. A. (2006). "Scarless skin repair in immunodeficient mice." *Wound Repair Regen* 14(3): 265-76.

GIAIMIS, J.; LOMBARD, Y.; MAKAYA-KUMBA, M.; FONTENEAU, P.; POINDRON, P. a new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. **journal of immunological methods**, 154: 185-193. 1992.

GIUDICE, G.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P.; PEREIRA, J.; RILEY, L.; WILSON, M.; HO, J. L.; DE JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, 7:7. 2007.

GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comput. Chem.**, 25: 1605-12. 2004.

GONÇALVES, A. R.; SOARES, M. J.; SOUZA, W.; 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**, 88: 598-602. 2002.

GORAK, P. M.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **Eur. J. Immunol**, 28, 687-695. 1998.

GRIMALDI, G. Jr.; MC-MAHON-PRATT. Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: an overview. **Prog. Clin. Parasitol**, 2:73–118, 1991

GROSDIDIER, A.; ZOETE V.; MICHIELIN, O. EA Dock: docking of small molecules into protein active sites with a multiobjective evolutionary optimization. **Proteins**, 2007; **67**: 1010–1025.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN.; O. Fast docking using the CHARMM force field with EA Dock DSS. **J. Comput. Chem**, 32: 2149– 2159. 2011

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Res.**, 39: W270–W277. 2011

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. Swiss-model and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, 18: 2714–2723. 1997.

GUILLAUME, C.; PAYRE, C.; JEMEL, I.; JEAMMET, L.; BEZZINE, S.; NAIKA, G. S.; BOLLINGER, J.; GRELLIER, P.; GELB, M. H.; SCHRÉVEL, J.; LAMBEAU, G.; DEREGNAUCOURT, C. 2015. *In vitro* anti-*Plasmodium falciparum* properties of the full set of human secreted phospholipases A2. **Infect Immun** 83:2453–2465. 2015.

GUILLAUME, C.; DEREGNAUCOURT, C.; CLAVEY, V.; SCHREVEL, J. Anti-*Plasmodium* properties of group IA, IB, IIA and III secreted fosfolipases A2 are serum-dependent. **Toxicon** 43:311–318, 2004.

GUTIÉRREZ, J. M. B.; LAMONTE; KINI, R. M. **Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. Wiley, Chichester, 1997, pp. 321–352.

GUTIERREZ J. M.; LOMONTE, B.; LEON, G.; ALAPE-GIRÓN, A.; FLORES-DIAZ, M.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; CALVETE, J.J.; Snake venomics and antivenomics: proteomic tools in the and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. **J. proteomics**, v. 72, n 2, p. 165-182, 2009.

GUTIERREZ J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Isolation of a myotoxin from *bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, v. 22, n. 1, p. 115-28, 1984.

HAMZA, T.; JOHN, B.; BARNETT, BINGYUN L. I. Interleukin 12 a Key Immunoregulatory Cytokine in Infection Applications. **Int. J. Mol. Sci.**, 11(3): 789–806. 2010.

HANSEN, H.; ANDERS, H.; OLE, G. M.; AHMAD, A. Enzymatic action of phospholipase A2 on liposomal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics** 491 (2015) 49–57. 2015.

HENDRA, R.; AHMAD, S.; SUKARI, A.; SHUKIR, M. Y.; OSKOUEIN, E. Flavonoid analyses and antimicrobial activity of varius parts of *Phaleria macrocarpa*. Boerl Fruit. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 3422-3431, 2011.

HIMMELRICH, H.; LAUNOIS, P.; MAILLARD, I.; BIEDERMANN, T.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOCKSLEY, R. M.; RÖCKEN, M.; LOUIS, J. A. In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. **J. Immunol**, 164: 4819-4825, 2000.

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

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUESSIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothrospoxin. **Toxicon**, v. 26, p. 615-627, 1988.

HOWARD, J. G.; HALE, C.; CHAN-LIEW W. L. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. Immunogenetic aspects of a susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. **Parasite Immunol**, 2: 303-314, 1980.

JAIN, N. K. MISHRA, V.; MEHRA N.K. Targeted drug delivery to macrophages. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10, 353–367 38 Jain, K. et al. A review of glycosylated carriers for drug delivery. **Biomaterials** 33, 4166–4186, 2013.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J. Immunol.** 166: 1141-1147, 2001.

KASSIOTIS G.; KOLLIAS, G. Uncoupling the pro inflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. **J Exp Med**, 19;193(4):427-34. 2001.

KAYE, J.; VASQUEZ, N. J.; HEDRICK, S. M. Involvement of the same region of the T-cell antigen receptor in thymic selection and foreign peptide recognition. **J. Immunol.** 148:3342–3353. 1992.

KEMP, M. Regulator and effector functions of T-cell subsets in human *Leishmania* infections. **APMIS Suppl.** 68, 105, 5-33. 1997.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A2. **Toxicon**, v.27, p.613-635, 1989.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon** 42, 827–840, 2003.

KINI, R. M. Phospholipases A2: a complex multifunctional protein puzzle. In: Kini, R.M. (Ed.), *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. **John Wiley and Sons**, Chichester, pp. 1–28, 1997.

KONECNY, P.; STAGG, A. J.; JEBBARI, H. English N, Davidson RN, Knight SC. Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation *in vitro*. **Eur J Immunol** 29: 1803-1811. 1999.

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.

KUDO, I. Diversity of phospholipase A2 enzymes. **Biol. Pharm. Bull.** 27, 1158–1164, 2004.

KUNJACHAN, S.; GUPTA, S.; DWIVEDI, A.K.; DUBE, A.; CHOURASIA, M.K. Chitosan-based macrophage-mediated drug targeting for the treatment of experimental visceral leishmaniasis. **J. Microencapsul.** 28, 301–310. 2011.

LAING, G. D.; CLISSA, P. B.; THEAKSTON, R. D.; MOURA-DA-SILVA. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. **Eur. J. Immunol**, v. 33, n. 12, p. 3458-3463, 2003.

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

LASIC, D. D. *Liposomes: from physics to applications*. 1^a ed. Amsterdam: **Elsevier Science Publishers B. V.**, cap. 3, p. 63-90, 1993.

LIEW, F. Y.; PARKINSON, C.; MILLOTT, S.; SEVERN, A.; Carrier, M. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, 69:570-573. 1990.

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

LIMA, E. B.; PORTO, C.; da MOTTA, J. O. C.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2007; 82: 111-24.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 51(5), 247–253. 2009.

LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y.; MORENO, E. Synthetic Peptides Derived from the C-Terminal Region of Lys49 Phospholipase A2 Homologues from Viperidae Snake Venoms: Biomimetic Activities and Potential Applications. **Current Pharmaceutical Design**, 16, 3224-3230. 2010.

LOPEZ, K. S.; DINGES, S.; GRIEWANK, K.; IWAKURA, Y.; UDEY, M. C.; VON STEBUT, E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **J. Immunol.**, 182:3039-3046. 2009.

LUZ, N. F.; ANDRADE, B.B.; FEIJÓ, D.F.; ARAÚJO-SANTOS, T.; CARVALHO, G. Q.; ANDRADE, D.; ABÁNADES, D.R.; MELO, E.V.; SILVA, A.M.; BRODSKY, C.I.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; SOARES, R.P.; ALMEIDA, R.P.; BOZZA, M.T.; BORGES, V. M. Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. **J. Immunol.**, n.188, v.9, p.4460-7, 2012.

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

MACHADO, L. C.; GNOATTO, S. A.; KLÜPPEL, M. L. W. Lipossomas aplicados em farmacologia: Uma revisão da literatura. **Estud. Biol.**, (67):215-224. 2007.

MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis. In: Maltezou HC, Gikas A, editors. Tropical and emerging infectious diseases. Kerala, India: **Research Signpost**, p. 163–85. 2010.

MARCUSSI, S., B; SANT'ANA, C. D.; OLIVEIRA, C. Z.; RUEDA, A. Q. R.; MENALDO, D. L.; BELEBONID, R. O.; STÁBELI, R. G.; GIGLIOB, J. R.; FONTES, M. R.; SOARES, A. Snake Venom Phospholipase A2 Inhibitors: Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2007, 7, 000-000.

MIRÓ, G.; GALVEZ, R.; FRAILE, C.; DESCALZO, M. A.; MOLINA, R. Infecty to Phlebotomus perniciosus of dogs naturally parasitezed with *Leishmania infantun* after diferente treatments. **Parasit Vectors**. 4: 52, 2011.

MORAES, M. A. P; SILVEIRA, F. T. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev Inst MedTrop São Paulo** 1994; 36: 459-463.

MOREIRA, L. A.; ITO, J.; GHOSH, A.; DEVENPORT, M.; ZIELER, H.; ABRAHAM, E. G.; CRISANTI, A.; NOLAN, T.; CATTERUCCIA, F.; JACOBS-LORENA, M. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. **J Biol Chem**, v.277, n.43, p.40839-43. 2002.

MURAKAMI, M. ; KUDO, I. Secretory fosfolipase A₂. **Biol Pharm Bull**, v. 27, n. 8, p. 1158-64, 2004.

MURAKAMI, M. SATO, H. YAMAMO, K. TAKETOMI, Y. A new era of secreted phospholipase A₂. **J Lipid Res**. 2015 56(7):1248-61.

MURAKAMI M.; TAKETOMI Y.; SATO H.; YAMAMOTO K. Secreted phospholipase A2 revisited. **J. Biochem**. V. 150, p. 233–255, 2011a.

MURRAY, H. W. BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA N. G. Advances in Leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*–macrophage interaction: a metabolic perspective **Cellular Microbiology** Volume 10, Issue 2, pages 301–308, 2008.

NEEDLEMAN, P.; TRUK, J.; JAKSCHIK, B. A.; MORRISON, A. R.; LEFKOWITH, J. B. Arachidonic Acid Metabolism. **Annual Review of Biochemistry**. Vol. 55:69-102. 1986.

NICOLETE, R.; RIUS, A.; NOMIZO, A.; PETER, J. J.; DA COSTA, F. B.; SANZ, M. J.; FACCIOLI, L. H. Budlein A from *Viguiera robusta* inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, adhesion molecule expression and inflammatory mediators release. **Phytomedicine**, 16: 904–915- 2009.

NICOLETTI, S.; SEIFERT, K.; GILBERT, I. H. N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide–amphotericin B (HPMA–AmB) copolymer conjugates as antileishmanial agents. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 33:441–2009.

NOGUEIRA, A. C., MONTEIRO, T., ESCOBAR V, J. P. **Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.idsn.gov.co/images/documentos/laboratorio/03vigientleshma.pdf>>. Acesso em 24 out. 2015.

OLIVEIRA, F., BAFICA, A. Lesion size correlates with *Leishmania* antigenstimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. **The American Journal the Tropical Medicine and Hygiene**, v.85, n.1, Jul, p.70-3. 2011.

OLSON, J. S. C.; MARKWELL, J. Current Protocols in Protein, **Science**, 3: 4-29. 2007.

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

PARK, K. Targeted vs. non-targeted delivery systems: reduced toxicity over efficacy. **J. Control. Release** 178, 126. 2014

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **Am J Surg** 187: 11S–6S. **PLOS ONE**. 2004.

PARK, J. H.; LEE, S.; KIM, J.; PARK, K.; KIM, K.; KWON, I. C. Polymeric nanomedicine for cancer therapy. **Progress in Polymer Science**, v. 33, p. 113 – 137, 2008.

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

PAVLI, H.; MALTEZOU, C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers International. **Journal of Infectious Diseases**, 14 e1032–e1039. 2010.

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**, 58, 28–34. 2011.

PEREIRA, A.; ALEXANDRE, K. A.; HAYASHI, M. A. F.; DA SILVA, A. R. B. P.; YAMANE, T.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; KERKIS, I. Crotonamine toxicity and efficacy in mouse models of melanoma. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 20, n. 9, p. 1189-1200, 2011.

PEREIRA, A. V.; LÔBO, K. M. S.; BEZERRA, D. A. C.; RODRIGUES, O. G.; ATHAYDE, A. C. R. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de jurema preta e meem sobre amostras de *Staphylococcus sp.* isoladas de mastite em búfalas. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 76, n.3, p.341-346. 2009.

PEREIRA, M. F.; NOVELLO, J. C.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; LANDUCCI, E. T.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacucu) venom with low phospholipase A2 activity. **J. Protein Chem.**, 17: 381-6. 1998.

PEREZ-AYALA, A.; NORMAN, F.; PÉREZ-MOLINA, J. A.; HERRERO, J. M.; MONGE, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Imported leishmaniasis, a heterogeneous group of diseases. **J. Travel Med.**, 16:395–401. 2009.

PETRICEVICH, V. L.; TEIXEIRA, C. F.; TAMBOURGI, D. V.; GUTIÉRREZ, J. M. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**; 38(9): p.1253-66, 2000.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Ver. Ass. Med. Brasil**, 47(1): 24-9. 2001.

PISCOPO, T. V.; MALLIA, A. C. Leishmaniasis. **Postgrad Med. J.**, v. 82, n.972, Oct, p. 649-57. 2006.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; NUNES DE JESÚS, M.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova**, Vol. 26, No. 4, 550-555, 2003.

REIMÃO, J. Q.; COLOMBO, F. A.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; TEMPONE, A. G. Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania infantum chagasi*. **Exp Parasitol** 130:195–199, 2012.

ROGERS, K. A.; DEKREY, G. K.; MBOW, M. L.; GILLESPIE R. D.; BRODSKYN C. I.; TITUS R. G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiol Lett**: 209:1–7, 2002.

ROSAS, N. S. C.; MONTEIRO-EVANGELISTA, J. S. A.; ANDRADE Jr., H. F.; SPENCER, P. J.; GUARNIERID, M. C.; BEVILAQUA, C. M. L.; CARVALHO, C. A.; CARDOSO, R. P. A. Cytotoxicity of *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* whole venoms in *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi*. **Asian Journal of Science and Technology** Vol. 07, Issue, 08, pp.3362-3366. 2016

ROSHOLM, K. R.; AROURI, A.; HANSEN, P. L.; GONZÁLEZ-PÉREZ, A.; MOURITSEN, O. G. Characterization of fluorinated catansomes: a promising vector in drug-delivery. **Langmuir**. 7;28(5):2773-81. 2012.

SAHA, A. P. P.; BHOWMIKA, T.; ANJAN, K. D.; ANTONY, G. A. *In vivo* and *in vitro* toxicity of nanogold conjugated snake venom protein toxin GNP-NKCT1. **Toxicology Reports** 1 (2014) 74–84

SAHA, S.; MONDAL, S.; BANERJEE, A.; GHOSE, J.; BHOWMICK & NAHID ALI. Immune responses in kala-azar. **Indian J. Med. Res.**, nº 123, p. 245-266, 2006.

SAMPAIO, R.; RIBEIRO, N.; MARSDEN, P. D. Tratamento da forma mucosa de leishmaniose sem resposta a glucantime, com Anfotericina B liposomal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 30(2):125-128, 1997.

SAMPAIO, R. N. R.; LUCAS, I. C.; COSTA FILHO, A. V. Use of oral miltefosine associated with meglucamine antimoniate in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis caused by *L. (L) amazonensis*. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* vol.13 no.3. 2007.

SANTAMARIA, C.; LARIOS, S.; QUIROS, S.; PIZARRO-CERDA, J.; GORVEL, J. P.; LOMONTE, B.; MORENO, E. Bactericidal and antiendotoxic properties of short cationic peptides derived from a snake venom Lys49 phospholipase A2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 49, 1340–1345, 2005.

SANTOS, K. K. A.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; ARIAS, A. R.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Atividade leishmanicida *in vitro* de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. **Rev Ciênc. Farm. Básica Apl.**, 34, 47-50. 2013.

SCOTT, P.; FARREL, J. P. Experimental Cutaneous Leishmaniasis: Induction and Regulation of T Cells following Infection of Mice with *Leishmania major*. **Chem. Immunol**, 70: 60-80, 1998.

SHINOHARA, L.; DE FREITAS, S. F.; DA SILVA, R. J.; GUIMARAES, S. In vitro effects of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* venoms on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Parasitology Research** 98, 339–344. Six, 2006.

SHOWLER, A. J.; BOGGILD, A. K. **Cutaneous Leishmaniasis in Travellers: a Focus on Epidemiology and Treatment in. Current Infectious Disease Reports**, 17(7): 489, 2015.

SILVA-JARDIM, I.; HORTA, M. F.; RAMMALHO-PINTO, F. J. The leishmania chagasi proteasome: role in promastigotes growth and amastigotes survival within murine macrophages. **Acta Trop.**, 91: 121-130, 2004.

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

SINGH, M.; O'HAGAN, D. T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v. 33, p. 469-478, 2003.

SINGODIA, D.; ASHWNI, V.; RAHUL, K. V.; PRABHAT, R. M. Investigations into an alternate approach to target mannose receptors on macrophages using 4-sulfated N-acetyl galactosamine more efficiently in comparison with mannose-decorated liposomes: an application in drug delivery. **Nanomedicine** 8, 468–477. 2012.

SIX, D. A., DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta** 1488, 1–19, 2000.

SOARES, A. M. Use of Snake Venom for Biomedical Researches and Drug Development. **Open Journal of Biochemistry and Biotechnology**, 1: 1-4. 2012.

SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications on phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties, Review, **Toxicon**, 42: 855–868. 2004.

SOUZA-LEMOS, C.; DE-CAMPOS, S. N.; TEVA, A.; PORROZZI, R.; GRIMALDI, G. Jr. In situ characterization of the granulomatous immune response with time in nonhealing lesional skin of *Leishmania braziliensis*-infected rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **Veterinary Immunology and Immunopathology** 142: 147–155. (2011)

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, Jr.; 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 142; 371–381, 2006.

STÁBELI, R. G.; SIMÕES-SILVA, R.; KAYANO, A. M.; GIMENEZ, G. S.; MOURA, A. A.; CALDEIRA, C. A. S.; COUTINHO-NETO, A.; ZAQUEO, K. D.; ZULIANI, J. P.; CALDERON, L. A.; SOARES, A. M. Purification of Phospholipases A2 from American Snake Venoms. In: *Chromatography – The Most Versatile Method of Chemical Analysis*. **InTech**. p. 3-34, 2012.

STAFFORD, J. L.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. **Crit. Rev. Microbiol.** 28(3), p. 187-248, 2002.

STOCKDALE, L.; NEWTON, R. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. **PLoS neglected tropical diseases**, 7(6), e 2278. 2013.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **Indian J. Med. Res.**, 123(3):345-52. 2006.

TAKETOMI, Y., N. UENO, T. KOJIMA, H. SATO, R. MURASE, K. YAMAMOTO, S. TANAKA, M. SAKANAKA, M. NAKAMURA, Y. NISHITO, Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2- DP1 receptor paracrine axis. **Nat. Immunol.** 14:554–563. 2013.

TAVARES, N. M.; SANTOS, D. M.; DE OLIVEIRA, C. I.; CLÁUDIA, I.; BRODSKYN, C. I. Estratégias de vacinação contra Leishmaniose Visceral e Cutânea: Lições dos modelos experimentais. **Gazeta Média da Bahia**, v. 79 (Supl. 3), n. 143, p. 110-121. 2009.

TEMPONE, A. G., MORTARA R.A., DE ANDRADE H. F. JR., REIMAO J. Q. Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents** 36 (2010) 159–163. 2010

TERRA, A. L. C.; MOREIRA-DILL, L. S.; SIMÕES-SILVA, R.; MONTEIRO, J. R. N.; CAVALCANTE, W. L.G.; GALLACCI, M.; BARROS, N. B.; NICOLETE, R.; TELES, C. B. G.; MEDEIROS, P. S. M.; ZANCHI, F. B.; ZULIANI, J. P.; CALDERON, L. A.; STABELI, R. G.; SOARES, A. M. Biological characterization of the Amazon coral *Micrurus spixii* snake venom: Isolation of a new neurotoxic phospholipase A2. **Toxicon**, 103 1-11, 2015.

THOMAS, P. S. Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma. **Immunol Cell Biol** 2001;79: 132-40.

TORRES, M.; BARDAGI, M.; ROURA, X.; ZANNA, G.; RAVERA, I; FERRER, L. Long term follow-up of dogs diagnosed with Leishmaniosis (clinical stage II) and treatment with meglumine antimoniate and allopurinol. **Vet J.**, 188:346-351, 2011.

TOYAMA, M. H.; COSTA, P. D.; NOVELLO, J.C. DE OLIVEIRA, B.; GIGLIO J.R.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A.; MARANGONI, S. Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A2 from Bothrops pirajai snake venom, a toxin with moderate PLA2 and anticoagulant activities and high myotoxic activity. **J Protein Chem.** 1999; **18**:371-8.

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.; MARTINS, A. M. C.; MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon** 47, 47–57, 2006.

TRINCHIERI, G.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R. A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immunity**, 19: 641-644. 2003.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **J. Exp. Med.**, v. 204, n. 2, p. 239-43, 2007.

TUON, F. F.; AMATO, V.S.; BACHA, H. A.; ALMUSA, W. I. T.; DUARTE, M. I.; NETO, V. A. Toll-Like Receptors and Leishmaniasis. **INFECTION AND IMMUNITY**, p. 866–872. 2008.

UHL, W.; SCHRAG, H. J.; SCHMITTER, N.; NEVALAINEN, T. J.; AUFENANGER, J.; WHEATLEY, A. M.; BUCHLER, M. W. Pathophysiological role of secretory type I and II phospholipase A2 in acute pancreatitis: an experimental study in rats. **Gut**, v.40, n.3, p.386-92. 1997.

ÜNER, M.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles and nanostructure lipid carriers. Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, **American Scientific Publishers**, 10: 43-56. 2007.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Preparation and characteration of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharm. Acta Helvetica**, Berne, v. 70, p. 95-111, 1995.

WANG, Z. E.; REINER S. L.; ZHENG S.; DALTON D. K.; LOCKSLEY R. M. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon- γ -deficient mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.** 179: 1367-1371, 1994.

WANDERLEY, C. M.; SILVA, D. V.; WONG, R. M.; XIMENES, D. F.; MORELO, F. Bothrops jararacussu snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoid- and neutrophil-dependent manner, **Toxicon** 90:134–147. 2014

WEI, J. F.; WEI, L. X.; MO, Y. Z.; YANG, H.; HE, S. Induction of Mast-Cell Accumulation by Promotoxin, an Arg-49 Phospholipase A₂. **International Research.** p. 5. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Committee on the Control of the Leishmaniases.** II. World Health Organization. III. Series. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en>>. Acesso em: 07 nov. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis.** Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Programmes and projects/Leishmaniasis.** Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/>>. Acesso em: 01 set. 2015.

ZAMBELLI, V. O.; CHIOATO, L.; GUTIERREZ, V. P.; WARD, R. J.; CURY, Y.; et al. Structural determinants of the hyperalgesic activity of myotoxic Lys49-phospholipase A₂. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop.** 2017, vol.23, 7. Epub Mar 16, 2017. ISSN 1678-9199. <http://dx.doi.org/10.1186/s40409-017-0099-6>.

ZAMUNÉR, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; MUSCARÁ, M. N; TEIXEIRA, S. A.; TEIXEIRA, C. F. P. - Bothrops asper e Bothrops jaracaca snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes *in vivo*. **Toxicon.**, 39:1505-1513, 2001.

ZULIANI, J. P.; GUTIÉRREZ, J. M.; CASAIS E SILVA, L. L.; COCCUZO SAMPAIO, S.; LOMONTE, B.; TEIXEIRA, C. F. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and lys-49 phospholipases A(2). **Toxicon**, v. 46, n. 5, p. 523-532, 2005.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE PESQUISAS EM PATOLOGIAS TROPICAIS

Rua da Beira, 7671 BR364 Km 3,5, CEP 78912-000, Porto Velho, RO, Brazil
Telefone: (55) (69) 3219-6010 - Fax: (55) (69) 3219-6000

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo projeto 2013/01 registrado sob no 2013/01 na folha 13 do livro 1 da Comissão de ética no uso de Animais do IPEPATRO (CEUA IPEPATRO), sob a responsabilidade do Dr. Roberto Nicolete coordenador do projeto intitulado: "Toxinas de *Bothrops jararacuçu* encapsuladas em lipossomas como terapia alternativa para leishmaniose cutânea: estudos de caracterização e aplicação biológica.", está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de Animais do IPEPATRO (CEUA IPEPATRO), em 02 de maio de 2013.

Porto Velho, 02 de maio de 2013.

Relatores:

- Dra. Juliana Pavan Zuliani (Presidente CEUA IPEPATRO)

-Ms. Luiz Herman Soares Gil