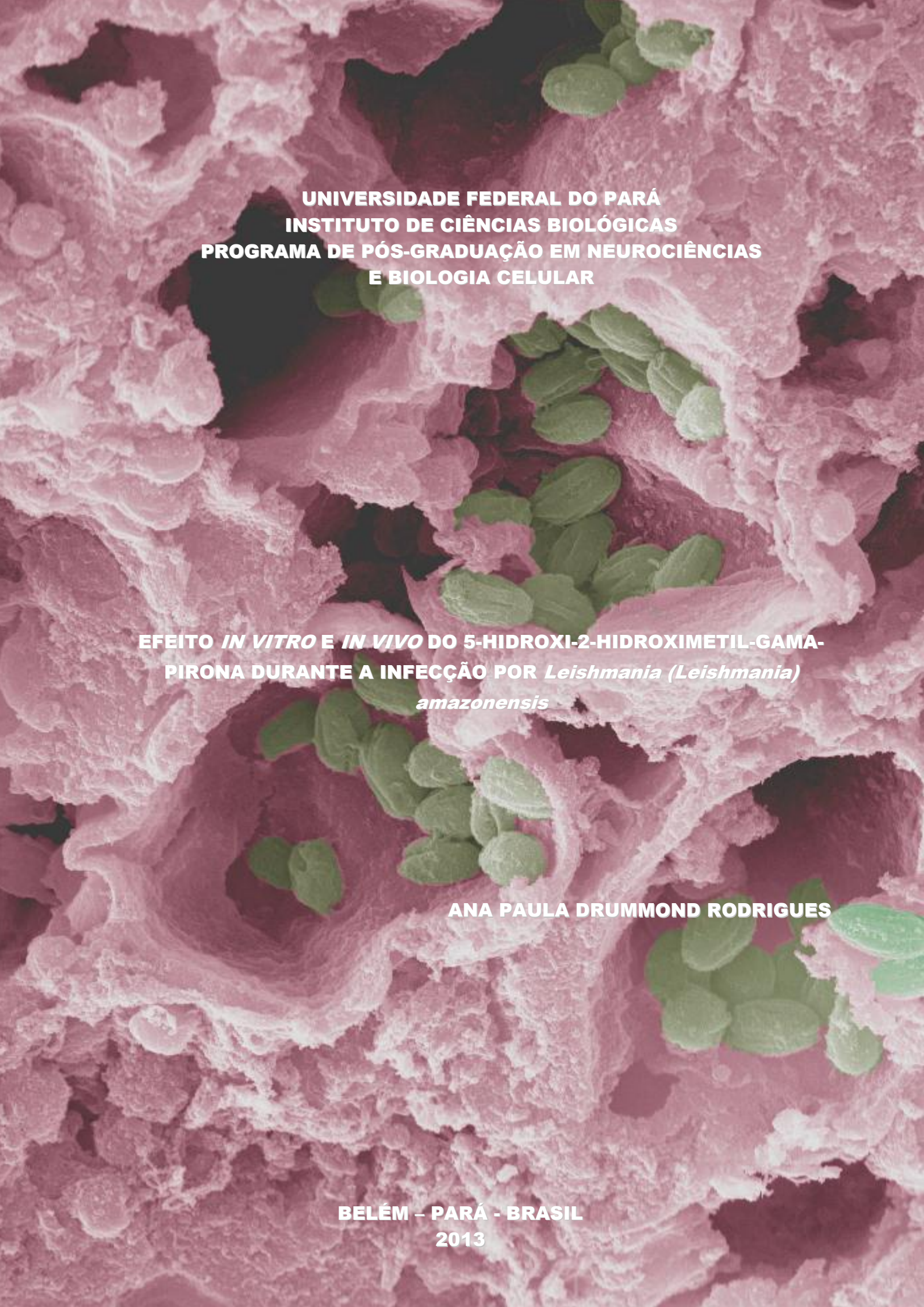


A scanning electron micrograph (SEM) showing a host cell with a highly textured, irregular surface. Inside the cell, there are several clusters of green, oval-shaped parasites, which are Leishmania. The parasites are arranged in small groups, some appearing to be within the cell's internal structures.

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

**EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL-GAMA-
PIRONA DURANTE A INFECÇÃO POR *Leishmania (Leishmania)*
*amazonensis***

ANA PAULA DRUMMOND RODRIGUES

**BELÉM – PARÁ - BRASIL
2013**

EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL-GAMA-PIRONA DURANTE A INFECÇÃO POR *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Tese apresentada à Universidade Federal do Pará como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular para obtenção do título de doutor.

ANA PAULA DRUMMOND RODRIGUES

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

**BELÉM – PARÁ - BRASIL
2013**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Rodrigues, Ana Paula Drummond, 1983-
Efeito in vitro e in vivo do
5-hidroxi-2-hidroximetil-gama-pirona durante a
infecção por leishmania (leishmania) amazonensis
/ Ana Paula Drummond Rodrigues. - 2013.

Orientadora: Edilene Oliveria Silva.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do
Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa
de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia
Celular, Belém, 2013.

1. Ácido kójico Efeito fisiológico. 2.
Leishmaniose Tratamento. 3. Leishmania. I.
Título.

CDD 22. ed. 615.3295

EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL-GAMAPIRONA DURANTE A INFECÇÃO POR *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Por

ANA PAULA DRUMMOND RODRIGUES

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

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Tese apresentada à Universidade Federal do Pará como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular para obtenção do título de doutor, sob avaliação da seguinte banca:

Membro: Dr. Renato Augusto DaMatta

Professor da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF

Membro: Dr. Sérgio Henrique Seabra

Professor do Centro Universitário da Zona Oeste - UEZO

Membro: Dra. Marta Chagas Monteiro

Professora da Faculdade de Farmácia - UFPA

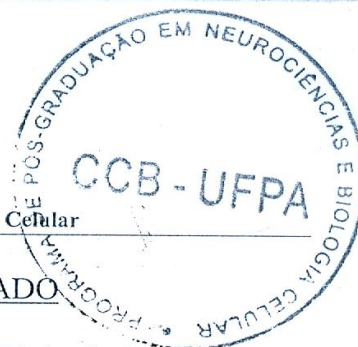
Suplente: Dr. José Luiz Martins do Nascimento

Professor do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Belém, 27 de Maio de 2013.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular



ATA DE DEFESA DE TESE PARA O DOUTORADO

Programa: Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

Área de concentração: Biologia Celular

Candidata: Ana Paula Drummond Rodrigues

Tema: "EFEITO IN VITRO E IN VIVO DO 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL-GAMAPIRONA DURANTE A INFECÇÃO POR Leishmania (Leishmania) amazonensis"

Data: 27 de maio de 2013, às 10h

Local: Auditório "Prof. Dr. João Paulo do Valle Mendes", do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Após a candidata apresentar os resultados do seu estudo e responder às perguntas dos examinadores, a comissão examinadora reuniu-se e resolveu pela sua:

☒ APROVAÇÃO

☐ REPROVAÇÃO

Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Banca Examinadora deu por encerrado os trabalhos e esta ata foi assinada por todos os membros da comissão examinadora.

Edilene Oliveira da Silva

Profa. Dra. **Edilene Oliveira da Silva** - UFPA
(Orientadora, sem direito a voto)

Renato Augusto DaMatta

Prof. Dr. **Renato Augusto DaMatta** – UENF

Sérgio Henrique Seabra

Prof. Dr. **Sérgio Henrique Seabra** - UEZO

Marta Chagas Monteiro

Profa. Dra. **Marta Chagas Monteiro** – UFPA

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia e de Biologia Estrutural (LBE) do Instituto de Ciências Biológicas, em colaboração com o Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular do Instituto de Ciências Exatas e Naturais, ambos na Universidade Federal do Pará, e com o Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Evandro Chagas. O apoio financeiro foi proveniente das seguintes agências: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para financiamento da bolsa de doutorado através do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem – Instituto do Milênio (INCT-INBEB de Biologia), apoio do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica - Novas Fronteiras (PROCAD) para realização do doutorado sanduíche no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Projeto de Cooperação Interinstitucional em Neurociências e Biologia Celular em Modelos Experimentais de Interesse na Região Amazônica. O presente trabalho gerou a publicação de três patentes (nacional, USA e Européia).

"Não há nada que seja maior evidência de insanidade do que fazer a mesma coisa dia após dia e esperar resultados diferentes."

Albert Einstein

A Deus...

Aos meus pais e irmãos...

Ao meu noivo, Luis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pelo apoio incondicional mesmo à distância, nunca deixaram de demonstrar todo o seu amor, carinho e dedicação em mais uma etapa da minha vida. Aos meus irmãos, Alexandre e Rodolfo, que estão sempre torcendo pelo meu sucesso e me apoiando em todas as escolhas que tenho feito. Tudo que tenho me tornado, devo a vocês e a tudo que me ensinaram e me ensinam todos os dias!

Também não poderia deixar de agradecer, ao meu noivo, Luis Henrique, que sempre esteve ao meu lado em todas as etapas e momentos deste trabalho, que vibrou, chorou, se magoou, conquistou e que acima de tudo, jamais deixou de me apoiar em todas as decisões que tomei. Agradeço por ter o privilégio de tê-lo como companheiro na vida pessoal e também profissionalmente!

Quero também agradecer à professora Edilene, pela oportunidade de estar nesse grupo há oito anos e por tudo que aprendi no laboratório de parasitologia e biologia estrutural. Agora iniciaremos uma nova etapa, mas com mesmo gosto em comum: amor à pesquisa! Obrigada por todos esses anos de aprendizado e dedicação!

Agradeço também a TODOS os integrantes desse grupo feliz e alegre, que se tornou uma grande família pra mim: Anastácia, Raquelzita, Jorge, Lili, Rodrigo, Neide, Davi, Carolzinha, Paula, Bruno, Fernanda, Heyder e os mais novinhos Evelen, Ingrid e Sandro. Obrigada por fazerem dos cafés de todas as tardes momentos de descontração e alegria! Afinal... o café, junto com aquelas gargalhadas, sempre foram um combustível indispensável, né?(rs). Sentirei muitas saudades dessas tardes!! Mas podem ter certeza que sempre que puder estarei por aí trocando idéias e gargalhadas com vocês!

Agradeço também ao Prof. José Luiz pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelos momentos de discussão e boas idéias!

Obrigada aos meus queridos amigos Nath, Camila, Diogo e Sy que sempre torceram pelo meu sucesso e estavam presentes com o ombro amigo para me ouvir e apoiar. Obrigada pelos momentos de distração que proporcionaram durante os momentos difíceis!

Quero agradecer também à nova família do laboratório de microscopia eletrônica do Instituto Evandro Chagas, ao Dr. Manoel por me apoiar e entender a minha ausência em alguns momentos para finalização desta etapa, à Nete, pessoa já muito querida e que me ouviu em momentos conturbados desse último ano, e a todas as pessoas que de forma direta ou simplesmente com uma palavra de conforto, me ajudaram nessa caminhada.

Quero agradecer também ao Dr. Alberdan e ao Dr. Antonio que produziram a pomada e a substância testada nesta tese.

Obrigada à Dr. Auxiliadora e à Lia do Laboratório de Histologia da UFPA por processarem as amostras para histopatológico.

Agradeço ao Dr. Fernando, do Instituto Evandro Chagas, por ceder a cepa de *Leishmania* usada nesta tese e pelas contribuições dadas durante a qualificação.

Obrigada a todas as instituições que fomentaram e/ou apoiaram o desenvolvimento desta pesquisa.

E...finalmente...obrigada a todos que de forma direta ou indireta contribuíram com a conquista de mais uma etapa importante da minha vida!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS GERAIS.....	1
1.2. LEISHMANIA SP.....	2
1.2.1 Classificação	2
1.2.2 Morfologia	4
1.2.3 Ciclo evolutivo	5
1.2.4. A interação parasita-hospedeiro vertebrado.....	7
1.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS DURANTE O PROCESSO DE INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS</i>	10
1.3.1 Aspectos epidemiológicos	10
1.3.2 Aspectos clínicos e imunológicos.....	11
1.3.3 A infecção por <i>Leishmania</i> e o processo de cicatrização.....	15
1.4. TRATAMENTO.....	18
1.4.1 Modelos experimentais de leishmaniose tegumentar para testes de novos fármacos	18
1.4.2 Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.....	19
1.4.3 Tratamento experimental das leishmanioses.....	20
1.5 O ÁCIDO KÓJICO	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 OBTENÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO METABÓLITO 5-HIDROXI-2- HIDROXIMETIL-gama-PIRONA (HMP) E PRODUÇÃO DA POMADA	25
3.2 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	25
3.2.1 Cultivo e manutenção do parasita	25
3.2.2 Obtenção e cultivo da célula hospedeira.....	25
3.2.3 Interação parasita-célula hospedeira	26
3.2.4 Análise ultraestrutural de promastigotas e amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas com HMP	26
3.2.5 Detecção de radicais superóxido em macrófagos infectados com <i>L.(L.) amazonensis</i> e tratados com HMP	27
3.3 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	28
3.3.1 Análise da atuação do HMP sobre lesões de animais infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	28
3.3.2 Histopatologia das biópsias	28
3.3.4 Análise ultraestrutural das biópsias	29
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Ação leishmanicida do HMP	31
4.2 Alterações ultraestruturais causadas em promastigotas e amastigotas intracelulares tratadas com HMP ..	34
4.3 Produção de ROS em macrófagos infectados e tratados com HMP	41
4.4 Redução do número de parasitos e do infiltrado celular em lesões tratadas com HMP.....	44
4.5 Aumento da produção de colágeno em lesões tratadas com HMP	47
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÕES.....	60
7 PRODUÇÃO TÉCNICA.....	60
8 PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS	61
9 DOUTORADO SANDUÍCHE.....	61
10 PREMIAÇÃO	61
11 REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	77

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Taxonomia do parasita <i>Leishmania</i>	3
Figura 2. Formas evolutivas do parasita <i>Leishmania</i> spp.	5
Figura 3. Ciclo evolutivo do parasita <i>Leishmania</i> spp.	6
Figura 4. Geração de radicais de oxigênio a partir de estímulo externo (<i>Leishmania</i> spp.)	9
Figura 5. Infiltrado imune em diferentes formas clínicas de LC.	13
Figura 6. Leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD)	14
Figura 7. Desenho esquemático do processo de cicatrização da pele	17
Figura 8. Estrutura química do ácido kójico, 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona.	22
Figura 9. Atividade do HMP sobre <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>in vitro</i>	32
Figura 10. Alterações ultraestruturais em promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas por 4 dias com 50 μ g/mL de HMP.	35
Figura 11. Alterações ultraestruturais em amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) amazonensis</i> 50 μ g/mL de HMP e mantidos em cultivo por 24h.	37
Figura 12. Detecção da produção de superóxido através da reação citoquímica com NBT em macrófagos infectados e tratados por 1 hora com HMP.	42
Figura 13. Efeito do tratamento tópico com HMP sobre a infecção experimental causada por <i>L. amazonensis</i>	45
Figura 14. Secções histopatológicas de lesões de animais infectados e submetidos ao tratamento tópico com HMP.	48
Figura 15. Secções de lesões de animais infectados e submetidos ao tratamento tópico com HMP.	50
Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura de lesões de animais infectados e submetidos ao tratamento com HMP	52

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BSA – Bovina serum albumin

DAPI – Diamino fenilindole

DMSO – Dimetilsufóxido

GP63 – Glicoproteína 63

HMP – 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IC50 – concentração inibitória máxima capaz de inibir em 50% o crescimento de uma célula

INF- γ – Interferon γ

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

LC – Leishmaniose Cutânea

LPG – Lipofosfoglicano

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LVA – Leishmaniose Visceral Americana

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT – Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfatase Hidrogenase

NBT – Nitroblue tetrazolium

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear

NH₄Cl – Cloreto de amônio

NO – Óxido nítrico

O₂⁻ – Íon superóxido

OH⁻ – Radical hidroxila

PBS – Sigla em inglês para tampão fosfato salino

PS – Fosfatidilserina

ROS – Radicais de oxigênio

SOD – Superóxido dismutase

TGF- β – Sigla inglesa para fator modulador de crescimento

TNF- α – Sigla inglesa para fator de necrose tumoral

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas distribuídas mundialmente. A quimioterapia é o tratamento mais eficaz para a doença; apesar do grande número de drogas antileishmania disponíveis, são usualmente tóxicas, caras e requerem um longo período de tratamento. Portanto, torna-se necessária a busca de novas substâncias que sejam capazes de atuar sobre o protozoário sem causar danos ao hospedeiro, que tenham uma via de administração não invasiva e que, ainda, sejam viáveis economicamente. O ácido kójico, ou 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona (HMP), é conhecido por inibir a enzima tirosinase no processo de produção da melanina, sendo extensivamente utilizado em cosméticos e também como tratamento tópico para melasma, não havendo citotoxicidade em humanos; entretanto, o potencial do HMP como agente antileishmania não é conhecido. O presente estudo analisou o efeito deste bioproduto em infecções por *L. amazonensis* *in vitro* e *in vivo*. O HMP promoveu a diminuição do crescimento de promastigotas e amastigotas em 62% (IC₅₀ 34 μ g/mL) e 79% (IC₅₀ 27,84 μ g/mL) *in vitro*, respectivamente. A análise ultraestrutural de ambas as formas evolutivas tratadas com 50 μ g/mL do HMP apresentaram corpos vesiculares no interior da bolsa flagelar, induziu uma intensa vacuolização intracelular bem como alterações mitocondriais. O estudo *in vitro* também demonstrou que o HMP foi capaz de reverter o efeito inibitório causado pela *L. amazonensis* no que diz respeito à produção de radicais de oxigênio. A análise histopatológica de lesões proveniente de animais submetidos ao tratamento tópico com o HMP demonstrou que o tecido apresentou um intenso processo de cicatrização. Além disso, fibras colágenas foram encontradas de maneira organizada no local da infecção de animais tratados, com um pequeno infiltrado celular e diminuição do número de parasitos. Tendo em vista a ação seletiva do HMP *in vitro*, o processo de ativação da célula hospedeira pelo bioproduto e a diminuição do número de parasitos observados durante o tratamento com a pomada, e pelo fato do HMP ser amplamente utilizado como agente antimelasma em humanos, esse metabólito pode ser promissor como tratamento tópico contra a Leishmaniose cutânea e apresentando grande potencial como agente leishmanicida.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea; *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, tratamento tópico, ácido kójico, 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona.

ABSTRACT

Leishmaniasis includes a group of infectious diseases with worldwide distribution. Chemotherapy is one of the most effective treatments for this disease; although a number of anti-leishmanial drugs are available, these drugs are in general toxic, expensive and require long-term treatment. Kojic acid, or 5-hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pyrone (HMP), is well known for effectively inhibiting the tyrosinase enzyme in the process of melanin biosynthesis and is extensively used in cosmetics and as a topical treatment for melasm with no cytotoxicity observed in humans; however its potential as anti-leishmanial agent are unknown. The present study was designed to determine the effect of this bioproduct on *L. amazonensis*, following *in vitro* and *in vivo* infections. HMP (50 μ g/mL) was found to decrease the growth by 62% (IC₅₀ 34 μ g/mL) and 79% (IC₅₀ 27.84 μ g/mL) of promastigotes and amastigotes *in vitro*, respectively. Ultrastructural analysis of both evolutive forms showed that HMP increasing the presence of vesicles bodies into the flagellar pocket, and inducing an intense intracellular vacuolization and swelling of the mitochondrion. *In vitro* study also demonstrated that HMP is able to reverse ROS inhibitory mechanism promoted by *L. amazonensis* observed by nitroblue tetrazolium reaction. Histopathological analysis of *in vivo* topical treatment with HMP ointment showed healing process and suppressed ulcer dissemination in animal model. In addition, collagen fibers stained by picosirus red, were found at the infection site of HMP-treated animals and an absence or low-level cellular infiltrate was observed, as well as a decrease in parasite burden. In view of the *in vitro* selective action of HMP on leishmania parasites, the activation of host cells and *in vivo* decrease in parasite burden, observed using HMP ointment, as well as the fact that HMP is widely and safely applied as an antimelasm agent in humans, this compound could be useful for the selective treatment of cutaneous leishmaniasis and may hold great potential as an anti-leishmanial agent.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, topical treatment, kojic acid, 5-hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pyrona.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

As leishmanioses são um complexo de doenças que acometem milhões de pessoas em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses afetam 98 países, dentre os quais 72 são classificados como países em desenvolvimento, sendo uma das seis doenças tropicais de maior relevância no mundo e causadas por vinte espécies de protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania* (WHO, 2010). No Brasil foram registrados 21.961 novos casos em 2010, sendo que a maior parte dos casos ocorreu nas regiões Nordeste e Norte (73%). O Estado do Pará registrou 30% dos casos ocorridos na região Norte.

A doença tem caráter antroponótico sendo transmitida através da picada do vetor da doença, o flebotomíneo. A infecção ocorre em humanos bem como em animais silvestres que se tornam reservatórios da doença. A patologia pode apresentar desde lesões cutâneas, que podem se curar espontaneamente, até a forma mais grave da doença, quando ocorre a visceralização e pode levar ao óbito (Lainson, 2010). A quimioterapia é o tratamento mais eficaz para a doença; apesar do grande número de drogas antileishmania disponíveis, são usualmente tóxicas, caras e requerem um longo período de tratamento.

Desde a década de 40 a terapia mais aceita para todas as formas de leishmaniose é o uso de antimoniais pentavalentes (Revisado por Alavi-Anani et al., 2012). Entretanto, a presença de diversas formas clínicas da doença e o aparecimento de cepas resistentes aos antimoniais pentavalentes, principalmente àquelas pertencentes ao gênero *Viannia*, têm dificultado o tratamento (Ashutosh et al., 2007; Dias et al., 2007). As drogas de segunda linha como anfotericina B e pentamidina apresentam pouca eficácia também devido a presença de cepas resistentes e por serem tratamentos invasivos e tóxicos causando reações adversas (Croft & Olliaro, 2011).

Novos medicamentos como miltefosina, paromomicina e sitamaquina são utilizados amplamente como tratamento para leishmaniose visceral na Índia e também como tratamento opcional em pacientes infectados por cepas resistentes (Neuber, 2008). Além disso, a busca por produtos naturais está sendo foco de muitos estudos devido, principalmente, aos baixos custos na obtenção dessas substâncias (Tempone et al., 2005; Sülsen et al., 2007; Mishra et al., 2009). Outro aspecto importante é a utilização de formulações, como pomadas e emulsões, a fim de combater a LC de maneira menos invasiva, como por exemplo, a incorporação de medicamentos já utilizados no tratamento da leishmaniose (antimoniais,

anfortericina B) em lipossomas e nanopartículas, entre outros (Roy et al., 2012).

Além dos compostos sintéticos e o uso de carreadores que minimizam os efeitos colaterais, diversos estudos têm focado no desenvolvimento de novas drogas com efeito leishmanicida, como, por exemplo, bioprodutos provenientes de plantas e fungos, como alcalóides, flavonóides, metabólitos secundários, polissacarídeos, entre outros (Sen & Chatterjee, 2011; Alavi-Naini et al., 2012).

Desta forma, neste trabalho utilizamos um metabólito de fungo, o 5-hidroxi-2-hidroxi-2-metil- γ -pirona (HMP), também conhecido como ácido kójico, proveniente de fungos do gênero *Aspergillus*, para avaliar a sua ação leishmanicida. O HMP possui uma variedade de funções como inibidor de tirosinase (Chang et al., 2009), como cosmético para o tratamento de melasma (Lim et al., 1999; Mi Ha et al., 2007; Azzam et al., 2009), como antitumoral (Burdock et al., 2001; Tamura et al., 2006; Moto et al., 2006), entre outras. A ação sobre parasitos foi descrita em helminto, onde foi detectada a diminuição da produção de ovos de *Schistosoma mansoni* devido a inibição da enzima tirosinase 1 e 2 presentes nos vermes adultos (Fitzpatrick et al., 2007), entretanto a sua ação sobre protozoários não foi descrita na literatura.

Além disso, o nosso grupo demonstrou que o HMP é capaz de ativar macrófagos peritoneais de camundongos promovendo o aumento do espreado celular, formação de filopódios, alteração de componentes do citoesqueleto e aumento do índice fagocítico (Rodrigues et al., 2011). Assim, tendo em vista os resultados positivos obtidos *in vitro* sobre a célula hospedeira, o HMP parece ser promissor para utilização como tratamento para leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

1.2. LEISHMANIA SP.

1.2.1 Classificação

A leishmania é um parasita digenético e dimórfico pertencente ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophorea, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*.

Nos anos entre 1903 a 1950 as leishmanias eram classificadas baseando-se apenas nas manifestações clínicas causadas no homem e em características como espécies de vetores que transmitiam o parasita, distribuição geográfica, tropismo e propriedades antigênicas do parasita. Entretanto, atualmente características bioquímicas e moleculares também foram empregadas para a classificação taxonômica atual do parasito. O gênero *Leishmania* foi

descrito por Ross em 1903 sendo que a maioria dos membros são parasitas de mamíferos. Lainson & Shaw em 1987, dividiram o gênero em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, baseado na localização dos parasitas no intestino do vetor. E, finalmente, Rioux em 1990, utilizando a análise de isoenzimas, definiu os complexos atualmente existentes dentro de cada subgênero (revisado por Bañuls et al., 2007). Em conjunto, todas essas características, mas principalmente com o advento da biologia molecular, foi gerado um novo esquema de classificação taxonômica (Figura 1).

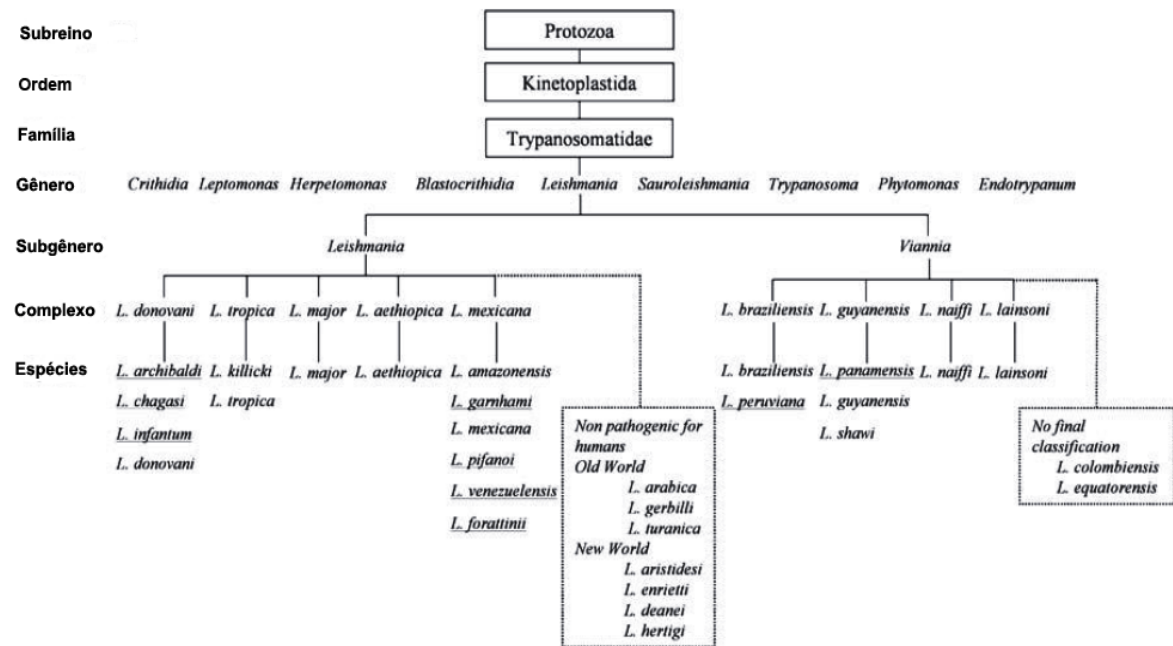


Figura 1. Taxonomia do parasita *Leishmania*.

Fonte: Bañuls et al., 2007 (com modificações).

Atualmente, são conhecidas 30 espécies de *Leishmania* e aproximadamente 20 causam doença em humanos em todo o mundo. Nas Américas, são conhecidas, 11 espécies dermatólicas de leishmania causadora de doença humana, sendo sete delas pertencentes ao subgênero *Viannia*: *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *L.* (V.) *guyanensis*, *Leishmania* (V.) *panamensis*, *L.* (V.) *lainsoni*, *L.* (V.) *naiffi*, *L.* (V.) *lindenbergi*, *L.* (V.) *shawi* e quatro delas pertencentes ao subgênero *Leishmania*: *Leishmania* (L.) *mexicana*, *L.* (L.) *amazonensis*, *Leishmania* (L.) *venezuelensis* e *Leishmania* (L.) *pifanoi*.

No Brasil foram identificadas sete espécies causadoras de leishmaniose cutânea, sendo que seis pertencem ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*. As espécies mais conhecidas são *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*, *L.* (V.) *guyanensis* e *L.* (L.) *amazonensis* e outras quatro espécies foram descritas mais recentemente nas regiões Norte e Nordeste, sendo elas: *L.* (V.) *lainsoni*, *L.* (V.) *naiffi*, *L.* (V.) *lindenbergi* e *L.* (V.) *shawi* (Revisado por Lainson, 2010).

1.2.2 Morfologia

A leishmania é um protozoário intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear e apresenta duas formas evolutivas: a forma promastigota (Figura 2A-B) e a forma amastigota (Figura 2 C-D).

As formas promastigotas medem entre 5-15 μm de comprimento, possuem um corpo celular fusiforme e alongado com flagelo externalizado na porção anterior. As formas promastigotas procíclicas são encontradas no intestino do vetor. Após o processo de multiplicação desencadeado no flebotomíneo, essas formas sofrem alterações bioquímicas, sendo chamadas de promastigotas metacíclicas. As promastigotas metacíclicas são encontradas na prosbócide do vetor e são as formas infectantes do parasita com alta capacidade de se desenvolver no hospedeiro vertebrado (Kaye & Scott, 2011).

As formas amastigotas são ovóides ou arredondadas, medindo cerca de 2-4 μm , apresentam o corpo celular arredondado e flagelo internalizado. São formas resistentes capazes de sobreviver no interior de células do sistema fagocítico, como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. No interior dessas células desenvolvem mecanismos de escape que promovem a sobrevivência do parasito e a progressão da doença (Thi et al., 2012).

Ambas as formas apresentam o flagelo emergindo da região anterior do parasita, chamada bolsa flagelar, bem como organelas específicas, como acidocalcisomos, glicossomos e uma organela especializada, chamada cinetoplasto, que é uma região com DNA altamente condensado na mitocôndria. O parasita também apresenta, logo abaixo da membrana celular, microtúbulos subpeliculares que têm como função determinar a distribuição de proteínas de membrana e outras moléculas. A região da bolsa flagelar não possui microtúbulos subpeliculares, sendo o local onde ocorrem os processos de exocitose e endocitose da leishmania (Vannier-Santos, et al., 2002).

Uma organela que está presente apenas em formas amastigotas de *Leishmania* é o megassomo, uma estrutura membranosa eletrondensas que pode variar de tamanho, aspecto e número. Essas estruturas podem desempenhar propriedades semelhantes às dos lisossomos, além de serem organelas ricas em cisteína proteinases que estão envolvidas na sobrevivência do parasito no interior da célula hospedeira (Ueda-Nakamura et al., 2001).

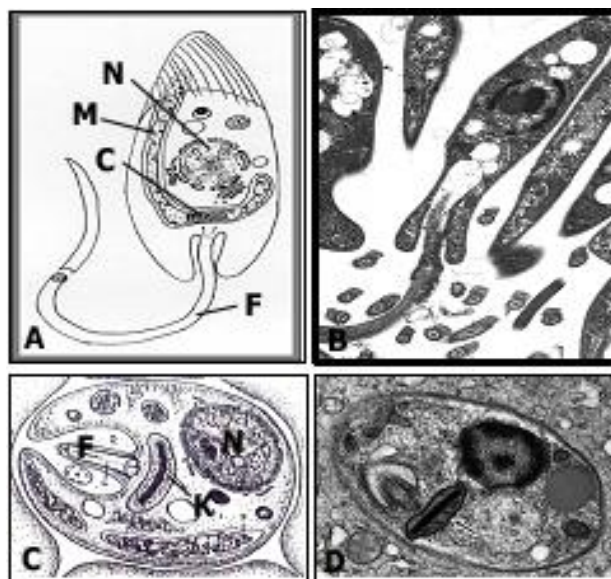


Figura 2. Formas evolutivas do parasita *Leishmania* spp.

Forma promastigota: A- desenho esquemático. B- Ultraestrutura de promastigotas de *L. braziliensis*. Forma amastigota: C- desenho esquemático. D- Ultraestrutura de amastigota *Leishmania* sp. Fonte: B- Cedida por Luis Henrique Farias, Laboratório de Biologia Estrutural, UFPA, 2007 e A, C e D - The Medical Journal of Australia, 2004. F-flagelo, C-cinetoplasto, M-mitocôndria, N-núcleo.

1.2.3 Ciclo evolutivo

O parasita *Leishmania* apresenta um ciclo evolutivo do tipo heteroxênico (Figura 3). O parasita é transmitido por flebotomíneos fêmea para o hospedeiro vertebrado, principalmente em regiões com áreas florestais. No intestino do vetor, as formas promastigotas procíclicas passam pelo processo de metaciclogênese, passando a ser infectante (metacíclicas) devido a alterações nos seus constituintes de membrana, gerando um denso glicocálix composto por várias moléculas ligadas a uma âncora de glicofosfoinositol (GPI), sendo o lipofosfoglicano (LPG) a molécula mais abundante. O LPG desempenha um papel importante no momento da adesão do parasita ao intestino do vetor, além de ser um dos principais fatores de virulência durante o processo de interação parasita-célula hospedeira (Kaye & Scott, 2011).

Durante o repasto sanguíneo, as formas metacíclicas são inoculadas na pele juntamente com a saliva do vetor. A saliva é necessária para o processo de infecção, pois auxilia na modulação da resposta imunológica local bem como a localização dos vasos sanguíneos e a vasodilatação (Ramalho-Ortigao et al., 2010). Após o repasto sanguíneo realizado pelo vetor, as promastigotas metacíclicas são reconhecidas na pele por células do sistema imune e passam, então, para o meio intracelular formando o vacúolo parasitóforo, onde por influência de enzimas, alterações do pH e temperatura sofrerão modificações morfológicas adquirindo a forma de amastigota (Serenio et al., 2007).

As amastigotas, no interior da célula hospedeira, possuem mecanismos capazes de burlar a resposta microbicida gerada pelo hospedeiro, bem como modular a resposta imunológica inata e sinalização celular (Kaye & Scott, 2011). Essa forma passa, então a ser capaz de se multiplicar no interior das células fagocíticas até a ruptura, passando a infectar novos macrófagos e outras células do sistema imune, além de também infectar novos vetores quando presentes no mesmo habitat do hospedeiro infectado (Bailey & Lockwood, 2007).

Quando as formas amastigotas são ingeridas pelo vetor, as células infectadas são destruídas por enzimas digestivas presentes no intestino do hospedeiro invertebrado. A partir da liberação das amastigotas no intestino, elas passam novamente a formas promastigotas que são capazes de aderir ao epitélio através de moléculas específicas, como o LPG. Após a adesão dessas formas no epitélio, o parasita passa a se multiplicar e, em seguida, migram para a região torácica do intestino, onde sofrerão o processo de metaciclogênese, tornando-se formas altamente infectantes, iniciando o ciclo quando ocorre um novo repasto sanguíneo (Ramalho-Ortigao et al., 2010).

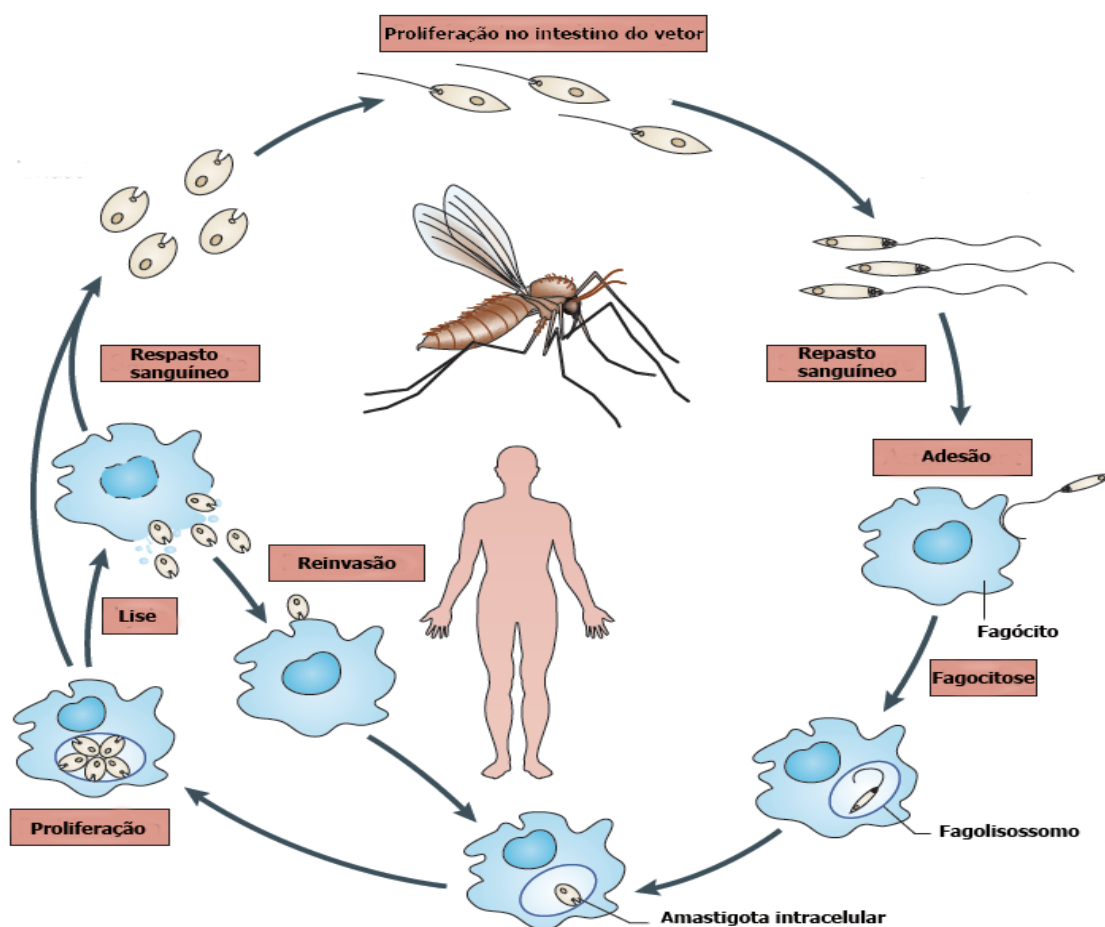


Figura 3. Ciclo evolutivo do parasita *Leishmania* spp.
Fonte: Kaye & Scott, 2011 (com modificações)

1.2.4. A interação parasita-hospedeiro vertebrado

O processo de infecção das Leishmanioses inicia-se após o repasto sanguíneo onde o vetor é capaz de transmitir formas promastigotas metacíclicas ao hospedeiro. Durante o repasto sanguíneo uma variedade de moléculas presentes na saliva do vetor é capaz de modular a resposta imunológica local bem como auxiliar a localização dos vasos sanguíneos e a vasodilatação (Kaye & Scott, 2011). Tais moléculas proporcionam o recrutamento de células do sistema fagocítico, como neutrófilos e macrófagos para o sítio de inoculação a fim de proporcionar a infecção destas células pelo parasita (Teixeira et al., 2005). Os parasitos quando inoculados na derme, ativam o sistema do complemento induzindo a morte das promastigotas, especialmente àquelas causadoras de LC. Entretanto, parasitos altamente infectivos, que sofreram a metaciclogênese – modificações morfológicas, fenotípicas e bioquímicas – que aumentam a virulência desses agentes, tornam os parasitos mais suscetíveis à fagocitose e aumentando a sobrevivência no interior da célula hospedeira (Assis et al., 2012).

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear. O processo de fagocitose requer uma interação entre receptores especializados na superfície de células fagocíticas e ligantes complementares na membrana da célula alvo. Os macrófagos, juntamente com os neutrófilos, são as principais “células fagocíticas profissionais” no organismo. A fagocitose das promastigotas de *Leishmania* ocorre através da ligação de moléculas do parasita – como, por exemplo, o lipofosfoglicano (LPG), glicoproteína 63 (GP63) e a fosfatidilserina (FS) – a receptores presentes na superfície dos macrófagos, desencadeando a formação prolongamentos citoplasmáticos para o processo de internalização do parasita e formação do fagossomo (Gruenheid & Finlay, 2003).

O LPG é determinante para progressão da infecção e também sobrevivência do parasito na célula hospedeira (Kavoosi et al., 2006). Sua presença na forma amastigota é capaz de atuar na inibição da fusão do lisossomo, além de causar alterações no retículo endoplasmático da célula hospedeira conferindo, assim, proteção contra degradação do parasito (Gueirard et al., 2008). Os açúcares contidos na própria molécula do LPG e na superfície de membrana das promastigotas também auxiliam a sua fagocitose pelas células hospedeiras que possuem receptores específicos, como as proteínas ligantes de manose e receptores de manose. Estudos recentes demonstraram que o tipo de açúcar presente na superfície de diferentes cepas de *L. braziliensis* varia e estão relacionados com as diferentes formas clínicas da doença causada por esta espécie (Farias et al., 2013).

A GP63 é um potente fator de virulência durante a interação com a célula hospedeira e também com o sistema do complemento, atuando diretamente sobre a proteína C3, inibindo a cascata imunológica (Joshi et al., 2002). Em formas amastigotas a GP63 protease possui ótima atividade em meio ácido, como dos fagolisossomos, sendo capaz de degradar as enzimas lisossomais (Cunningham et al., 2002). Além disso, a GP63 também foi capaz de inativar a iNOS de macrófagos infectados com *L. major* (Winberg et al., 2007).

A fosfatidilserina (FS) é um fosfolípido presente membrana plasmática das promastigotas e possui alta especificidade com receptores na superfície de macrófagos. Esta molécula também é encontrada na superfície de células apoptóticas, estimulando a atividade fagocítica do macrófago, porém inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, a reação inflamatória (Wanderley et al., 2006). A presença de parasitos apoptóticos no momento da interação faz com que os macrófagos fagocitem essas células que inibem a resposta microbida e aumentam, assim, a chance dos parasitos vivos de sobreviverem e proliferarem no interior da célula hospedeira (Van Zandbergen et al., 2006). Recentemente foi demonstrado pelo nosso grupo que a FS pode estar diretamente relacionada à forma clínica causada pela *L. braziliensis* (Farias et al., 2013).

As promastigotas metacíclicas apresentam uma capacidade de burlar os mecanismos microbicidas gerados pelas células do sistema fagocítico e atuam no mecanismo de escape realizado pelo parasita, como: resistência à ação lítica do sistema do complemento, adesão e entrada na célula hospedeira, proteção contra a ação proteolítica no interior dos vacúolos acídicos (Bogdan & Rölinghoff, 1999), indução da formação de redes extracelulares (NETs – *neutrophil extracellular traps*) em neutrófilos (Guimarães-Costa et al., 2009) e, ainda inibir a maturação fagolisossomal (Dermine et al., 2000). Durante o processo de inibição da fusão fagolisossomal, o LPG exerce um papel importante uma vez que ele é capaz de inserir-se na bicamada lipídica após a internalização do parasita fazendo com que haja uma desestruturação da membrana culminando com inibição da formação do complexo enzimático NADPH oxidase (Dermine et al., 2005; Lodge et al., 2006). A NADPH oxidase é um complexo enzimático com subunidades distribuídas pela membrana plasmática e pelo citosol. Após a ativação celular, as subunidades irão unir-se formando um complexo capaz de reduzir o oxigênio (O_2) em ânions superóxidos (O_2^-) (Robinson et al., 2004; Oliveira et al., 2006; Thi et al., 2012). Posteriormente, os O_2^- são convertidos em H_2O_2 espontaneamente ou por meio da enzima superóxido dismutase (SOD) (Oliveira et al., 2006). Além das espécies reativas de oxigênio, os macrófagos também produzem alguns radicais intermediários, principalmente óxido nítrico (NO), através da ativação enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). A iNOS é uma enzima que promove a conversão da arginina em NO e L-citrulina quando a célula

1.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS DURANTE O PROCESSO DE INFECÇÃO POR *LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS*

1.3.1 Aspectos epidemiológicos

As espécies causadoras de leishmaniose são comumente subdivididas em duas áreas de distribuição geográfica: espécies do novo mundo (Américas) e do velho mundo (África, Ásia e Europa). As espécies do subgênero *Viannia* foram isoladas no novo mundo, enquanto a maior parte das espécies do subgênero *Leishmania* foram isoladas no velho mundo (Bañuls et al., 2007).

As leishmanioses são um problema de saúde pública, atingindo 98 países em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), sendo registrados por volta de 2 milhões de casos anualmente. É considerada pela OMS, como uma das seis doenças infecciosas mais importantes, devido ao alto coeficiente de detecção, capacidade de produzir deformidades e a ocorrência de 20.000 a 40.000 mortes por ano, nos casos de leishmaniose visceral

Podem apresentar variadas manifestações clínicas, que se classificam dentro de duas categorias amplas: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). Nas Américas há uma ampla distribuição de casos que são causados por espécies distintas de *Leishmania*. Cerca de 60.000 novos casos de LT são registrados na América do Sul e Central, sendo que 79% destes casos ocorrem no Brasil, Peru e Colômbia. Já em relação à LV foram registrados cerca de 4.000 novos casos por ano, sendo que desses, 7-22% foram letais (WHO, 2010).

O ciclo deste parasito está associado a vários ambientes. No Brasil, por exemplo, a maioria dos ciclos evolutivos do parasita ocorre em áreas de floresta primária. Entretanto, o perfil da leishmaniose vem mudando devido, principalmente, à expansão humana para áreas endêmicas florestais, de uma zoonose transmitida acidentalmente ao homem para uma doença de caráter rural-urbana e até mesmo urbana em algumas regiões do país.

Devido à expansão de cidades e áreas de exploração de madeira e minério houve um aumento nos registros de casos de LTA nos últimos anos (Chagas et al., 2006). No Brasil, foram registrados 21.961 novos casos em 2010, sendo que a maior parte dos casos ocorreu nas regiões Nordeste e Norte (73%) e o estado do Pará contribuiu com cerca de 30% dos casos ocorridos na região Norte (BRASIL, 2011 em Sinan/SVS/MS http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf).

1.3.2 Aspectos clínicos e imunológicos

A LC ou LTA, no Brasil é causada por diferentes espécies como *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, entre outras.

A LC é causada pela infecção de macrófagos da derme que podem resultar numa intensa resposta inflamatória e lesão tecidual da pele. Essa doença pode apresentar diferentes perfis clínicos, desde lesões que se curam espontaneamente em alguns meses, até lesões que desenvolvem intensas respostas imunológicas causando deformações nas mucosas, como é o caso das leishmanioses mucocutâneas (LMC). As diferentes respostas desenvolvidas por diferentes espécies de parasitos estão relacionadas ao perfil imunogenético do hospedeiro, a interação deste com o parasita e também com as espécies e cepas do parasita. Tais fatores irão determinar o tempo de desenvolvimento da lesão e o processo de cura da infecção (Pires et al., 2012; Nylén & Eidsmo, 2012).

As Leishmanioses podem ser divididas em dois pólos principais segundo a geração de uma resposta imunológica, um pólo hiperreativo, que é causado por parasitos do subgênero *Viannia*, que em como principal característica a predominância de uma resposta do tipo Th1, e um pólo hiporeativo, que é causado pelo subgênero *Leishmania*, que tem uma resposta predominantemente Th2 (Silveira et al., 2004). De acordo com as respostas imunes geradas pelo hospedeiro frente à infecção, bem como as espécies do parasita, pode-se dividir as LC em 4 formas clínicas distintas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD), leishmaniose mucocutânea (LMC) e uma forma que surge a partir de uma infecção causadora de leishmaniose visceral, que é chamada de leishmaniose cutânea pós-kalazar (LCPK) (Nylén & Eidsmo, 2012).

A infecção pelo parasita *Leishmania* resulta em um intenso remodelamento do tecido, e as LC geradas são resultado de uma infecção crônica da pele. Durante a LCL (com lesões ulceradas) geralmente apresenta um granuloma típico com intenso infiltrado linfocitário, especialmente do tipo CD4. Os neutrófilos surgem posteriormente próximos à camada de queratinócitos do epitélio e podem estar envolvidos no processo de destruição do tecido (Figura 5-LCL ulcerado). Nas infecções causadoras da LMC apresenta uma resposta imune intensa que medeia a destruição do tecido, sendo os parasitas escassos na lesão. Devido aos altos níveis de TNF- α e INF- γ estão diretamente relacionadas à destruição tecidual e com a patologia (Figura 5-LMC). Durante a LCAD ocorrerá o surgimento de vários nódulos não ulcerados, com intenso infiltrado de macrófagos com grande número de amastigotas no interior de vacúolos (Figura 5-LCAD). E por fim, a LCPK, que surge como consequência da

leishmaniose visceral, irá gerar lesões não ulceradas e um intenso infiltrado linfocitário, que pode variar dependendo da região de infecção. Geralmente na África há predominância de linfócitos CD4 enquanto que na Índia os predomina a presença de linfócitos CD8 (Figura 5-LCPK) (Nylén & Eidsmo, 2012)

A resposta imunológica gerada pelo hospedeiro devido à presença de diferentes espécies de *Leishmania* apresenta similaridades, entretanto há diferenças na resposta imune local. A *L. amazonensis* é o agente etiológico causador de leishmanioses dermatrópicas, apresentando como principais formas clínicas a leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD) e uma forma intermediária, denominada leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB) (Silveira et al., 2004).

A LCL é caracterizada por uma lesão ulcerada única ou múltipla. É a forma clínica mais freqüente da doença tendo como agente qualquer espécie de *Leishmania* que ocorra nas Américas (Pires et al., 2012). A LCL causada por *L. (L.) amazonensis* apresenta uma lesão característica e facilmente distinguível de outras espécies por apresentar um elevado infiltrado de macrófagos intensamente vacuolizados e repletos de amastigotas, dando uma aparência de granuloma. Em relação à resposta imunológica, a LCL pode apresentar um perfil de linfócitos T CD4 e CD8 e ainda a presença de citocinas como INF- γ e IL-4. A predominância de células T CD4 e da resposta Th1 promoverá a resistência do paciente à infecção enquanto que a predominância de células T CD8 e o perfil Th2 estão relacionados à suscetibilidade do paciente. Pacientes que desenvolvem um equilíbrio entre as respostas Th1/Th2 são capazes de se curar espontaneamente (Silveira et al., 2004).

Por outro lado, pacientes que desenvolvem aspectos clínicos da LCAD apresentam lesões nodulares, geralmente, não ulceradas, e distribuídas por toda extensão do corpo ou membro (Figura 5a). Além disso, têm uma resposta predominantemente do tipo Th2, ou seja, produção de anticorpos, com baixas concentrações de IL-12 e INF- γ e concentrações séricas elevadas de IL-10, IL-4 e IL-5 (Reithinger et al., 2007). Essas últimas citocinas favorecem o desenvolvimento do parasita, enquanto a diminuição de IL-12 e INF- γ reduzem o recrutamento das células de defesa ativadas (Gomes-Silva et al., 2007, Silveira, 2009). O parasita também é capaz de reduzir a produção de NO e radicais de oxigênio, bem como reduzir a presença do receptor de quimiocina CCR5, responsável pelo recrutamento das células de defesa do tipo Th1 (Campanelli et al, 2010). A produção de IL-10 em macrófagos infectados por *Leishmania*, geralmente está envolvida com a suscetibilidade e progressão da doença (Tripathi et al., 2007).

Há evidências de que a *L. amazonensis* tem uma capacidade particular de interferir negativamente em vários mecanismos imunológicos necessários para a produção de uma resposta imune efetiva (Pinheiro, 2004, Silveira et al., 2009). A elevada produção de IL-10 e baixa produção de INF- γ durante o processo de infecção pela *L. amazonensis* culminará com a inibição da enzima iNOS e diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) fundamentais no processo de morte das formas amastigotas, fazendo com que o parasita seja capaz de se desenvolver no hospedeiro (Figura 6b) (Mukbel et al., 2007; Van Assche et al., 2011).

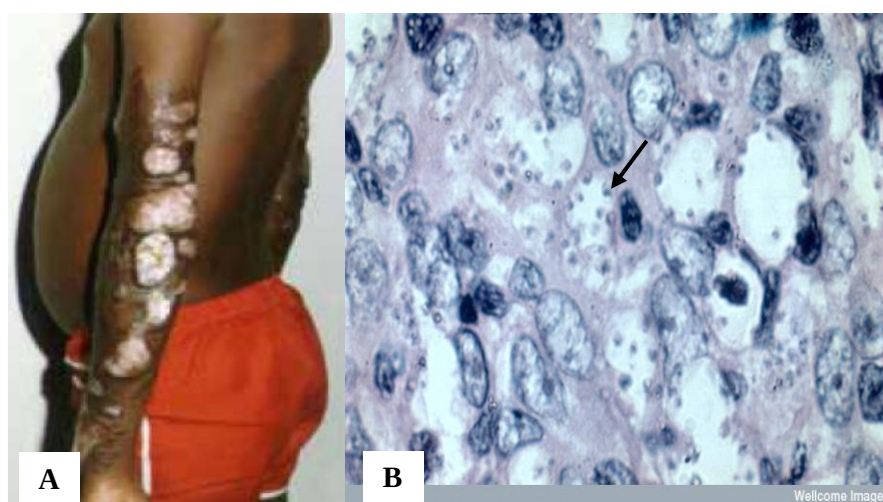


Figura 6. Leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD)

A. Paciente com LCAD apresentando lesões nodulares. **B.** Histopatologia da biópsia da lesão de pacientes com LCAD, demonstrando muitos vacúolos repletos de amastigotas (seta). Fonte: **A**-Silveira et al. 2005; **B**-Wellcome images: W0003420. Disponível em: http://images.wellcome.ac.uk/indexplus/obf_images/35/64/dcebd5017ebb12aabad520db1ca0.jpg

O paraista *L. amazonensis* também é capaz de causar uma forma intermediária da doença, a LCDB, que apresenta placas eritematosas infiltradas, onde a disseminação da doença só ocorre a partir de 6 meses após o surgimento da lesão primária, sendo o número de lesões secundárias limitadas. A resposta imune é intensa, mas incompleta, devido à inibição de mecanismos da resposta imune celular, sendo reativada após terapia com antimoniais. As lesões de LCDB são caracterizadas pela presença de macrófagos intensamente vacuolizados contendo uma quantidade moderada de amastigotas e menor quando comparadas às lesões de LCAD. Os macrófagos infectados geralmente apresentam linfócitos e células plasmáticas em seu redor (Silveira et al., 2005).

1.3.3 A infecção por *Leishmania* e o processo de cicatrização

A pele é um órgão que serve como barreira contra infecções, mas também como importante órgão imunológico, uma vez que possui células que são capazes de detectar e atuar contra agentes infecciosos. As lesões na epiderme podem ser causadas por processos mecânicos, bem como por determinados agentes infecciosos, como o parasita *Leishmania*.

O parasita quando entra em contato com a pele, inicialmente promove o recrutamento de neutrófilos, enquanto que monócitos/macrófagos, que são as células hospedeiras da *Leishmania*, são a segunda linha de defesa (Nylén & Eidsmo, 2012).

Durante a LC existem fatores inerentes ao parasita que são capazes de alterar o processo de cicatrização. A *Leishmania* é capaz de produzir proteases que destroem tanto proteínas da matrix extracelular (MEC) quanto barreiras da derme para que haja a propagação da infecção. Além disso, já foi demonstrado em modelo experimental que o aumento da quantidade de colágeno tipo III, em relação ao colágeno tipo I, em animais infectados está diretamente relacionado ao sucesso do parasitismo, uma vez que o tipo III promove a sustentação de células inflamatórias, como, por exemplo, histiócitos vacuolizados e parasitados (Abreu-Silva et al. 2004, Silva-Almeida et al., 2012).

Pacientes resistentes à LC e que desenvolvem uma resposta imunológica efetiva, são capazes de promover uma rápida cicatrização enquanto aqueles que são suscetíveis desenvolvem a cronicidade da doença (Pirmez et al., 1993). Sakthianandeswaren et al. (2005) demonstraram que o processo de cicatrização é extremamente importante para uma cura rápida de LC causada por *L. major* e está diretamente envolvida na resistência à LC.

O processo de cicatrização geralmente ocorre através de uma resposta complexa à lesão tecidual promovendo alterações locais e sistêmicas. Durante a cicatrização ocorre o envolvimento de uma população variada de células, da presença de MEC e da ação de mediadores como citocinas e fatores de crescimento (Velnar et al., 2009).

Este processo ocorre em quatro fases: 1-coagulação e hemostasia; 2-inflamação; 3-proliferação e 4-remodelação da MEC. Logo após a lesão (Figura 7a) inicia-se a coagulação e a hemostasia no local (Figura 7b). Este processo ajudará a proteger o sistema vascular evitando a perda de sangue. O processo de homeostase é iniciado com a deposição de uma cobertura primária de fibrina proporcionando um ambiente transitório para as plaquetas que irão secretar fatores de crescimento, citocinas e MEC. Estes mediadores auxiliarão a etapa seguinte do processo de cicatrização – a inflamação – recrutando neutrófilos e macrófagos para o local da lesão (Santoro & Gaudino, 2005). A fase inflamatória tem o papel de estabelecer uma barreira imune contra a invasão de microorganismos e é subdividida em fase

inflamatória inicial (Figura 7c) e tardia (Figura 7d) (Nurden, 2011). Na fase inicial da inflamação (após 24-36h) é predominante a presença de neutrófilos que irão fagocitar e destruir bactérias, partículas e tecido danificado. O recrutamento dos neutrófilos é essencial, pois a presença de bactérias impedirá o processo de cicatrização. Os neutrófilos produzem citocinas, como TGF- β , bem como quimiocinas. Durante a fase tardia da inflamação (após 48-72h), os macrófagos são as células predominantes e continuam o processo de fagocitose. Estas células são potentes reservatórios de fatores de crescimento e importantes mediadores, como fator de crescimento epidermal, fator de crescimento de fibroblastos que irão promover a ativação de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais. A ausência de monócitos/macrófagos no local da lesão não permitirá o recrutamento destas células retardando o processo de cicatrização (Baum et al., 2005). Ao final da fase tardia da inflamação haverá a produção IL-1, citocina necessária para a regulação da collagenase e produção de matrix extracelular.

Após a conclusão do processo de homeostase e da produção de uma resposta imunológica local, a fase proliferativa (Figura 7e) é iniciada após 72h. É caracterizada pela migração de fibroblastos e deposição da MEC sintetizada substituindo a rede inicial formada por fibrina e fibronectina. Os fibroblastos desempenham papel fundamental na produção de colágeno que irão atuar como sustentação para a MEC. A derme sem lesão possui cerca de 80% de colágeno tipo I e 25% de colágeno tipo III, enquanto que a derme com tecido granulomatoso expressa 40% de colágeno tipo III (Robson et al., 2001).

Em seguida à produção de colágeno ocorrerá a última fase, o processo de remodelamento (Figura 7f) desse tecido, onde haverá o desenvolvimento de um novo epitélio e a formação da cicatriz. As metaloproteinases, produzidas por macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, são as principais enzimas responsáveis pelo remodelamento do tecido. O processo de remodelamento ocorre principalmente na disposição das fibras de colágeno, que inicialmente, estão desorganizadas e se tornam orientadas e interligadas com o passar do tempo (Nurden, 2011). Ocorrerá também a contração do tecido por meio de processos apoptóticos diminuindo o número de células no local e o tecido granulomatoso (Greenhalgh, 1998).

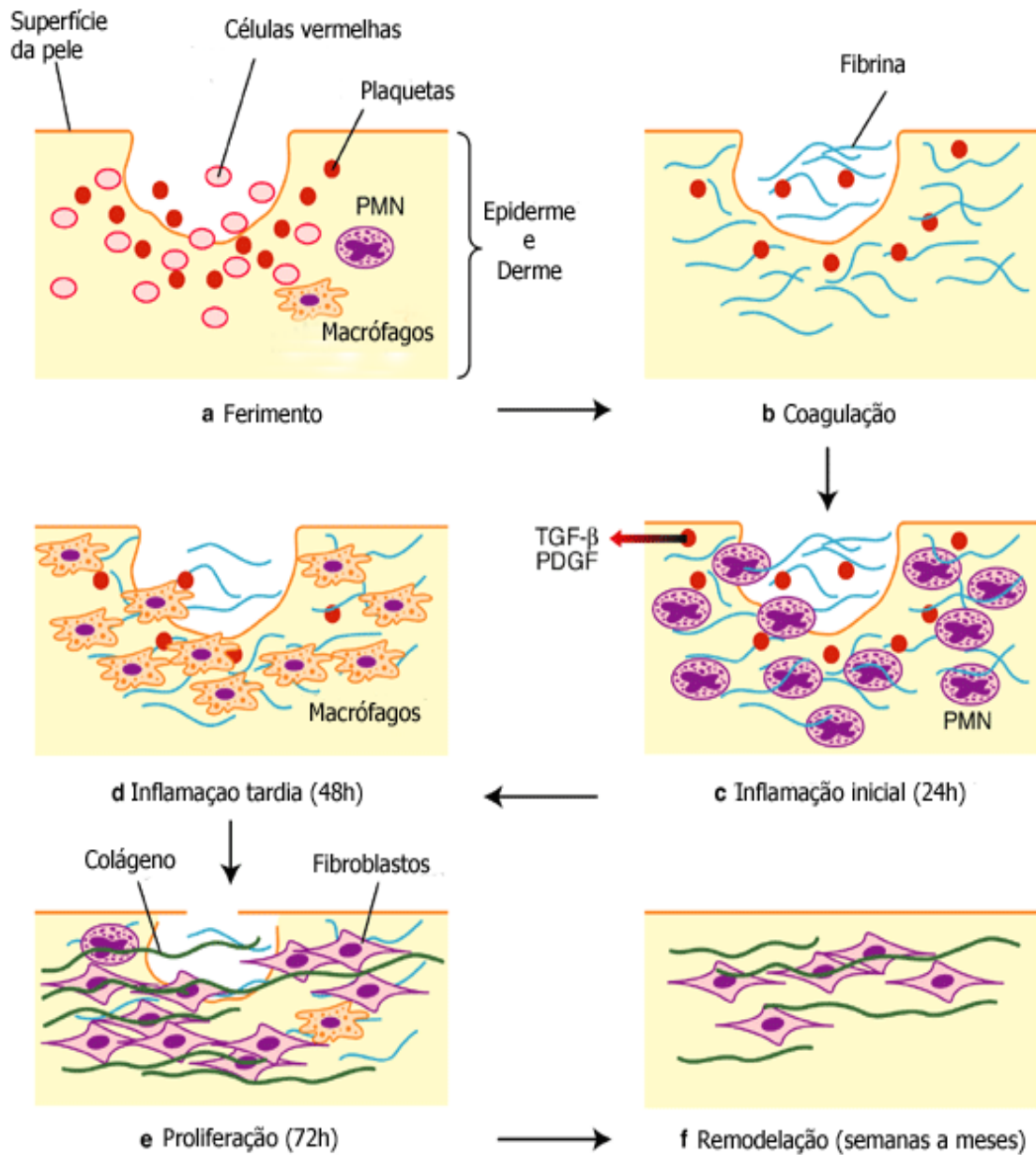


Figura 7. Desenho esquemático do processo de cicatrização da pele
 Fonte: Beanes et al., 2003 (com modificações).

1.4. TRATAMENTO

1.4.1 Modelos experimentais de leishmaniose tegumentar para testes de novos fármacos

O estudo da LT pode ser realizado em uma grande variedade de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, uma vez que esses modelos conseguem mimetizar bem respostas celulares, moleculares e imunológicas fornecendo informações importantes para testes com novas drogas (Passero et al., 2011).

Estudos *in vitro*, geralmente se iniciam com a utilização drogas sobre formas promastigotas em culturas axênicas, o que permite a contagem do número de parasitos viáveis através do acompanhamento da curva de crescimento durante o período de tratamento. O acompanhamento da curva de crescimento é o teste mais utilizado para realização do *screening* e IC50 da droga testada, por ser um teste rápido, simples e barato. Entretanto, variações utilizando testes mais específicos e complexos também podem ser realizados, como por exemplo, a utilização de marcadores de apoptose e análise da ultraestrutura do parasita para determinação de possíveis mecanismos de ação (Fumarola et al., 2004; Sereno et al., 2007).

Outro modelo amplamente utilizado *in vitro* é a ação de novas drogas sobre amastigotas intracelulares, utilizando como célula hospedeira, macrófagos peritoneais, macrófagos derivados de monócitos humanos e/ou linhagens secundárias de macrófagos, como por exemplo, J774.1. A utilização deste modelo permite que seja avaliado o potencial da droga testada sobre as formas que serão encontradas no hospedeiro vertebrado. O número de parasitos é determinado através da contagem, em microscopia óptica, do percentual de macrófagos infectados e/ou o número de amastigotas por macrófago. Além do número de parasitos, este modelo também é amplamente utilizado para determinar do padrão de resposta imunológica gerado pelo tratamento e também para analisar possíveis mecanismos de ação da droga (Moura et al., 2011).

Apesar dos testes envolvendo as formas promastigotas serem de rápida execução, estes demonstram que ocorrem diferenças no que diz respeito à suscetibilidade desta forma em relação à forma amastigota. Tal fato ocorre principalmente devido ao fato de existirem diferenças bioquímicas entre as formas. Os testes envolvendo formas amastigotas parecem ser mais efetivos para determinar a toxicidade de novas moléculas e/ou drogas que venham a ser promissoras para utilização como medicamento no tratamento da Leishmaniose (Croft et al., 2006).

Além de modelos *in vitro*, modelos experimentais utilizando animais têm sido

amplamente desenvolvidos com intuito de possibilitar a análise da patogenia, resposta imunológica, imunomodulação gerada pela droga e avaliação de novos candidatos a fármacos no tratamento das Leishmanioses. Os modelos animais mais utilizados são roedores, especialmente *hamsters* e camundongos de diversas linhagens. Apesar destes modelos não refletirem fielmente todos os aspectos da doença que ocorre naturalmente em humanos, eles são capazes de proporcionar informações importantes no que diz respeito à resposta do hospedeiro e do parasita ao tratamento (Passero et al., 2011).

1.4.2 Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses

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

O principal tratamento recomendado pela OMS ainda é o antimonial pentavalente, que pode ser administrado por via parenteral ou oral. Entretanto, algumas espécies de *Leishmania* apresentam resistência aos antimoniais devido ao tratamento com doses elevadas deste medicamento (Palumbo, 2009; Ashutosh et al., 2007). Muitos estudos realizados para demonstrar a dose correta para administração dos antimoniais apresentaram resultados inconclusivos e insatisfatórios, uma vez que a dose administrada e a via de administração escolhida variam de acordo com a espécie, forma clínica e resposta do paciente (Ameen, 2007). Reinthinger et al., (2007) observaram que os antimoniais administrados via parenteral são eficientes contra LCL causada por *L. braziliensis*, *L. major* e *L. tropica*. Porém, tal administração não demonstrou eficácia contra LMC causada por *L. braziliensis* (Bailey et al., 2007). Além da resistência dos parasitos, os antimoniais apresentam variados efeitos adversos como: elevação dos níveis de transaminases séricas, reações dérmicas locais, anorexia, náuseas e vômitos, tendo ainda seu uso contra indicado durante a gravidez e em pacientes diabéticos (Pinheiro, 2004).

As drogas de segunda escolha são as anfotericinas e pentamidinas, geralmente administradas em pacientes que não respondem ao tratamento com antimoniais ou que possuem alguma restrição ao seu uso (WHO, 2009). A anfotericina é um antibiótico que possui atividade seletiva tanto sobre *Leishmania* quanto em *Trypanosoma* devido à sua alta afinidade ao ergosterol, esterol presente apenas nesses parasitos e ausentes nas células hospedeiras. Devido ao seu uso por 30 anos no tratamento de micoses, a resistência causada pela anfotericina também torna o tratamento inadequado, principalmente em pacientes co-

infectados com HIV (Croft & Oliaro, 2011). Por outro lado, as pentamidinas têm apresentado eficiência contra algumas espécies de Leishmanias do Novo Mundo como *L. panamensis* e *L. guyanensis* (Bailey et al., 2007), além da eficácia no tratamento de LV. Sua ação parece estar relacionada com a inibição da biossíntese de poliaminas e alterações na membrana mitocondrial (Croft et al., 2006). Entretanto, ambas as drogas apresentam dificuldade no modo de administração (infusão - anfotericina ou intramuscular profunda - pentamidinas) (Saldanha et al., 2009) e um potencial tóxico elevado, apresentando como principais efeitos adversos anorexia, insuficiência renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas (BRASIL, 2010).

Atualmente, análogos de lipofosfolipídios, como a miltefosina, edelfosina e ilmofofina estão sendo usadas como tratamento oral contra leishmaniose, demonstrando bastante eficácia e tolerabilidade (Ameen, 2007). A miltefosina foi desenvolvida para o combate ao câncer por atuar induzindo apoptose em células tumorais (Van Griensven & Diro, 2012). Essas substâncias demonstraram eficácia *in vitro* contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. donovani*, causadora de LV (Santa-Rita et al., 2004; Paris et al., 2004). Os tratamentos com miltefosina já estão na fase quatro de testes que envolvem seres humanos e têm demonstrado resultados satisfatórios quando é realizado tratamento por períodos de 1 a 3 meses (Rahman et al., 2011; Dorlo et al., 2012).

Com o advento da tecnologia de nanodrogas, como a produção de lipossomas contendo anfotericina e miltefosina e/ou nanopartículas acopladas com primaquina e anfotericina, diversos destes medicamentos têm sido reformulados com a intenção de reduzir a dosagem e, conseqüentemente os efeitos adversos causados por drogas já utilizadas há décadas (Palumbo, 2009; Roy et al., 2012). Além disso, formulações em forma de cremes/pomadas para uso tópico utilizando paromomicina e imiquimode foram testadas em pacientes infectados com obtenção de cura variável (Alavi-Naini et al., 2012; Salah et al., 2013).

1.4.3 Tratamento experimental das leishmanioses

Atualmente, no que diz respeito ao tratamento das leishmanioses, a busca e o desenvolvimento de novas moléculas que sejam menos tóxicas, invasivas e de baixo custo é constante. Desta forma, uma grande variedade de óleos e extratos de plantas utilizadas popularmente são objetos de estudos, principalmente oriundos da região Amazônica, devido à grande biodiversidade natural (Braga et al., 2007).

Diversos fitoconstituintes apresentam efeito anti-leishmania tanto sobre formas

amastigotas como formas promastigotas (Sen & Chatterjee, 2011). As chalconas foram capazes de induzir alterações ultraestruturais na mitocôndria causando inibição das desidrogenases mitocondriais, bem como é capaz de ativar a produção de radicais de oxigênio da célula hospedeira no combate às formas amastigotas (Zhai et al., 1999; Kayser & Kiderlen, 2001). Por outro lado, os flavonóides, que estão presentes em grande diversidade de plantas, foram capazes de inibir a síntese de DNA através da inibição de topoisomerase II (Mitra et al., 2000). Extratos ricos em flavonóides também foram capazes de desempenhar ação anti-leishmania, através da ativação da célula hospedeira por meio do aumento da produção de óxido nítrico e INF- γ (Gomes et al., 2010). Outro grupo de moléculas, os alcalóides, tem como alvo várias enzimas mitocondriais de amastigotas, sendo capaz de induzir apoptose destas formas por um mecanismo independente da via das caspases. Neutrófilos infectados e tratados com alcalóides foram capazes de gerar intensa produção de radicais de oxigênio culminando com a diminuição do número de parasitas (Saha et al., 2011).

Outros compostos descritos na literatura com ação leishmanicida são metabólitos e substâncias produzidas e/ou provenientes de fungos. Metabólitos isolados de fungos *Nigrospora sphaerica*, *Hypocrella banbusa*, *Merulius incarnates* apresentaram ser efetivos contra promastigotas e amastigotas de várias espécies de *Leishmania* (Kayser et al., 2001; MA et al., 2004; Jin & Zjawiony, 2006). Valinomicina e estaurosporina, metabólitos provenientes do fungo *Streptomyces* sp., também têm ação leishmanicida, entretanto demonstraram relativa citotoxicidade para macrófagos J774.1 e células epiteliais (Pimentel-Elardo et al., 2010). Por outro lado, o extrato aquoso obtido a partir do fungo *Agaricus blazei* promoveu efeito leishmanicida dose dependente em espécies como *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* sendo este efeito mais intenso sobre as formas promastigotas. O extrato também foi capaz de induzir a produção de NO sem efeito citotóxico sobre a célula hospedeira (Valadares et al., 2011).

Sendo assim, compostos/substâncias/metabólitos extraídos de microorganismos e/ou plantas representam importante fonte na busca de novas drogas que possam ser utilizadas no desenvolvimento de novas terapias no combate à leishmaniose.

1.5 O ÁCIDO KÓJICO

O ácido kójico (AK) ou 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona (HMP) (Figura 8), é um metabólito aquoso produzido por vários microorganismos, especialmente fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Acetobacter* e *Penicillium*. É uma substância cristalina altamente solúvel em água, etanol e acetona (Gomes et al., 2001).

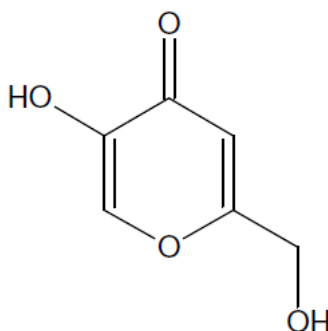


Figura 8. Estrutura química do ácido kójico, 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona.

O HMP possui variedade de aplicações, sendo utilizado, principalmente, como inibidor de tirosinase (Chang et al., 2009), agente antioxidante (Niwa & Akamatsu, 1991; Gomes et al., 2001), como aditivo em alimentos (Burdock et al., 2001; Blumenthal et al., 2004; Bentley et al., 2006), cosmético (Nohynek et al., 2004; Lin et al., 2007) como tratamento de melasma (Lim et al., 1999; Mi Ha et al., 2007, Azzam et al., 2009), como antitumoral (Burdock et al., 2001; Tamura et al., 2006; Moto et al., 2006), e ainda como agente radioprotetor (Emami et al., 2007; Hosseinimehr et al., 2009).

Como agente antioxidante foi observado que o HMP diminuiu significativamente a quantidade de ROS em sobrenadante de cultivo de neutrófilos, entretanto, houve uma potencialização da produção intrínseca desses radicais, possivelmente através da enzima NADPH oxidase. Além disso, os neutrófilos tratados com HMP também demonstraram aumento da quantidade de Ca^{++} intracelular, íon envolvido na produção de mediadores inflamatórios e ativação celular (Niwa & Akamatsu, 1991). Gomes et al. (2001) demonstraram a capacidade do HMP em capturar ROS ($\text{OH}^\cdot$, $\text{O}_2^\cdot$, O_2) em tampão fosfato. O HMP foi ineficaz apenas para o radical H_2O_2 . Seu papel antioxidante também foi observado quando o HMP é adicionado em alimentos para preservação por mais tempo de verduras, frutas e legumes (Burdok et al., 2001). O nosso grupo demonstrou recentemente que o HMP é capaz de promover a ativação de neutrófilos provenientes de sangue periférico, observado devido a produção de ROS (Frade et al., 2012). Além disso, também foi demonstrado que o HMP induz o processo de diferenciação de monócitos humanos provenientes de sangue

periférico em macrófagos ativados (Costa et al., 2012).

Outra aplicação para este metabólito é a utilização no tratamento de tumores. Fickova et al. (2008) demonstraram que derivados do HMP contendo selênio são eficazes na atividade antiproliferativa em células de carcinoma de pele e mama, não sendo observado efeito citotóxico. Além disso, o HMP não apresenta efeitos promotores do desenvolvimento de carcinogênese no fígado (Moto et al., 2006), na tireóide (Tamura et al., 2006) e na pele (Higa et al., 2007).

Uma das aplicações mais comuns do HMP é a sua utilização como cosmético. Nohynek et al. (2004) demonstraram não haver indícios de genotoxicidade ou toxicidade em consumidores de cosméticos a base de HMP. Pomadas e cremes são amplamente utilizados como clareadores para pele (Lin et al., 2007). O uso do HMP como clareador deve-se ao fato deste metabólito ser um potente inibidor da tirosinase, enzima fundamental para produção de melanina (Mi Ha et al., 2007). A tirosinase é uma enzima que converte a tirosina em L-dopamina, precursor de pigmentos da pele (Bentley et al., 2006). O HMP demonstrou ser tão eficaz quanto à hidroquinona na redução do pigmento formado pelo melasma (Lim et al., 1999).

Outras aplicações recentes desse metabólito são: o uso como radioprotetor contra irradiação- γ , que está relacionada com a formação de complexos com manganês e zinco, que passam a possuir grande estabilidade hidrolítica, tornando-se altamente lipofílicos (Emami et al., 2007; Hosseinimehr et al., 2009); e a propriedade do HMP na formação de complexos com metais que está diretamente relacionado à indução do processo de cicatrização em camundongos tratados (Mohammadpour et al., 2012).

Por outro lado, a ação do HMP sobre parasitas foi demonstrada apenas em um trabalho na literatura, onde foi observada diminuição na produção de ovos de *Schistosoma mansoni* devido a inibição da enzima tirosinase 1 e 2 presentes nos vermes adultos (Fitzpatrick et al., 2007). Entretanto, não existem trabalhos na literatura sobre a ação do HMP em protozoários, durante a interação com a célula hospedeira ou como tratamento tópico durante infecção experimental de animais com *Leishmania amazonensis*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito do metabólito 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona (HMP) durante a infecção por *Leishmania (L.) amazonensis*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a atividade do HMP sobre formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis in vitro*;
2. Avaliar os efeitos do HMP sobre a morfologia de formas promastigotas e amastigotas presentes em macrófagos infectados e tratados com HMP;
3. Determinar a resposta microbicida de macrófagos infectados e tratados com HMP;
4. Determinar a atuação do tratamento tópico sobre animais infectados com *Leishmania amazonensis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO METABÓLITO 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL-GAMA-PIRONA (HMP) E PRODUÇÃO DA POMADA

O HMP foi obtido, isolado e purificado por método biotecnológico descrito por Ferreira et al., (2010). A pomada foi produzida utilizando como base triacilgliceróis provenientes de sementes da planta *Theobroma glandiflorum* (cupuaçu). Posteriormente, a base foi aquecida e o HMP foi adicionado.

3.2 ENSAIOS *IN VITRO*

3.2.1 Cultivo e manutenção do parasita

As formas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) foram obtidas em meio NNN provenientes do Programa de leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, e mantidas em meio RPMI 1640, suplementado com soro bovino fetal (SBF) em estufa B.O.D (*Biological Oxygen Demand*) à 27°C.

3.2.2 Obtenção e cultivo da célula hospedeira

Macrófagos peritoneais foram obtidos a partir de camundongos albinos Balb/c (*Mus musculus*) com 5-8 semanas de vida, pesando entre 20-30g. Os animais foram anestesiados e sacrificados para a coleta dos macrófagos, feita através de lavagem da cavidade peritoneal com solução de Hanks estéril, utilizando seringa e agulhas estéreis. O material aspirado foi concentrado por centrifugação a 600 G durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C. O sedimento foi ressuspenso em meio de cultura sem soro. A contagem das células foi feita em Câmara de Neubauer e a concentração ajustada de acordo com o número de células utilizadas em cada experimento. Os macrófagos foram então transferidos para placas de cultura de 24 poços ou garrafas de cultura e incubados a 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂, durante uma hora para adesão. Após esse período foi feita uma lavagem com solução salina de fosfato estéril (PBS) pH 7.2, para remoção de células que não aderiram, e em seguida adicionado meio DMEM suplementado com 10% de SBF. As células foram, então, mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Os animais foram sacrificados de acordo com as normas do Comitê de Ética (processo nº BIO001-09 CEPAE/ICB/UFPA-

Anexo I).

3.2.3 Interação parasita-célula hospedeira

Para determinação do índice de infecção de macrófagos tratados com HMP, estas células foram cultivadas como descrito no item 3.2.2, seguido da interação com promastigotas na fase estacionária de crescimento numa proporção de (1:10) durante 2 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e os macrófagos lavados com PBS, pH 7.2, por três vezes, para retirar as leishmanias não internalizadas. Posteriormente à infecção, os macrófagos foram tratados por 1 hora ou por 1h durante 3 dias. Após o tratamento, o sobrenadante foi retirado e as lamínulas lavadas com PBS. Em seguida, as células foram fixadas, desidratadas e coradas como descrito no Anexo I. Foram contados 100 macrófagos por lamínula e o índice de infecção foi obtido calculando-se a porcentagem de células que endocitaram e a média de parasitas por células.

3.2.4 Análise ultraestrutural de promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com HMP

As alterações ultraestruturais causadas pelo HMP sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi determinado seguindo protocolo descrito abaixo:

a. Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com HMP.

Parasitos em fase exponencial de crescimento (4º dia de cultivo) foram utilizados para os testes com a droga. Os parasitos foram adicionados às garrafas de cultura em uma concentração de 1×10^6 parasitos por mL. O metabólito foi adicionado na concentração de 50 µg/mL no primeiro dia de cultivo e após quatro dias de tratamento as promastigotas foram processadas para MET. Os parasitos foram centrifugados e o pellet obtido foi lavado com PBS, seguido da fixação com 2,5% de glutaraldeído, 4% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1M por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com tampão cacodilato e pós-fixadas em solução contendo 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferrociano de potássio por 30 minutos ao abrigo de luz e a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão e desidratadas em concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 100%) seguido da infiltração em misturas de acetona e epon (1:2, 1:1, 2:1, epon puro) e emblocamento em epon e DMP30 para polimerização por 48h em estufa a 60°C. Em seguida, cortes ultrafinos foram obtidos e

contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo para posterior análise em MET LEO 906E.

b. Amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* tratadas com HMP

As células hospedeiras utilizadas no ensaio foram obtidas e cultivadas como descrito no item 4.2.2 em garrafas de cultura. Em seguida, foi realizada a interação com promastigotas na fase estacionária de crescimento (7º dia de cultivo) numa proporção de (1 macrófago:10 parasitas) durante 2 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ em meio sem SBF. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e os macrófagos lavados com PBS, pH 7.2, por três vezes, para retirar as leishmanias não internalizadas. Posteriormente, as células foram tratadas com 50 µg/mL do HMP por 1h. Após esse período o sobrenadante foi desprezado e adicionado DMEM e 10% SBF para manutenção por 24h em atmosfera de 5% de CO₂ 37 °C. Após a infecção e o tratamento as células foram fixadas, raspadas e centrifugadas para formação do *pellet*, seguido do processamento para MET como descrito no item 3.2.4a.

3.2.5 Detecção de radicais superóxido em macrófagos infectados com *L.(L.) amazonensis* e tratados com HMP

Macrófagos (5x10⁵ células por poço) foram cultivados em placa de cultura como descrito no item 3.2.2. As células foram lavadas com PBS e incubadas com meio contendo 0,5 mg/ml de *Nitroblue Tetrazolium* (NBT-Sigma), 1:10 parasitos e com 50 µg/mL do HMP. Como controle positivo foi utilizado *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma). Após 1 h a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂, as células foram fixadas com uma solução de Bouin (Solução A: solução aquosa saturada de ácido pícrico 300 ml: formalina 40%-100 ml: solução B: 20 ml da solução A e ácido acético glacial-1mL) durante 30 minutos e lavadas com etanol a 70% e água destilada, para retirar o excesso do fixador. A coloração foi feita com o corante Giemsa, diluído a 10 % em água destilada, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram desidratadas em acetona 100% e passadas em misturas crescentes de acetona-xilol, até duas passagens finais em xilol puro. As lamínulas foram, então, montadas em lâminas de vidro, tendo *Entellan* como meio de montagem. O experimento foi realizado em triplicata e para cada lamínula, aproximadamente, 100 células infectadas foram contadas. As células foram diferenciadas em 2 grupos: macrófagos infectados que apresentavam depósitos de formazan (ROS+) e macrófagos infectados que não apresentavam depósitos de formazan (ROS-). As células foram analisadas em microscópio óptico Axiophot Zeiss.

3.3 ENSAIOS *IN VIVO*

3.3.1 Análise da atuação do HMP sobre lesões de animais infectados com *L. (L.) amazonensis*

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) pesando de 85-110g com idade entre 6-8 semanas foram utilizados para infecção experimental. Os animais foram inoculados com 10^6 - 10^7 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas durante a fase infectiva do parasita (fase estacionária de crescimento-7º dia de cultivo). Foi injetada uma quantidade máxima de 0,2mL na pata posterior direita. Os animais foram acompanhados semanalmente até o desenvolvimento da lesão (pequena pápula não ulcerada, por volta da 5ª semana pós-infecção). As lesões foram medidas continuamente desde a infecção e, também posteriormente, quando foi iniciado o tratamento tópico com a emulsão contendo o metabólito, na concentração de 100mg/g, uma vez ao dia durante 4 semanas. O desenvolvimento da lesão foi acompanhado diariamente utilizando um paquímetro até o fim do tratamento. Os animais foram então sacrificados e fragmentos das lesões foram coletados e processados para análises posteriores.

Os animais foram divididos em 3 grupos contendo 5 animais em cada.

- Grupo controle – animais infectados que não receberam tratamento;
- Grupo veículo – animais infectados que receberam tratamento tópico apenas com a base utilizada no preparo da emulsão, sem o metabólito;
- Grupo tratado com HMP – animais infectados que receberam tratamento tópico com o HMP na concentração de 100mg/g;

Os experimentos foram realizados de acordo com projeto aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa de Animais da Universidade Federal do Pará (processo nº BIO001-09 CEPAB/ICB/UFPA – Anexo I).

3.3.2 Histopatologia das biópsias

a. Análise de cortes corados com Hematoxilina e Eosina

Fragmentos da lesão foram removidos e fixados em formol (10%) e incluídos em resina parafina. Posteriormente, foram obtidos cortes de 5-7µm de espessura que foram corados com hematoxilina e eosina. Os cortes corados foram utilizados para determinação do número de parasitos e do número de células presentes no local da lesão. A contagem foi realizada de acordo com Rocha-Vieira et al., (2003). Após a captura das imagens utilizando o

microscópio Zeiss Axiophot acoplado à câmera digital, foi realizada análise morfológica quantitativa através do programa ImageJ. A contagem do número de amastigotas e de células foi realizada em 10 campos não contínuos (630x).

b. Análise de cortes utilizando coloração para detecção de colágeno

Cortes de 5-7µm obtidos de fragmentos da lesão foram fixados em formol (10%) e incluídos em resina parafina. Os cortes foram desparafinizados e hidratados. Posteriormente, foram incubados em solução aquosa de ácido fosfomobilídico (0,2%) por 5 minutos, seguido da coloração com *Sirius red* diluído em solução saturada de ácido pícrico (0,1%) por 90 minutos. Os cortes foram lavados com ácido clorídrico (0,01N) e depois rapidamente com álcool (70%). Esses cortes foram, então, desidratados em acetona 100% e misturas crescentes de acetona-xilol, até duas passagens finais em xilol puro (Junqueira et al., 1979). As lâminas foram montadas utilizando Entelan. A análise foi realizada utilizando Microscópio confocal LSM510 Zeiss, sendo utilizado laser com comprimento de onda de 488nm para excitação e emissão em 520nm. Fibras colágenas que fluoresceram em verde foram consideradas fibras do tipo III e aquelas em vermelho do tipo I.

3.3.4 Análise ultraestrutural das biópsias

a. Microscopia eletrônica de transmissão

Fragmentos de lesões obtidas de animais infectados e submetidos ao tratamento tópico com HMP foram processados para MET como descrito no item 3.2.4a.

b. Microscopia eletrônica de varredura

Fragmentos de lesões obtidas de animais infectados e submetidos ao tratamento tópico com HMP foram fixados com 2,5% de glutaraldeído, 4% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1M por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com tampão cacodilato e pós-fixadas em solução contendo 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferrocianato de potássio por 2 horas ao abrigo de luz e a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 90% e 100%-3x). Os fragmentos imersos em etanol foram colocados rapidamente dentro de um recipiente contendo nitrogênio líquido e, posteriormente, foi realizada a fratura utilizando uma lâmina de metal resfriada. Após a fratura, os fragmentos foram secos pelo método do ponto crítico (Modelo K 850 - Marca EMITECH) usando CO₂. As faces cortadas foram fixadas em suporte apropriado (*stub*) utilizando fita de carbono e metalizadas

(Matalizador Emitech K550-England) com uma película de ouro de, aproximadamente, 2nm de espessura. As amostras foram, então, analisadas no microscópio eletrônico de varredura LEO 1450VP.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos serão analisados utilizando o Graph Pad Prism. O teste usado foi a análise de variância, ANOVA, e Teste-t de Student, sendo considerado como significativo $p < 0,05$.

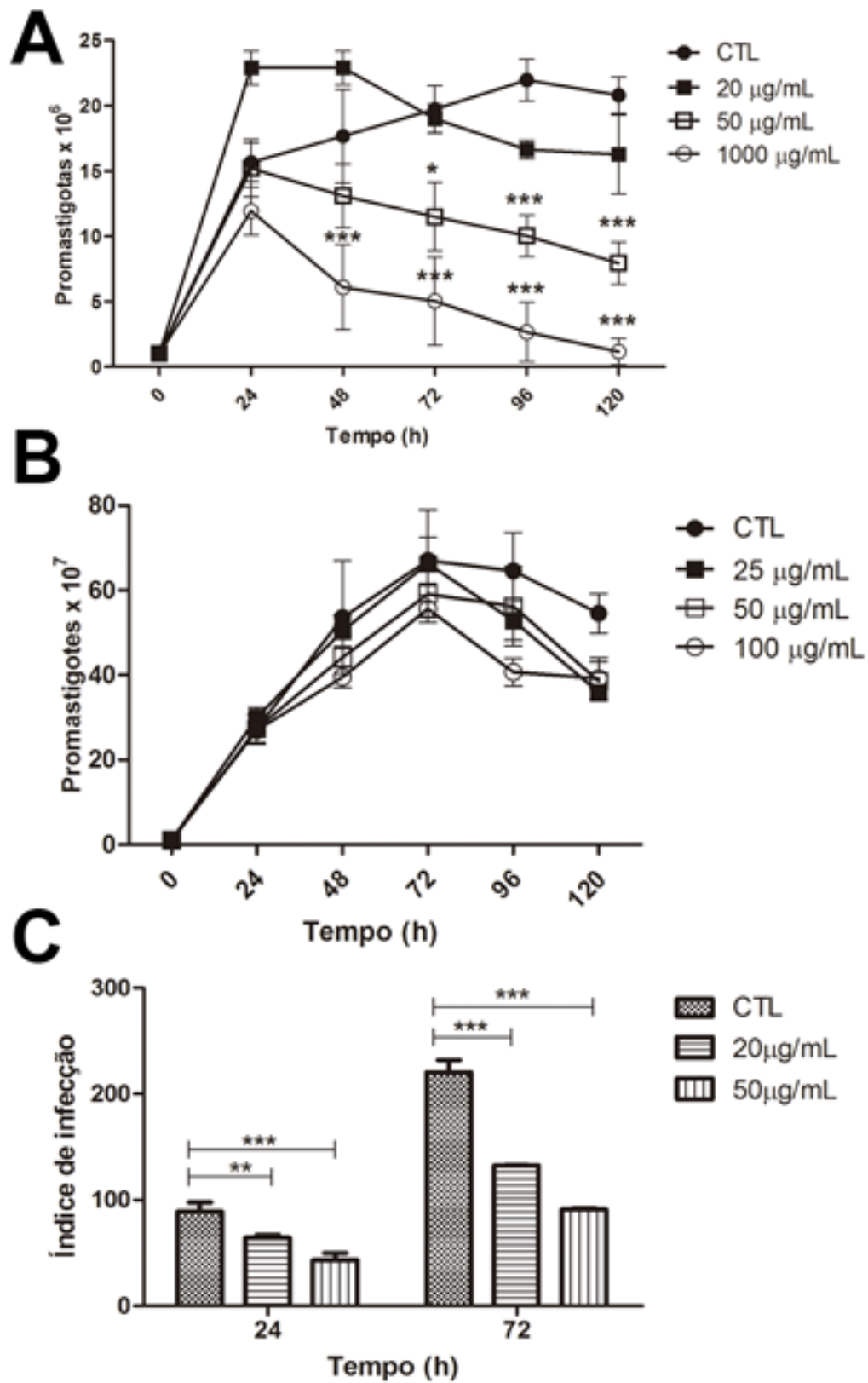
4 RESULTADOS

4.1 Ação leishmanicida do HMP

A ação do HMP foi, inicialmente, analisada sobre o crescimento de ambas as formas do parasita. Foi observada uma diminuição do crescimento de promastigotas a partir do 1º dia de tratamento quando comparado à curva de crescimento padrão para leishmania (Controle). Após 5 dias, a diminuição foi de 62% (IC_{50} 34 $\mu\text{g/mL}$) no crescimento de promastigotas, quando tratadas na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 9A). Para avaliar a atividade antiamastigota do HMP, macrófagos infectados com *L. amazonensis* foram tratados por 24 e 72h. Foi observada diminuição de 48,9% (IC_{50} 38,9 $\mu\text{g/mL}$) e 79% (IC_{50} 27,84 $\mu\text{g/mL}$) no número de amastigotas após 24 e 72 h de tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 9C). Também foi utilizada como referência a droga glucantime que apresentou um IC_{50} de 122,4 $\mu\text{g/mL}$ para formas promastigotas (Figura 9B).

Figura 9. Atividade do HMP sobre *L. (L.) amazonensis* *in vitro*.

A. Curva de crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com diferentes concentrações do HMP. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; comparados com o controle (CTL). **B.** Curva de crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com diferentes concentrações de glucantime. **C.** Efeito do HMP sobre a sobrevivência de amastigotas intracelulares. Macrófagos foram infectados e tratados com HMP por 24 e 72h. Os resultados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparados com o controle (CTL).



4.2 Alterações ultraestruturais causadas em promastigotas e amastigotas intracelulares tratadas com HMP

Para determinar as alterações em organelas específicas do parasito, foi realizada a análise da ação do HMP sobre a ultraestrutura do protozoário *L. (L.) amazonensis*. As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram analisadas após 4 dias de tratamento, baseado nos resultados obtidos em relação a ação do metabólito sobre o parasita na curva de crescimento, onde houve uma queda a partir do 4º dia. Os parasitas tratados apresentaram figuras semelhantes à mielina no citoplasma (Figura 10B-*inset*) e presença de estruturas indicativas de corpos lipídicos (Figura 10B).

Posteriormente, a análise foi feita em macrófagos infectados e tratados por 1h seguido da manutenção em cultivo por 24 h (Figura 11). O metabólito foi capaz de induzir alterações morfológicas nas formas amastigotas e também em formas promastigotas que ainda não haviam sofrido o processo de diferenciação. As principais alterações observadas foram: intensa atividade exocítica na bolsa flagelar (Figura 11D), intensa vacuolização intracelular (Figura 11B, E-G), tumefação da mitocôndria (Figura 11E), presença de membranas concêntricas no cinetoplasto e mitocôndria (Figura 11E-F) e alterações na membrana flagelar (Figura 11D, F).

Figura 10. Alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas por 4 dias com 50 µg/mL de HMP.

A. Parasitos não tratados. **B.** Parasitos tratados com HMP. Observar presença de vesículas semelhantes a corpos lipídicos (asteriscos) e figuras semelhantes à mielina no citoplasma (seta larga). BF: bolsa flagelar; F: flagelo; C: cinetoplasto; M: mitocôndria; N: núcleo. Barras: A-B 2µm; *inset* 0,1 µm.

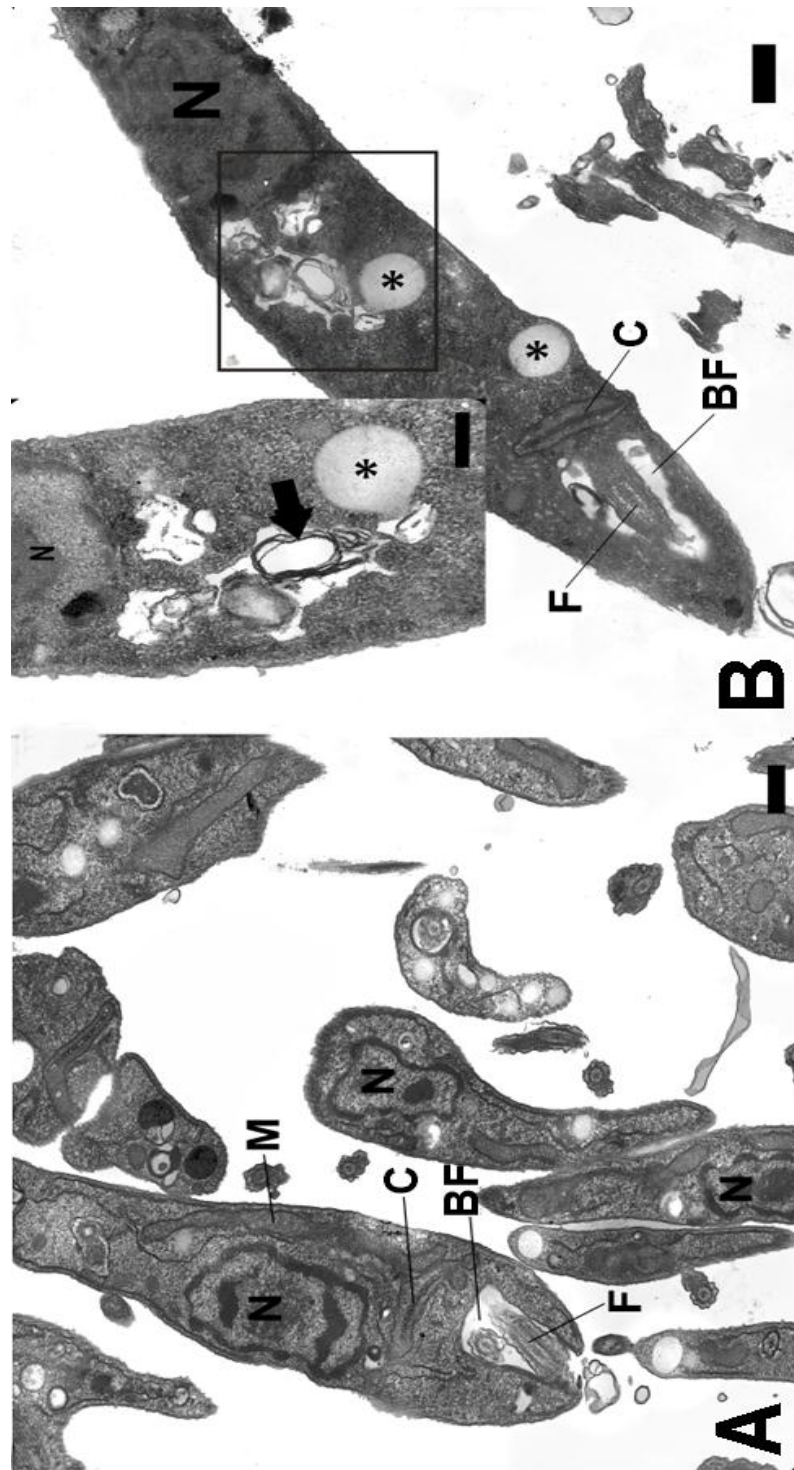
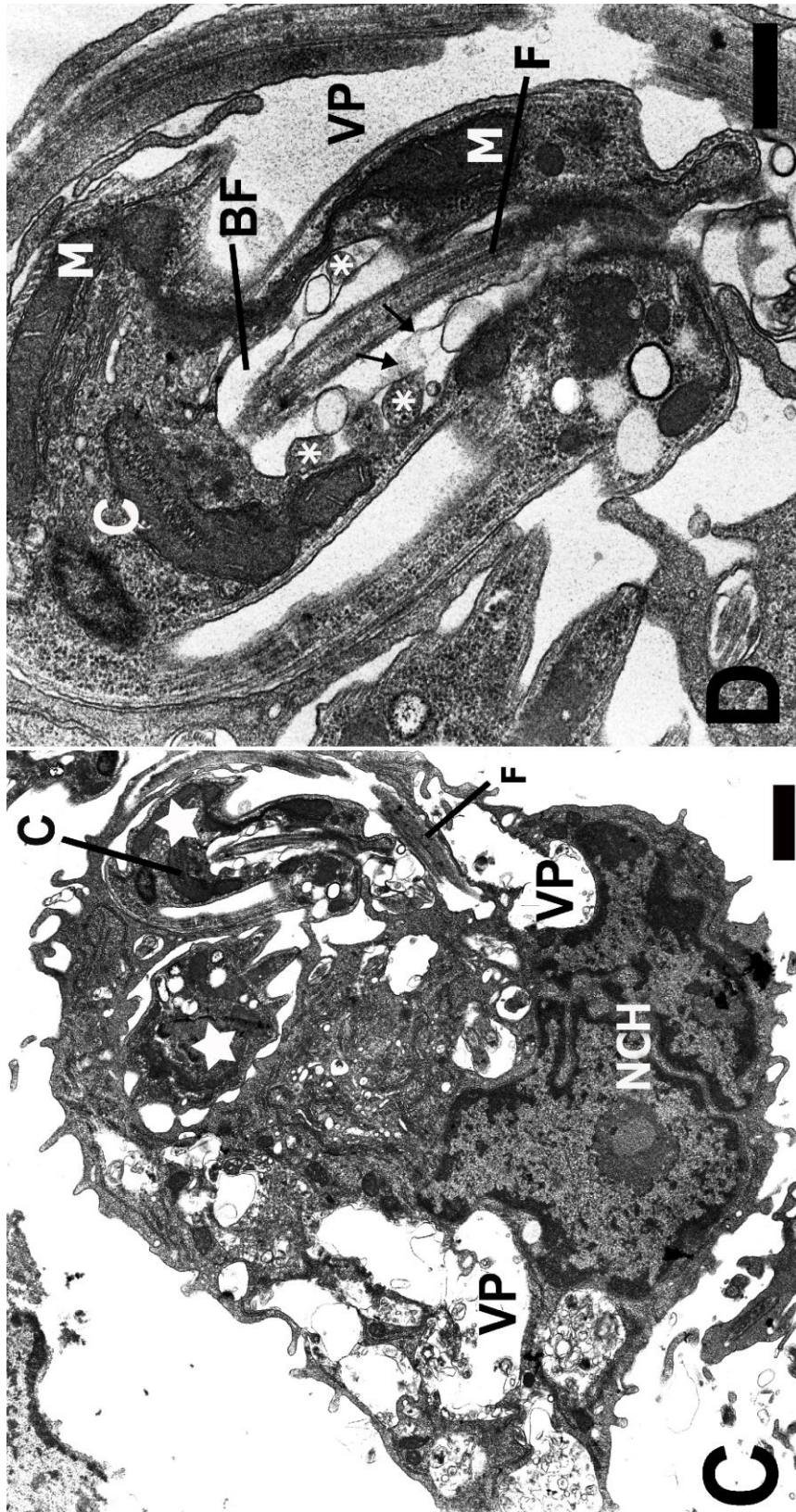
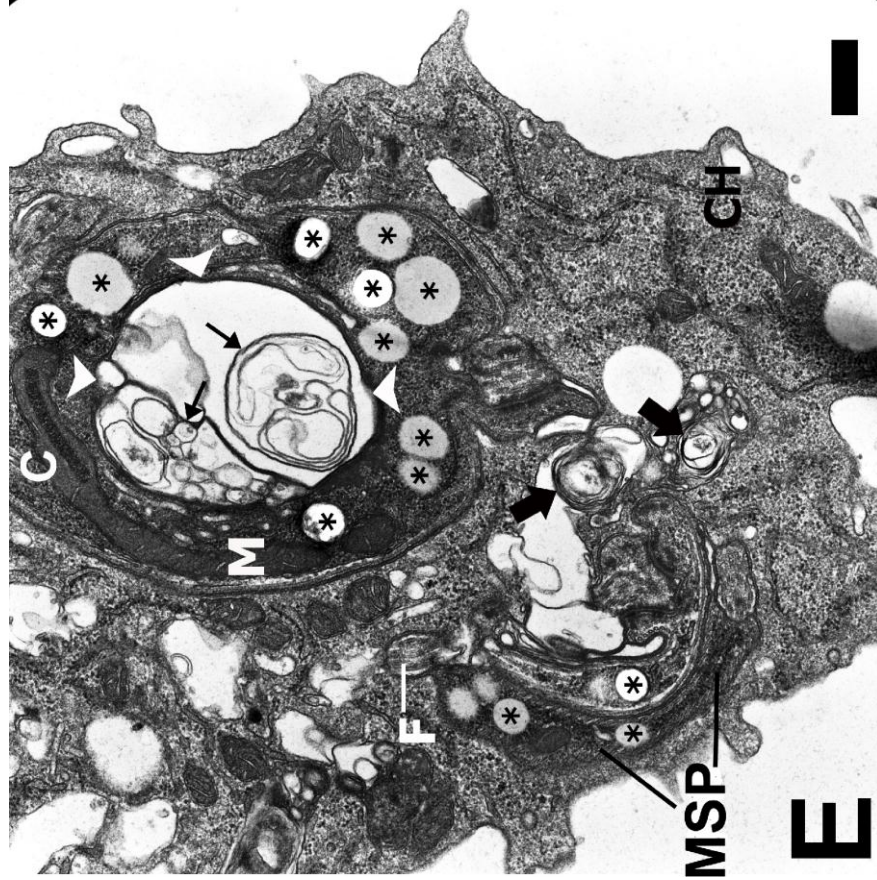
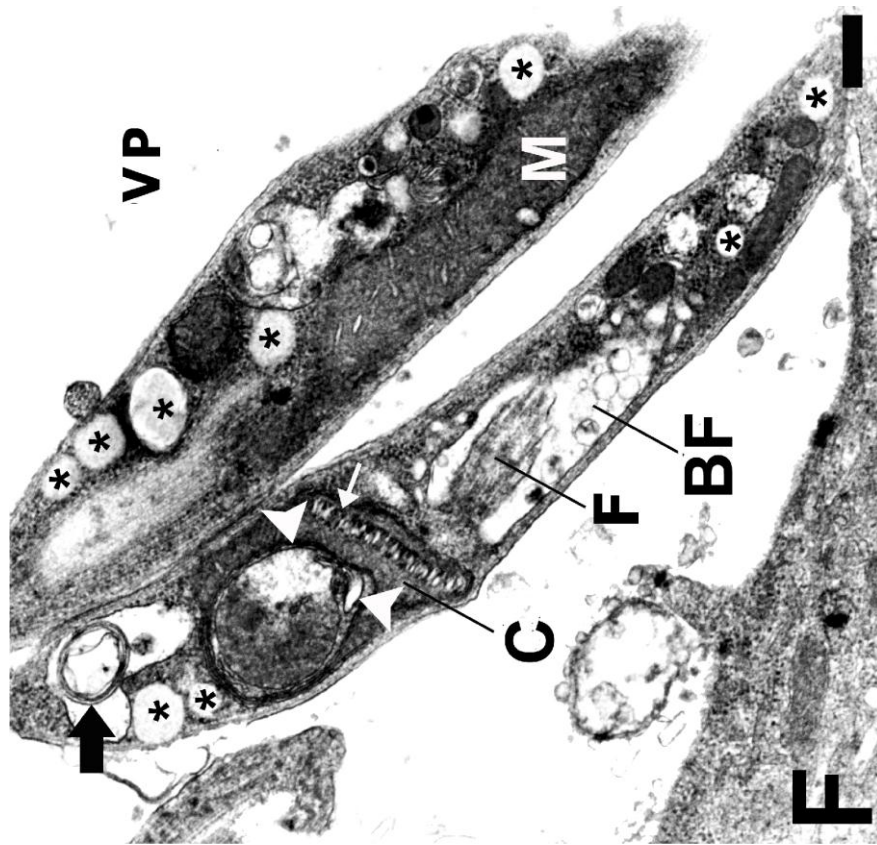


Figura 11. Alterações ultraestruturais em amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* 50 µg/mL de HMP e mantidos em cultivo por 24h.

A. Macrófagos infectados não tratados com HMP apresentando morfologia típica. Observar amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos (estrelas). **B.** Macrófagos infectados tratados com HMP por 24h apresentando vacúolos grandes. Observar um reduzido número de amastigotas e fragmentos dos flagelos (cabeças de setas). **C.** Macrófagos infectados e tratados apresentando amastigotas com morfologia alterada no interior do vacúolo (estrelas), sendo observada também a ausência desta forma. **D.** Aumento de **C**; parasitas no interior do VP apresentando alterações na membrana flagelar (setas delgadas) e vesículas dentro da bolsa flagelar (asteriscos). **E.** Amastigotas intracelulares apresentando membranas concêntricas dentro da bolsa flagelar (setas delgadas) e no citoplasma (setas); intensa formação de estruturas sugestivas de corpos lipídicos (asteriscos) no citoplasma. **F.** Parasitas intracelulares apresentando membranas concêntricas (seta), alteração do cinetoplasto (cabeça de seta) e estruturas semelhantes a corpos lipídicos (asteriscos). *N*, núcleo; *BF*, bolsa flagelar; *C*, cinetoplasto; *F*, flagelo; *M*, mitocôndria; *VP* vacúolo parasitóforo; *NCH*, núcleo da célula hospedeira; *CH*, célula hospedeira. Barras: **A-B** 5 µm; **D-E** 2 µm.





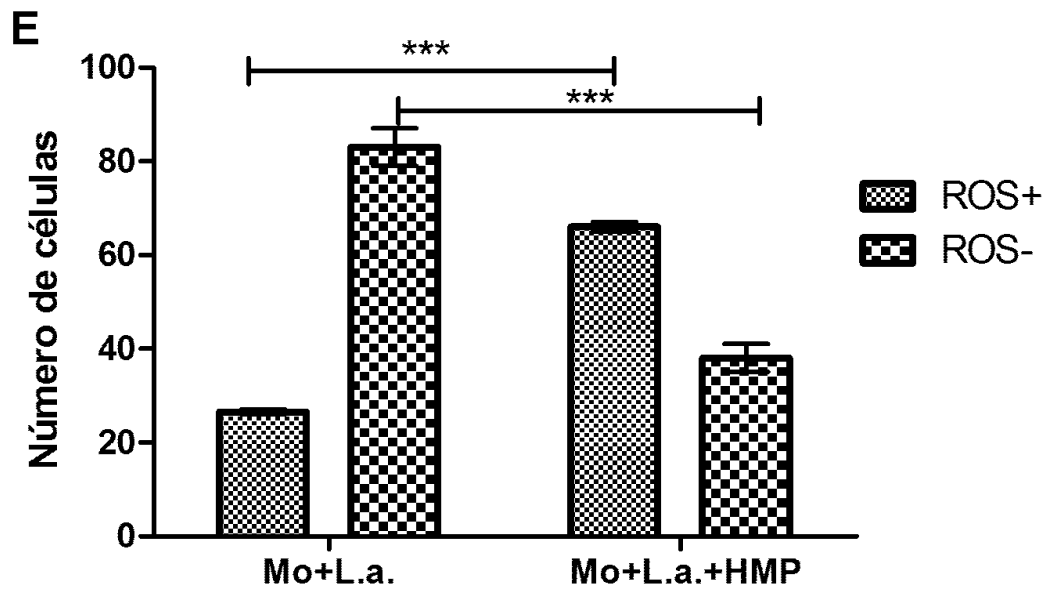
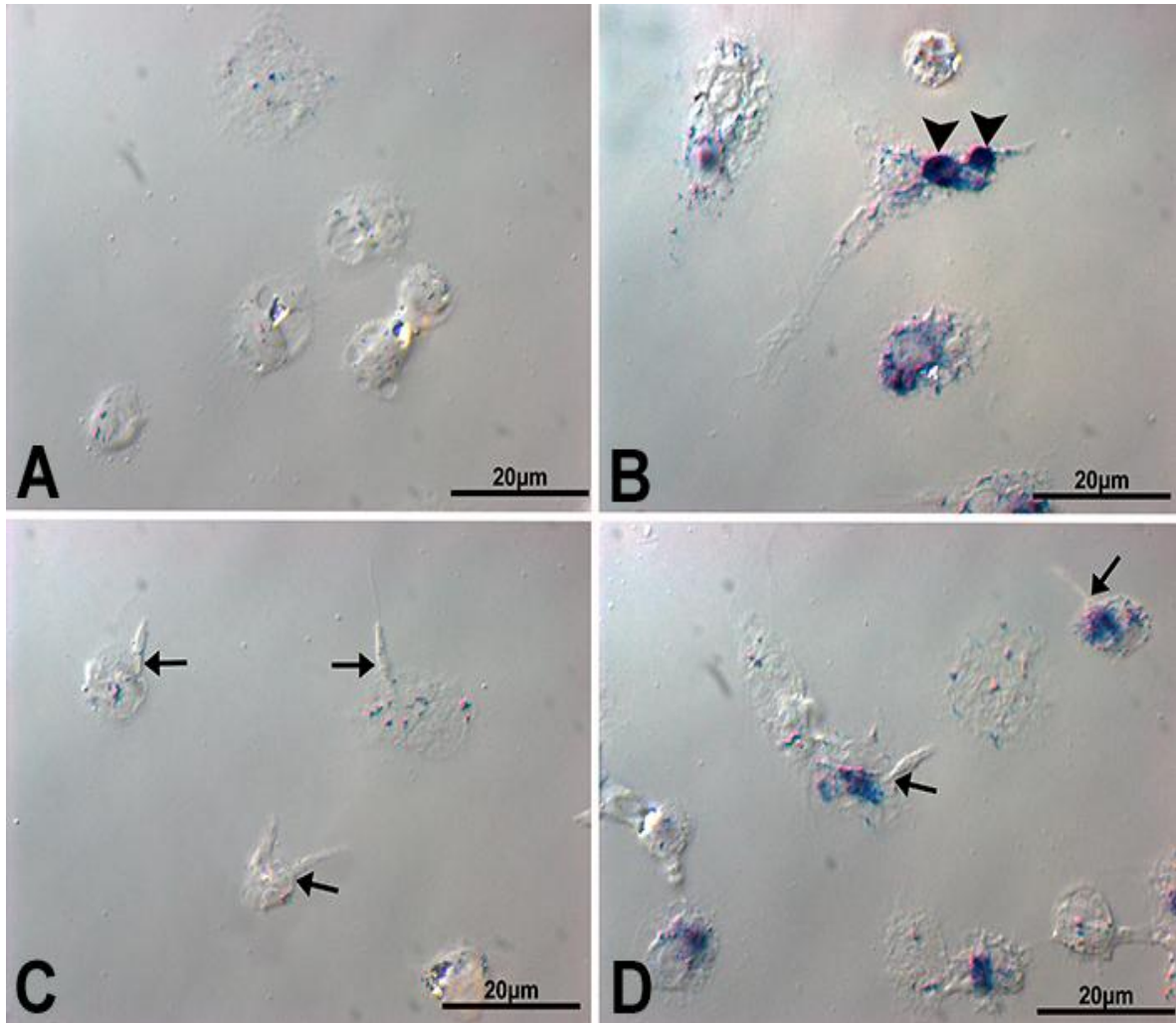


4.3 Produção de ROS em macrófagos infectados e tratados com HMP

Tendo em vista os efeitos do HMP no processo de destruição da *Leishmania*, especialmente sobre as formas amastigotas, foi testado se o HMP seria capaz de reverter a ação inibitória da *L. amazonensis* no que diz respeito à produção de ROS. O HMP foi capaz de reverter esse mecanismo inibitório sobre a produção de ROS observado na Figura 12 C-D. Após a quantificação do número de macrófagos infectados que apresentavam depósitos de formazan, ocorreu um aumento de 63% da reação quando estas células foram submetidas ao tratamento com 50 µg/ml de HMP por 1 hora (Figura 12 E).

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

A. Controle negativo da reação, macrófagos não tratados e não-infectados. Observar a ausência de reação. **B.** Controle positivo, macrófagos infectados com Zimozan A (Sigma). Observar reação no local da infecção (cabeça de setas). **C.** Macrófagos infectados com *L. amazonensis* aderida à superfície. Observar a ausência de reação devido à inibição da produção de radicais de oxigênio pela *L. amazonensis* (setas). **D.** Macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com 50 µg/mL de HMP por 1 hora. Observar reação na célula, mesmo com a presença da forma promastigota aderida à superfície do macrófago (seta). **E.** Número de macrófagos infectados que apresentaram depósitos de formazan. MO+L.a.: macrófagos infectados por *L. amazonensis*; MO+L.a.+KA: macrófagos infectados por *L. amazonensis* e tratados com 50 µg/mL de HMP; ROS+: macrófagos infectados com depósitos de formazan; ROS-: macrófagos infectados que não apresentaram depósitos de formazan. *** p<0.001.



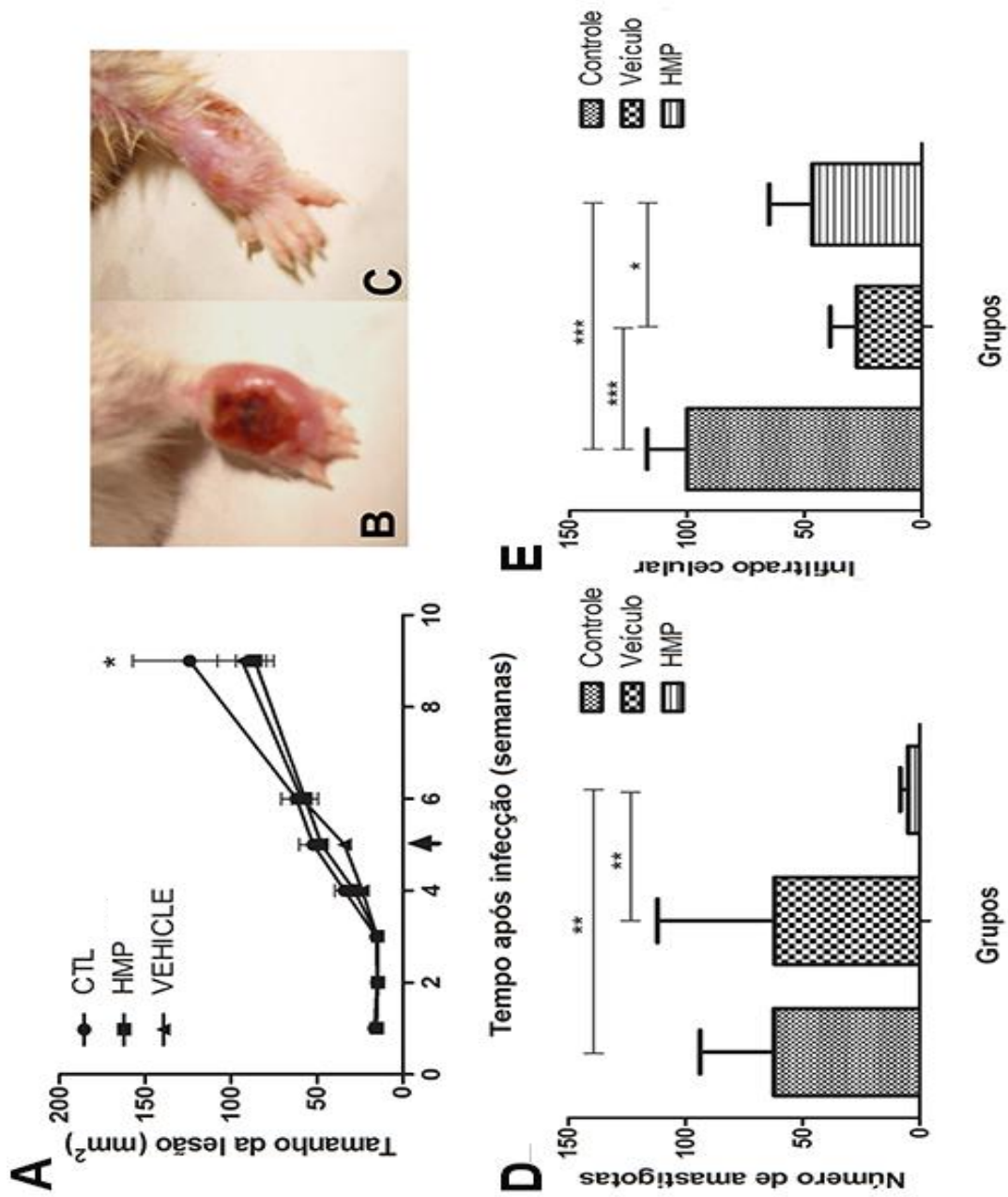
4.4 Redução do número de parasitos e do infiltrado celular em lesões tratadas com HMP

Baseado na atividade leishmanicida *in vitro*, o HMP foi então testado em forma de pomada para o tratamento tópico de modelo experimental de LC.

Primeiramente foi observada uma discreta diminuição no tamanho das lesões de animais tratados com HMP durante 4 semanas (Figura 13 A-C). Apesar da discreta diminuição no tamanho da lesão, foi observada a diminuição do número de parasitos e infiltrado celular (Figura 13 D-E). Um dado interessante observado é que os animais que foram tratados apenas com o veículo apresentaram uma diminuição semelhante àquela observada nos animais tratados com o HMP, entretanto o número de parasitos no grupo veículo foi significativamente maior quando comparados ao grupo tratado com o HMP (Figura 13 D).

Figura 13. Efeito do tratamento tópico com HMP sobre a infecção experimental causada por *L. amazonensis*

A. Desenvolvimento das lesões em animais infectados e tratados ou não com HMP. O tratamento iniciou-se 5 semanas após a infecção e estendeu-se por 4 semanas. Os dados representam resultados obtidos de 5 animais (n=5, para cada grupo). **B.** Análise macroscópica da lesão de animais não tratados. **C.** Análise macroscópica da lesão de animais tratados. **D.** Quantificação do número de parasitas no local da lesão. Amastigotas foram quantificadas 1 mês após a interrupção do tratamento e a média foi calculada a partir da contagem de 10 campos não contínuos. $**p<0.001$. **E.** Infiltrado celular no local da lesão. Os resultados foram expressos a partir da análise de 10 campos não contínuos. $*p<0.05$; $***p<0.0001$



4.5 Aumento da produção de colágeno em lesões tratadas com HMP

A partir da obtenção de material proveniente das lesões tratadas e não tratadas foi realizada análise histopatológica, MET e MEV. Foi possível observar que animais infectados com *L. amazonensis* e tratados com HMP apresentaram diminuição no número de amastigotas e do infiltrado celular (Figura 14 E-F) culminando com o processo inicial de cicatrização suprimindo o desenvolvimento de úlceras disseminadas. Também foi observado que a análise de lesões dos animais do grupo veículo demonstrou uma grande quantidade de parasitos no interior de vacúolos (Figura 14 C-D). Além disso, foi observada uma maior quantidade de fibras de colágeno do tipo I, através da coloração utilizando *picrosirius red* (Figura 15 C) e também por MEV (Figura 16 B), além da disposição organizada destas fibras. A análise por MET também confirmou que os animais tratados continham poucas células inflamatórias no local da infecção e uma elevada quantidade de fibras de colágeno bem organizadas (Figura 15 D), quando comparadas aos animais controle (Figura 16 E).

Figura 14. Secções histopatológicas de lesões de animais infectados e submetidos ao tratamento tópico com HMP.

A-B. Lesão de animais não tratados apresentando uma grande quantidade de amastigotas no interior de vacúolos quando comparados ao material de animais tratados com HMP observado em **B**. **C-D** Lesão de animais do grupo veículo apresentando uma grande quantidade de amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos. E-F Lesões de animais tratados com HMP demonstrando uma grande quantidade de fibras de colágeno (C). Coloração: H&E. Barras: A-C-E: 20 μm ; B-D-F: 10 μm .

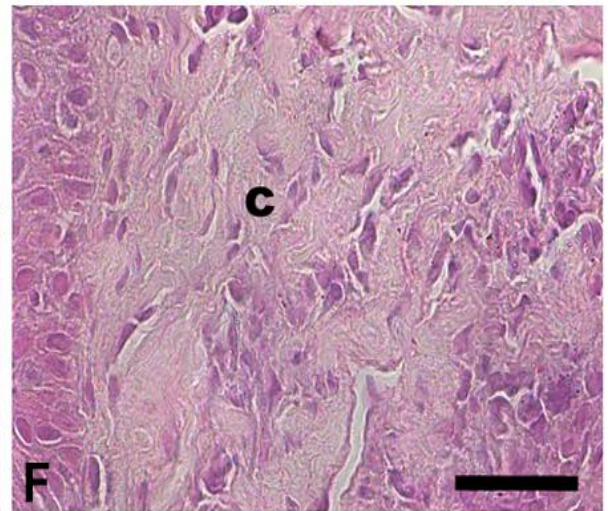
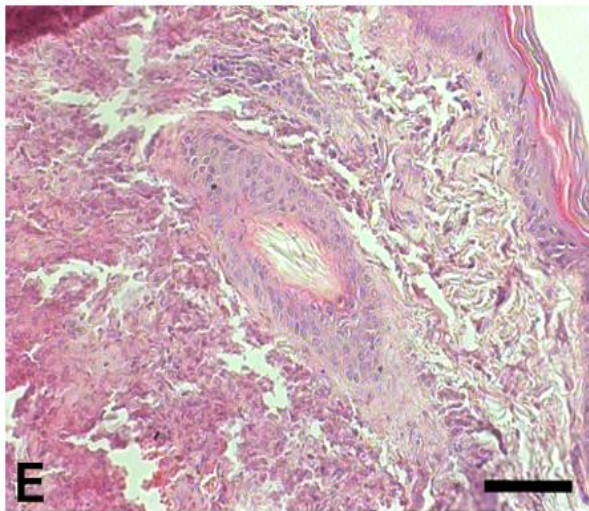
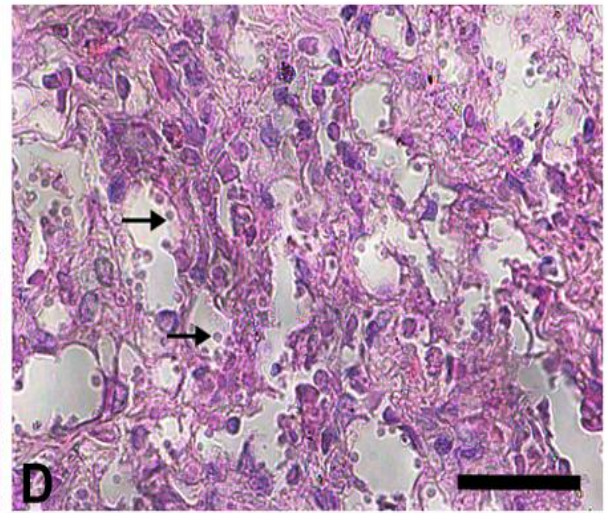
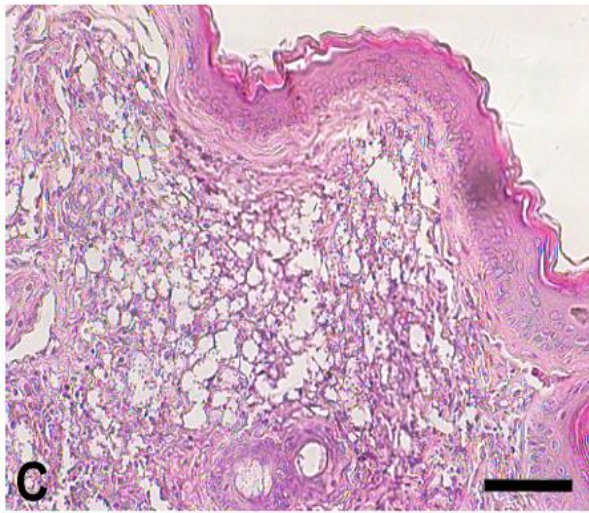
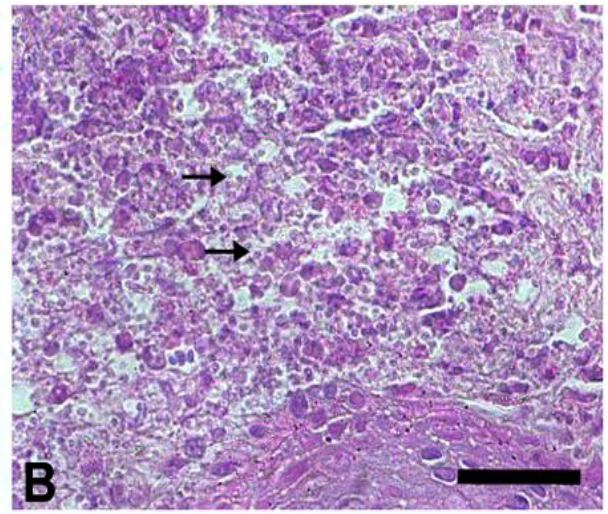
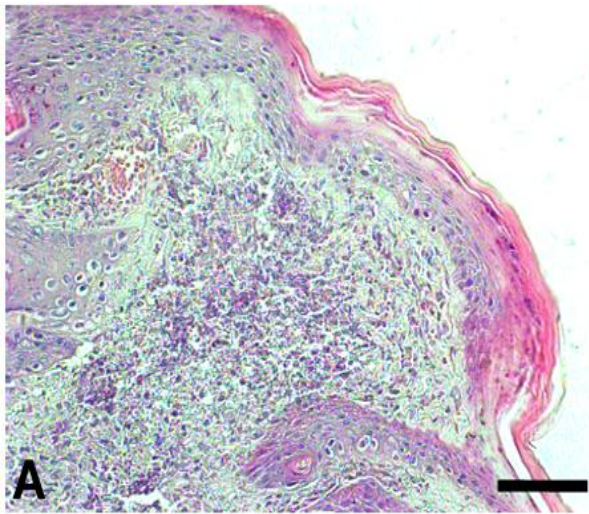


Figura 15. Secções de lesões de animais infectados e submetidos ao tratamento tópico com HMP.

A. Análise por microscopia confocal de lesões do grupo controle, apresentando poucas e dispersas fibras de colágeno quando comparadas às lesões de animais tratados com HMP que apresentaram uma intensa organização das fibras observadas em **B**; Coloração: *Picrosirius red*. **C-D** Microscopia eletrônica de transmissão de lesões de animais do grupo controle e do grupo tratado, respectivamente. Observar a forma amastigota do parasita (P) no interior de vacúolos (VP) da célula hospedeira e poucas fibras colágenas (C). **D.** Observar a grande quantidade de fibras colágenas tipo I organizadas e ausência de formas amastigotas e infiltrado celular. P, parasito; NCH, núcleo da célula hospedeira; VP, vacúolo parasitóforo. Barras: **A-B** 30 µm; **C-D** 20 µm; **E-F** 3µm.

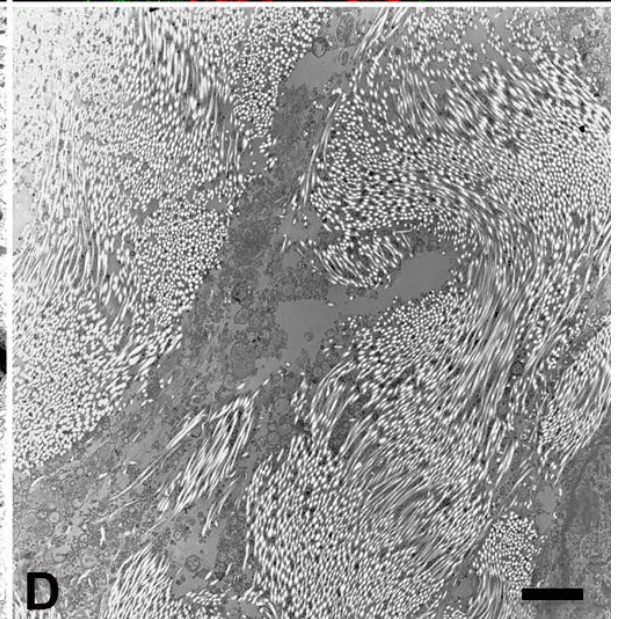
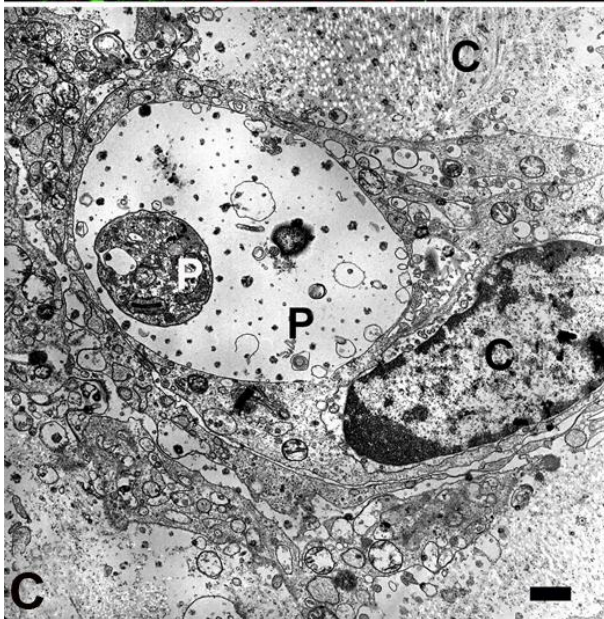
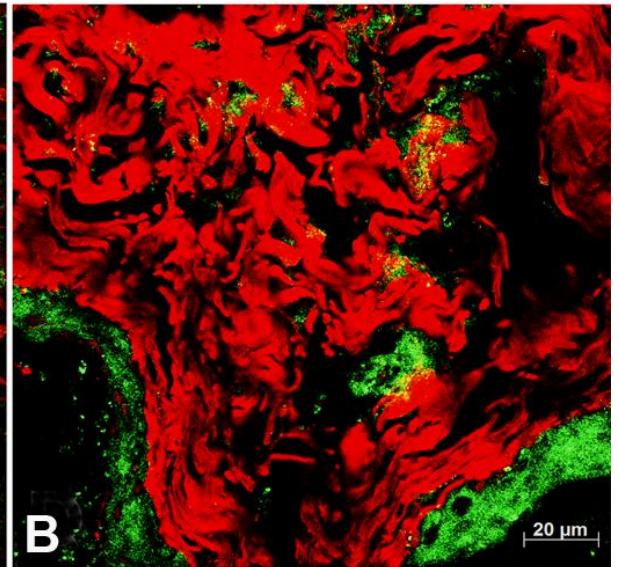
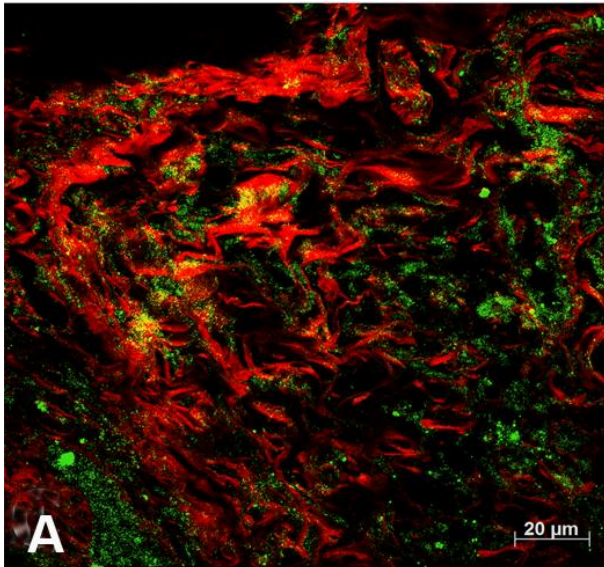
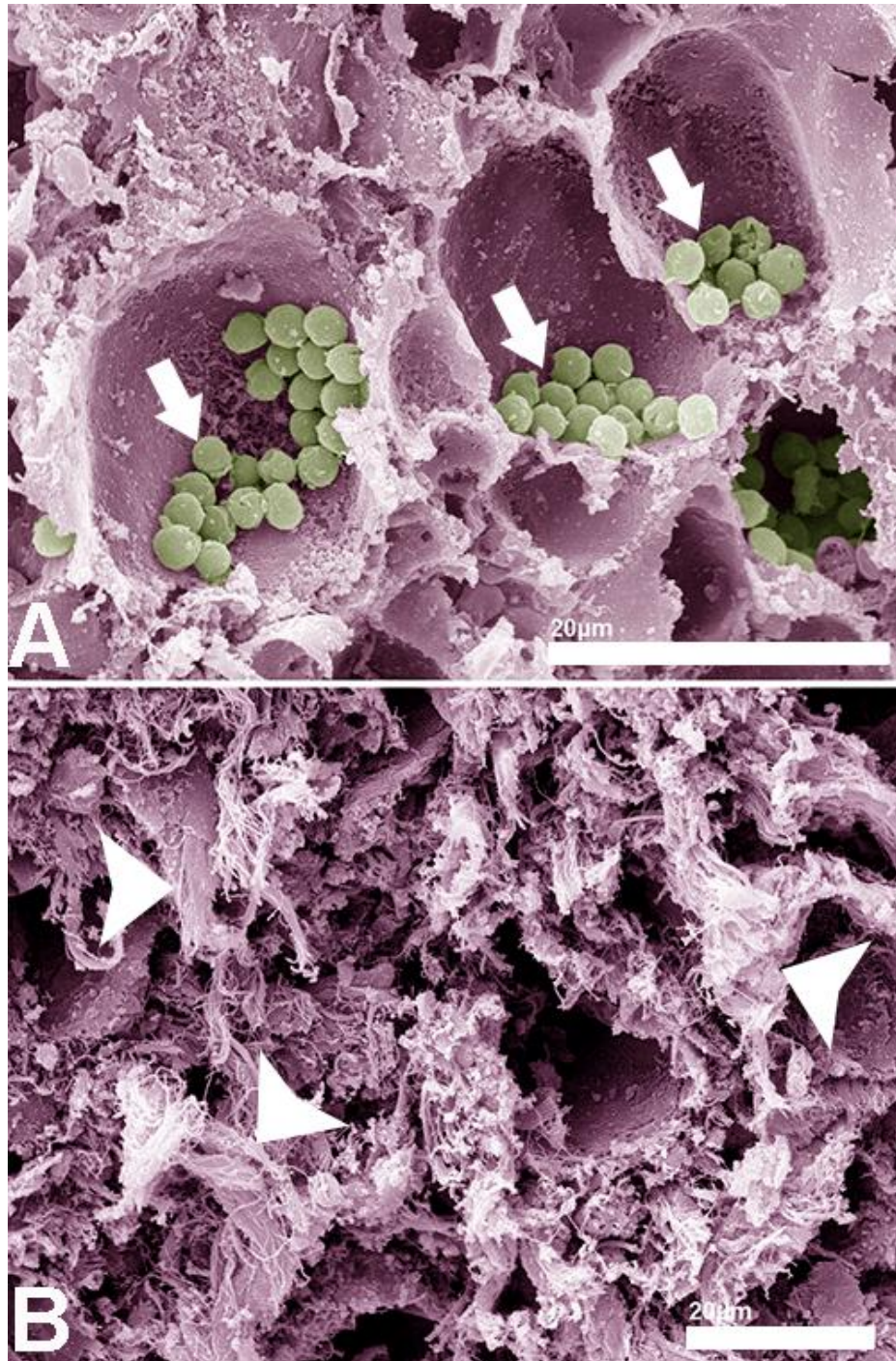


Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura de lesões de animais infectados e submetidos ao tratamento com HMP

A. Lesões de animais não tratados apresentando um grande número de amastigotas (setas) no interior de vacúolos parasitóforos. **B.** Lesões de animais tratados demonstrando uma intensa produção de material fibroso sugestivo de fibras colágenas bem organizadas e distribuídas por todo o tecido (cabeças de seta). Barras: 20 μm .



5 DISCUSSÃO

A quimioterapia é o tratamento mais efetivo para o combate às leishmanioses, entretanto as drogas atualmente utilizadas são geralmente tóxicas, caras, necessitam de longo período de tratamento causando efeitos adversos severos. Assim, torna-se necessário identificar novas substâncias e/ou drogas de origem natural que sejam efetivas e seguras para o tratamento da doença (Croft et al., 2006).

Visando a busca por terapias alternativas de tratamento das leishmanioses cutâneas, o HMP ou ácido kójico, apresenta-se como fármaco promissor. O HMP que é um metabólito secundário proveniente de fungos do gênero *Aspergillus*, é conhecido por apresentar grande variedade de funções, dentre elas atividade antitumoral, inibidor da tirosinase – enzima que participa na produção de melanina – e ação antioxidante em neutrófilos humanos (Niwa & Akamatsu, 1991; Gomes et al., 2001; Burdock et al., 2001). A ação do HMP sobre parasitas foi demonstrada apenas em um trabalho na literatura, onde ocorreu a diminuição na produção de ovos de *Schistosoma mansoni* devido a inibição da enzima tirosinase 1 e 2 presentes nos vermes adultos (Fitzpatrick et al., 2007). Entretanto, não existem estudos que demonstrem o efeito do HMP sobre protozoários.

Desta forma, foi observado no presente estudo, que o HMP promoveu diminuição de 62% (IC_{50} 34 $\mu\text{g/mL}$) sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* após o período de 5 dias de tratamento. Roy et al. (1990) ao analisar a ação de uma micotoxina, a faseolinona, sobre *L. donovani*, obteve diminuição de 90% no crescimento destas formas quando tratadas também com 50 $\mu\text{g/mL}$ da toxina e sua ação parece estar relacionada a inibição da RNA polimerase e conseqüentemente, a síntese de RNA. Outro metabólito isolado do fungo *Nigrospora sphaerica*, a afidicolina e seus derivados, descritos como inibidor do ciclo celular, demonstraram efeito sobre promastigotas de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. enriettii* e *L. major* utilizando doses baixas ($IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$). Entretanto, apresentaram relativa citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais ($IC_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$) (Kayser et al., 2001). Além disso, as substâncias hipocreлина A e B, que são pigmentos isolados de fungos *Hypocrella bambusa*, também demonstraram efeito contra *L. donovani*, sendo que a hipocreлина A foi mais eficaz que a B e até mesmo que a pentamidina e anfotericina B. Porém, a alta toxicidade destas substâncias tem limitado o uso clínico (Ma et al., 2004). Um composto proveniente do cogumelo *Merulius incarnatus* também demonstrou efeito sobre promastigotas de *Leishmania* (IC_{50} 3,6 $\mu\text{g/mL}$), no entanto também gerou moderada citotoxicidade quando testado em células Vero ($IC_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$) (Jin & Zjawiony, 2006).

Apesar dos valores do IC₅₀ obtidos no presente trabalho serem maiores que aqueles descritos na literatura – sobre formas promastigotas – é importante ressaltar que esse valor foi inferior ao obtido com a droga de referência, glucantime (IC₅₀ 122,4 µg/mL). Além disso, o nosso grupo demonstrou recentemente que o HMP apresenta baixa citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais (concentrações até 700 µg/mL) (Rodrigues, et al., 2011).

No presente trabalho, foi observado que a atividade leishmanicida foi mais significativa sobre as formas amastigotas intracelulares, onde houve diminuição de 79% (IC₅₀ 27,84 µg/mL) após 72 h de tratamento. Resultados semelhantes foram observados com outros metabólitos e compostos extraídos de fungos. Derivados da afidicolina, proveniente do fungo *Nigrospora sphaerica*, promoveram a diminuição do crescimento de amastigotas intracelulares de *L. donovani*, entretanto o mecanismo envolvido na atividade leishmanicida não foi descrito (Kayser et al., 2001).

A leishmania é parasita intracelular obrigatório, tendo as células do sistema fagocítico mononuclear como as principais células hospedeiras. A atuação de novos compostos sobre a célula hospedeira da leishmania é importante para avaliar a ação seletiva da droga sobre o parasito ou para determinar se pode haver ação estimulatória e/ou imunomoduladora a fim de auxiliar a destruição do parasita (Sen & Chatterjee, 2011).

A ação antiamastigota observada após o tratamento de macrófagos infectados e tratados com HMP foi mais eficaz sobre as formas intracelulares, possivelmente devido à ação indireta do metabólito sobre a célula hospedeira. Recentemente, nosso grupo demonstrou que o HMP induziu a diferenciação de monócitos humanos em macrófagos e é capaz de promover a ativação de neutrófilos humanos, com aumento da produção de ROS (Costa, 2012; Frade, 2012). Além disso, o HMP foi capaz de modular a ativação de macrófagos peritoneais de camundongo, promovendo o rearranjo do citoesqueleto, aumento da superfície de adesão, aumento da atividade fagocítica e produção de ROS (Rodrigues et al., 2011).

Estudos demonstram que a *L. amazonensis* possui a capacidade de inibir a resposta do tipo Th-1, culminando com a diminuição da produção de ROS e NO (Olivier et al., 2005; Mukbel et al., 2007). No presente trabalho, foi demonstrado que o HMP é capaz reverter o processo inibitório da produção de ROS causado pela *L. amazonensis*, uma vez que o HMP induziu a produção de ROS, mesmo na presença do parasita. Outros estudos descritos na literatura estão de acordo com os resultados obtidos, a exemplo do extrato aquoso de cogumelos da espécie *Agaricus blazei* Murill que demonstraram efeito contra amastigotas de *L. amazonensis* promovendo redução de 44,1% no índice de infecção. Além disso, este efeito parece estar relacionado a outros mecanismos independentes da produção de NO (Valadares et al., 2011).

Os resultados encontrados na literatura relacionados a atuação de metabólitos de fungos sobre a *Leishmania* demonstram apenas a capacidade de inibição do crescimento destes compostos. Poucos estudos determinam o mecanismo de ação sobre a célula hospedeira infectada e/ou o efeito do tratamento sobre a morfologia de ambas as formas. Assim, trabalhos descritos na literatura demonstram que a identificação de alterações morfológicas por microscopia de transmissão pode auxiliar na elucidação de possíveis mecanismos de ação de drogas (Adade & Souto-Padrón, 2010). Por isso, o presente trabalho além de determinar a atividade leishmanicida do HMP, também demonstrou alterações ultraestruturais causadas pela ação do bioproduto em formas promastigotas e amastigotas intracelulares.

Os resultados obtidos mostraram que a forma amastigota após tratamento com HMP apresentou intensa vacuolização intracelular, alterações na membrana flagelar e a presença de múltiplas vesículas no interior da bolsa flagelar. A bolsa flagelar é uma invaginação da membrana plasmática localizada na região anterior do parasita, onde não existem microtúbulos subpeliculares. Esta característica torna esta região o local onde ocorrem os processos de endocitose/exocitose do parasita (Landfear & Ignatushchenko, 2001). A presença de vesículas no interior da bolsa flagelar dos parasitas pode estar relacionada à tentativa destes em eliminar por exocitose compostos metabolizados no citoplasma (McConville et al., 2002). Diferentes produtos naturais com atividade leishmanicida também foram capazes de induzir tais modificações nesta região, sugerindo alterações metabólicas no parasita (Guimarães et al., 2010, Vendrametto et al., 2010).

Outra alteração morfológica observada, tanto em formas amastigotas quanto em promastigotas tratadas por 72h com HMP, foi a presença de figuras semelhantes à mielina e o intenso acúmulo de corpos sugestivos de lipídio no citoplasma do parasita. Alguns estudos sugerem que a presença de figuras semelhantes à mielina está relacionada ao processo de autofagia induzido pela ação de diferentes drogas (Rodrigues & Souza, 2008) e que o processo autofágico está diretamente associado à resposta da célula ao estresse celular (Kondo et al., 2005) sendo dependente da produção de ROS (Djavaheri-Mergny et al., 2006). Além disso, o acúmulo de corpos lipídicos no interior dos parasitas, também parece estar diretamente associado com a produção de ROS e autofagia celular (Djavaheri-Mergny et al., 2006). Assim, a indução da produção de ROS pela célula hospedeira tratada com HMP parece induzir a formação de corpos lipídicos no citoplasma do parasito e conseqüentemente, pode estar induzindo a morte destes por processo autofágico. Entretanto, outros testes devem ser realizados para comprovar tal hipótese, como, por exemplo, a marcação com a proteína autofagossomal LC3 utilizando anticorpos específicos.

Baseado na atividade leishmanicida *in vitro* do HMP, foram realizados ensaios utilizando o HMP em forma de pomada para o tratamento tópico de modelo experimental *in vivo* de LC. O tratamento tópico em forma de pomadas, óleos e emulsões, seria mais indicado, uma vez que seria utilizado especificamente no tratamento de infecções cutâneas causadas por *Leishmania*. Possuem ainda a vantagem de não serem invasivos e promoverem efeitos adversos reduzidos no paciente. Diversos tratamentos tópicos descritos na literatura demonstram ser eficazes no combate à doença, entretanto, apenas o imiquimode e a paramomicina, estão atualmente em fase de testes clínicos para uso em formulações tópicas como pomadas, cremes, géis e soluções (Croft & Oliaro, 2011; Alavi-Naini et al., 2012; Salah et al., 2013). Apesar disso, os resultados obtidos ainda são controversos devido a complicações nas definições de padrões para o início do tratamento, duração e dosagens utilizadas e, ainda, no que diz respeito aos critérios de cura após o tratamento.

No presente estudo os animais infectados que foram tratados com a pomada contendo o HMP durante o período de 20 dias, apresentaram diminuição do infiltrado celular e redução do número de parasitos após o período do tratamento. Apesar da diminuição de parasitos no local da infecção, não houve a eliminação por completo das formas amastigotas. Estudo realizado por El-On et al., 1989 demonstrou que houve intensa produção de colágeno 4 semanas após o fim do tratamento, porém não houve eliminação completa das amastigotas quando utilizou uma pomada contendo paramomicina a 12%, 2 vezes ao dia, durante 10 dias para o tratamento de camundongos. Sendo assim, o tratamento por períodos mais longos, ou mesmo, o tratamento duas vezes ao dia, poderia ser realizado até que se observasse a completa cura dos animais. A manutenção de alguns animais por um período prolongado, após a determinação da cura das lesões, também seria indicada para a análise de possíveis reincidências da doença.

Outra possibilidade seria a utilização do HMP juntamente com drogas já conhecidas por terem efeito leishmanicida, como a anfotericina B. Estudos demonstram que a co-utilização de certos tipos de compostos juntamente com drogas comercialmente utilizadas no tratamento de doenças infecciosas, podem aumentar a eficácia destas drogas com conseqüente diminuição das doses utilizadas (Srivastava & Vaidya, 1999; Niimi et al., 2004; Kim et al., 2012; Kim et al., 2013).

Além da diminuição do número de parasitos, o tratamento com a pomada induziu o processo inicial de cicatrização no local da lesão, comprovado pela presença de numerosas fibras de colágeno no local da infecção, bem como a disposição organizada destas fibras. Sabe-se que a cicatrização ocorre em etapas, entre as quais incluem os processos de inflamação, proliferação celular e remodelamento do tecido onde neutrófilos, macrófagos e

linfócitos são as primeiras células a chegarem ao local da lesão, seguido dos fibroblastos (Miller & Nanchahal, 2005).

Durante o processo de infecção da *Leishmania*, o parasita produz proteases que são capazes de destruir proteínas da matrix extracelular e desestabilizar as barreiras da derme para a propagação da infecção (Abreu-Silva et al., 2004). Além disso, estudos mostraram que a presença de fibras do tipo III está relacionada ao sucesso do parasitismo, uma vez que essas fibras parecem proporcionar a sustentação de células inflamatórias, como histiócitos vacuolizados e parasitados, enquanto que as fibras do tipo I estão relacionadas à manutenção da arquitetura dos tecidos e a reestruturação da derme (Silva-Almeida et al., 2012). Os resultados obtidos demonstraram que o HMP induziu, em animais infectados, a produção de grande quantidade de fibras de colágeno tipo I em relação ao colágeno do tipo III. Um estudo realizado por Baldwin et al. (2007) demonstraram que, em modelos murinos, a presença de fibras de colágeno é elevada em áreas onde um novo epitélio está sendo produzido, e onde o parasita é eliminado e o processo inflamatório está controlado. E mais recentemente, foi demonstrado que o ácido kójico (HMP) estimula o processo de cicatrização em animais lesionados quando utilizado como formulação tópica na concentração de 6% durante 12 dias de tratamento (Mohammadpour et al., 2012).

Um aspecto interessante observado neste estudo é que houve uma diminuição discreta do tamanho da lesão apesar da diminuição do infiltrado celular e do reduzido número de parasitas, fato que pode estar associado à presença de fibras de colágeno numerosas e alinhadas paralelamente. A ação de compostos que se baseiam apenas no tamanho da lesão determinam dano tecidual em longo prazo e/ou processo de reparação somente através de uma análise macroscópica. Porém, a morte do parasita e as modificações no ambiente da lesão influenciam diretamente os processos de dano e/ou reparação tecidual, sendo necessária a análise histopatológica para comprovação de características como presença do parasito e estrutura do tecido lesionado (Sakthianandeswaren et al., 2005, Lecoeur et al., 2007). Assim, a pequena diminuição do tamanho da lesão dos animais tratados com HMP em relação aos animais controle pode ser explicada devido ao fato da intensa produção de fibras colágenas que pode estar relacionada ao início do processo de cicatrização, onde ainda não houve tempo suficiente para que ocorresse o remodelamento do tecido, etapa final da cicatrização (Nurden, 2011).

Outro dado obtido que merece destaque é que os animais que receberam apenas o tratamento com o veículo (base de triacilgliceróis obtido da semente de frutos da planta *Theobroma grandiflorum* - cupuaçu) apresentaram diminuição no tamanho da lesão semelhante ao observado em animais tratados com o HMP. No entanto, quando foi realizada a

análise dos cortes histológicos da lesão, o grupo veículo apresentou uma grande quantidade de amastigotas, quando comparado ao grupo tratado com HMP. A base proveniente de sementes do cupuaçu parece auxiliar no processo de cicatrização e não diretamente sobre a morte do parasito, porém, outros estudos deverão ser realizados para determinar o potencial cicatrizante da base. Além disso, acredita-se que a presença do HMP possa estar induzindo a destruição dos parasitos presentes na lesão através da produção de ROS pelas células hospedeiras. A produção de ROS também pode estar atuando para estimular a produção de colágeno, uma vez que estudos na literatura demonstraram que a via de sinalização PI3K/Akt é capaz de regular a fibrinogênese, induzindo a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno através de mecanismo dependente da produção de ROS (Lu et al., 2010). A partir da ativação das células hospedeiras *in vivo*, acredita-se que possa estar ocorrendo a liberação de fatores de crescimento, assim como de citocinas, desempenhando papel importante na morte dos parasitas, e ainda, mediando a fibroplasia, processo essencial durante a cicatrização (Baldwin et al., 2007).

Este estudo, então, demonstrou, pela primeira vez, a ação leishmanicida *in vitro* do HMP e também a ação *in vivo* de pomada contendo o bioproduto. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que o HMP poderia ser utilizado no tratamento de leishmaniose cutânea tendo excelente potencial como agente leishmanicida.

6 CONCLUSÕES

- 1- O HMP apresentou atividade leishmanicida sobre formas promastigotas e amastigotas intracelulares *in vitro*;
- 2- O HMP reverteu o efeito inibitório causado pela *L. amazonensis* no que diz respeito à produção de ROS;
- 3- O HMP promoveu alterações ultraestruturais sugestivas de morte celular por apoptose;
- 4- O HMP em forma de pomada demonstrou efeito leishmanicida *in vivo*;
- 5- O HMP em forma de pomada promoveu aumento na produção de fibras de colágeno *in vivo*;
- 6- O HMP em forma de pomada induziu o processo de cicatrização em modelo experimental de leishmaniose cutânea após o tratamento tópico.

7 PRODUÇÃO TÉCNICA

- **Patente internacional (Europa):**

RODRIGUES, A. P. D., SANTOS, A.S., SILVA, E. O., ALVES, C. N., DO NASCIMENTO, J. L. M., CARVALHO, A.S.C. Use of 5-hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pyrone as a macrophage activation agent to combat cutaneous leishmaniasis. Publicada em 18 de fevereiro de 2010
Registro: WO2010017613A1 (Anexo II)

- **Patente nacional:**

RODRIGUES, A. P. D., SANTOS, A.S., SILVA, E. O., ALVES, C. N., DO NASCIMENTO, J. L. M., CARVALHO, A. S. C. Uso do 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona como agente de ativação do macrófago no combate da leishmaniose cutânea. Publicada em 11 de Janeiro de 2011. Registro: PI0817954-9 A2 (Anexo III).

- **Patente internacional (EUA):**

RODRIGUES, A. P. D., SANTOS, A.S., SILVA, E. O., ALVES, C. N., DO NASCIMENTO, J. L. M., CARVALHO, A.S.C. Use of 5-hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pyrone as a macrophage activation agent to combat cutaneous leishmaniasis. Publicada em 21 de Julho de 2011. Registro: US20110178169A1 (Anexo IV).

8 PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- **17th International Congresso of Microscopy – 19-24 de Setembro de 2010**

Trabalho apresentado: Murine macrophages treated with 5-hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pyrone (HMP), obtained from *Aspergillus* fungi, presented cytoskeleton alterations and increase phagocytic activity (Anexo V)

- **XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia/ XXXVII Reunião Anual sobre Pesquisa básica em Doença de Chagas – 25-27 de outubro de 2010**

Trabalho apresentado: 5-hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pyrone obtained from *Aspergillus* fungi has antileishmanial activity *in vivo* (Anexo VI)

- **II Encontro Anual Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB) – 08-10 de novembro de 2010**

Trabalho apresentado (oral e pôster): *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of HMP obtained from *Aspergillus* fungi (Anexo VII)

9 DOUTORADO SANDUÍCHE

Doutorado sanduíche realizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no período de 12 de janeiro a 12 de fevereiro de 2011, através do PROCAD NF21/2009 e INCT-INBEB.

10 PREMIAÇÃO

Melhor Pôster do II Encontro Anual do INBEB, Categoria mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos. (Anexo VIII)

11 REFERÊNCIAS

- ABREU-SILVA, A.L. et al. Extracellular matrix alterations in experimental murine *Leishmania (L.) amazonensis* infection. **Parasitology**, v. 128, n. 4, p. 385-390, 2004.
- ADADE C. M.; SOUTO-PADRÓN T. Contributions of Ultrastructural Studies to the Cell Biology of Trypanosomatids: Targets for Anti-Parasitic Drugs. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 178-187 2010.
- ALAVI-NAINI, R.; FAZAELI, A.; O'DEMPSEY, T. Topical treatment modalities for old world cutaneous leishmaniasis: a review. **Prague medical report**, v. 113, n. 2, p. 105-18, 2012.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 8(16), p.2689-99, 2007.
- ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **Journal of medical microbiology**, v. 56 (PT 2), p. 143-53, 2007.
- ASSIS, R.R. et al. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1820, n. 9, p. 1354-65, 2012.
- AZZAM, O.A.; LEHETA, T.M.; NAGUI, N.A.; SHAARAWY, E.; HAY, R.M.; HILAL, R.F. Different therapeutic modalities for treatment of melasma. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 8(4), p. 275-81, 2009.
- BAILEY, M.S.; LOCKWOOD, D.N.J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in dermatology**, v. 25, p. 203-21, 2007.
- BALDWIN, T. et al. Wound healing response is a major contributor to the severity of cutaneous leishmaniasis in the ear model of infection *Parasite Immunology*, v. 29(10), p.501-13, 2007.

BAÑULS, A.L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in parasitology**, v. 64, p. 1-109, 2007.

BAUM, C.L.; ARPEY, C.J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic surgery**, v. 31, p. 674-686, 2005.

BEANES, S.R. et al. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, n. 08, p. 1-11, 2004.

BENTLEY, R. From *miso*, *sake* and *shoyu* to cosmetics: a century of science for kojic acid. **Natural product reports**, v. 23, p. 1046-62, 2006.

BLUMENTHAL, C.Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 39, p. 214-28, 2004.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 15, n. 1, p. 22-8, 1999.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Normas e Manuais Técnicos. Editora MS, 2ª edição atualizada, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Serviço de Vigilância em Saúde**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf. Último acesso em: 31/01/2012.

BURDOCK, G.A.; SONI, M.G.; CARABIN, I.G. Evaluation of health aspects of kojic acid in food. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 33, p. 80-101, 2001.

CAMPANELLI, A.P. et al. Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. **Human immunology**, v. 71, n. 12, p. 1220-7, 2010.

CHAGAS, A.C.; PESSOA, F.A.C.; DE MEDEIROS, J.F.; PY-DANIEL, V.; MESQUITA, É. C.; BALESTRASSI, D.A. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em uma vila de exploração de minérios - Pitinga, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. **Brazilian journal of epidemiology**, v. 9(2), p. 186-92, 2006.

CHANG T. An updated review of tyrosinase inhibitors. **International journal of molecular sciences**, v.10, p. 2440-75, 2009.

COSTA, J.P. et al. Differentiation of human monocytes in vitro by 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-gamma-pyrone (HMP), a bioproduct obtained from *Aspergillus* fungi. In 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro. **Anais do Congresso Internacional de Biologia Celular**, 2012.

CROFT, S.L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. **Clinical microbiology and infection**, v. 17, n. 10, p. 1478-83, 2011.

CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 399-410, 2006.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, 19 (1):111-126, 2006.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and molecular pathology**, 72:132-41, 2002.

DERMINE, J.F. et al. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. **Cellular microbiology**, v. 2, n. 2, p. 115-26, 2000.

DERMINE, J.F. et al. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. **Cellular microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1263-70, 2005.

DIAS, F.C. et al. Organization of H locus conserved repeats in *Leishmania (Viannia) braziliensis* correlates with lack of gene amplification and drug resistance. **Parasitology research**, v. 101, p. 667-76, 2007.

DJAVAHERI-MERGNY, M. et al. NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. **The Journal of biological chemistry**, v. 281(41), p.30373-82, 2006.

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

EL-ON, J.; LANG, E.; KUPERMAN, O.; AVINOACH, I. *Leishmania major*: histopathological responses before and after topical treatment in experimental animals. **Experimental parasitology**, v. 68(2), p.144-54, 1989.

EMAMI, S.; HOSSEINIMEHR, S. J.; TAGHDISI, S. M.; AKHLAGHPOOR, S. Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, p. 45-48, 2007.

FARIAS, L.H.S. et al. Phosphatidylserine exposure and surface sugars in *two Leishmania (Viannia) braziliensis* strains involved in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **The journal of infectious diseases**, v. 207, n. 3, p. 537-43, 2013.

FERREIRA, N.R. et al. Biotransformation of sucrose into 5-hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pirone by *Aspergillus flavus*. **Annals of the Brazilian academy of sciences**, v. 82, n. 3, p. 569-76, 2010.

FICKOVA, M.; PRAVDOVA, E.; RONDHAL, L.; UHER, M.; BRTKO, J. *In Vitro* Antiproliferative and cytotoxic activities of novel kojic acid derivatives: 5-benzyloxy-2-selenocyanatomethyl- and 5-methoxy-2-selenocyanatomethyl-4-pyranone. **Journal of applied toxicology**, v. 28, n. 4, p. 554-9, 2008.

FITZPATRICK, J.M.; HIRAI, Y.; HIRAI, H; HOFFMANN, K.F. *Schistosoma* eggproduction is dependent upon the activities of two developmentally regulated tyrosinases. **FASEB journal**, v. 21, n. 3, p. 823-35, 2007.

FRADE, P.C.R. et al. Effects of 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-gamma-pyrone (HMP), a secondary metabolite obtained from *Aspergillus* fungi, on human neutrophils. In 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro. **Anais do Congresso Internacional de Biologia Celular**, 2012.

FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Research in microbiology**, v. 155, n. 4, p. 224-30, 2004.

GOMES, A.J.; LUNARDI, C.N.; GONZALEZ, S.; TEDESCO, A.C. The antioxidant action of *Polypodium leucotomos* extract and kojic acid: reactions with reactive oxygen species. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 34, n. 11, p. 1487-94, 2001.

GOMES, D.C.O. et al. Effectiveness of the immunomodulatory extract of *Kalanchoe pinnata* against murine visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 137, n. 4, p. 613-8, 2010.

GOMES-SILVA, A. et al. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection? **Clinical and experimental immunology** 149:440-44, 2007.

GREENHALGH, D.G. The role of apoptosis in wound healing. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 30, n. 9, p. 1019-30, 1998.

GRUENHEID, S.; FINLAY, B. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. **Nature**, v. 422, n. 6933, p. 775-81, 2003.

GUEIRARD, P.; LAPLANTE, A.; RONDEAU, C.; MILON, G.; DESJARDINS, M. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 1, p. 100-11, 2008.

GUIMARÃES-COSTA, A.B. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 106, n. 16, p. 6748-53, 2009.

HIGA, Y. et al. Kojic Acid – Absence of tumor-initiating activity in rat liver, and of carcinogenic and photo-genotoxic potential in mouse skin. **The journal of toxicological sciences**, v. 32, n. 2, p. 143-159, 2007.

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

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

HOSSEINIMEHR, S.J.; EMAMI, S.; ZAKARYAEE, V.; AHMADI, A.; MOSLEMI, D. Radioprotective effects of kojic acid against mortality induced by gamma irradiation in mice. **Saudi medical journal**, v. 30, n. 4, p.490-3, 2009.

JOSHI, P. B.; KELLY, B. L.; KAMHAWI, S.; SACKS, D. L.; MCMASTER, W. R. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. **Molecular & Biochemical Parasitology**, 120 33–40, 2002.

JIN, W.; ZJAWIONY J.K. 5-Alkylresorcinols from *Merulius incarnates*. **Journal of natural products**, v. 69, p. 704-06, 2006.

JUNQUEIRA, L.C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The histochemical journal**, v. 11, n. 4, p. 447-55, 1979.

KAVOOSI, G.; ARDESTANI, S. K.; KARIMINIA, A.; ABOLHASSANI, M.; TURCO, S. J. *Leishmania major*: Reactive oxygen species and interferon gamma induction by soluble lipophosphoglycan of stationary phase promastigotes. **Experimental Parasitology**, 114:323–328, 2006.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-15, 2011.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; BERTELS, S.; SIEMS, K. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 288-92, 2001.

KIM, J.H. et al. Enhancement of commercial antifungal agents by kojic Acid. **International journal of molecular sciences**, v. 13(11), p.13867-80, 2012.

KIM, J.H.; CAMPBELL, B.C.; CHAN, K.L.; MAHONEY, N.; HAFF, R.P. Synergism of antifungal activity between mitochondrial respiration inhibitors and kojic acid. **Molecules**, v.18(2), p.1564-81, 2013.

KONDO, Y.; KANZAWA, T.; SAWAYA, R.; KONDO, S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 5(9), p. 726-34, 2005.

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

LANDFEAR, S.M.; IGNATUSHCHENKO, M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. **Molecular and biochemical parasitology**, v.115(1), p.1-17, 2001.

LECOUER, H. et al. Optimization of topical therapy for *Leishmania major* localized cutaneous leishmaniasis using a reliable C57BL/6 Model. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 1 (2), p. e34, 2007.

LIM, J.T.E. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. **The Journal of dermatologic surgery**, v. 25, p. 282-84, 1999.

LIN, C.; WU, H.; HUANG, Y. Combining high-performance liquid chromatography with on-line microdialysis sampling for the simultaneous determination of ascorbyl glucoside, kojic acid, and niacinamide in bleaching cosmetics. **Analytica chimica acta**, v. 581, p. 102-07, 2007.

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

LODGE, R.; DIALLO, T.O.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 12, p. 1922-31, 2006.

LU, Y.; AZAD, N.; WANG, L.; IYER, A.K.; CASTRANOVA, V.; JIANG, B.H.; ROJANASAKUL Y. Phosphatidylinositol-3-kinase/AKT regulates bleomycin-induced fibroblast proliferation and collagen production. **American journal of respiratory cell and molecular biology**. v. 42(4), p.432-41, 2010.

MA, G. et al. Antimicrobial and antileishmanial activities of hypocrellins A e B. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4450-52, 2004.

MCCONVILLE, M.J.; MULLIN, K.A.; ILGOUTZ, S.C.; TEASDALE, R.D. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66(1), p.122-54, 2002.

MI HA, Y.; CHUNG, S. W.; SONG, S.; LEE, H.; SUH, H.; CHUNG, H. Y. 4-(6-Hydroxy-2-naphthyl)-1,3-benzendiol: a potent new tyrosinase inhibitor. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 9, p. 1711-15, 2007.

MILLE, M.; NANCHAHAL, J. Advances in the modulation of cutaneous wound healing and scarring. **Biodrugs**, v. 19 (6), p. 363-381, 2005.

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

MITTRA, B. et al. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 6, n. 6, p. 527-41, 2000.

MOHAMMADPOUR, M.; BEHJATI, M.; SADEGHI, A. Wound healing by topical application of antioxidant iron chelators : kojic acid and deferiprone. **International wound journal**, [epub ahead of print], 2012.

MOTO, M.; MORI, T.; OKAMURA, M.; KASHIDA, Y.; MITSUMORI, K. Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice. **Archives of toxicology**, v. 80, p. 299-304, 2006.

MOURA, T.R.; JESUS, A.R.; ALMEIDA R.P. Terapêutica da Leishmaniose Tegumentar. In: BARRAL, A.; COSTA, J.M.L. **Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas**. Salvador-BA, CNPq, 2011. 1ª ed., cap.15, p. 154-168.

MUKBEL, R.M. et al. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 76, n. 4, p. 669-75, 2007.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal of the german society of dermatology**, v. 6, n. 9, p. 754-65, 2008.

NIIMI, K. et al. Chemosensitization of fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and pathogenic fungi by a D-octapeptide derivative. **Antimicrobial agents chemotherapy**, v. 48(4), p.1256-71, 2004.

NIWA, Y. & AKAMATSU, H. Kojic acid scavenges free radicals while potentiating leukocyte functions including free radical generation. **Inflammation**, v. 15, n. 4, p. 303-154, 1991.

NOHYNEK, G.J.; KIRKLAND, D.; MARZIN, D.; TOUTAIN, H.; LECLERC-RIBAUD, C.; JINNAI, H. An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. **Food and chemical toxicology**, v. 14,

p. 93-105, 2004.

NURDEN, A. T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. **Thrombosis and haemostasis**, v. 105 Suppl., n. 6, p. S13-33, 2011.

NYLÉN S.; EIDSMO L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 34, p. 551–561, 2012.

OLIVIER M.; GREGORY D.J.; FORGET G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical microbiology reviews*, v. 18(2), p.293-305, 2005.

PALUMBO, E. Current treatment for cutaneous leishmaniasis: a review. **American journal of therapeutics**, v. 16, n. 2, p. 178-82, 2009.

PARIS, C.; LOISEAU, P.M.; BORIES, C.; BRÉARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial agents chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 852-59, 2004.

PASSERO, L.F.D.; LAURENTI, M.D.; SANTOS-GOMES, G. 2011. Modelos roedores utilizados no estudo da leishmaniose tegumentar americana. In: Barral A, Costa JML. **Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas**. Salvador-BA, CNPq, 2011. Vol. 1ª ed., cap.8, P: 74-89.

PIMENTEL-ELARDO, S.M. et al. Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. **Marine drugs**, v. 8, n. 2, p. 373-80, 2010.

PINHEIRO, R.O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, v. 80, n. 16, p. 7-8, 2004.

PIRES, A. et al. Aspectos imunológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: Uma revisão. **Revista de ciências da saúde**, v. 14, n. 1, p. 30-39, 2012.

PIRMEZ, C. et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **The Journal of clinical investigation**, v. 91, n. 4, p. 1390-5, 1993.

PROUDFOOT, L. et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 93, n. 20, p. 10984-9, 1996.

RAHMAN M, ET AL. Phase iv trial of miltefosine in adults and children for treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) in bangladesh. **American society of tropical medicine and hygiene**. v. 85(1), p. 66-9, 2011.

RAMALHO-ORTIGAO, M.; SARAIVA, E. M; YARA; TRAUB-CSEKÖ, M. Sand fly-*leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 195-204, 2010.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER. S. Cutaneous leishmaniasis. **The lancet infectious diseases**, v. 7, p. 581-96, 2007.

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

ROBSON, M.C.; STEED, D.L.; FRANZ, M.G. Wound Healing: Biologic Features and Approaches to Maximize Healing Trajectories. **Current Problems in Surgery**, v. 38, n. 2, p. 72-140, 2001.

ROCHA-VIEIRA, E. et al. Histopathological outcome of *Leishmania major*-infected BALB/c mice is improved by oral treatment with N-acetyl-l-cysteine. **Immunology**, v. 108, n. 3, p. 401-8, mar. 2003.

RODRIGUES, A.P.D.; CARVALHO, A.S.; SANTOS, A.S.; ALVES, C.N., DO NASCIMENTO, J.L., SILVA, E.O. Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation. **Cell biology international**. v. 35(4), p. 335-43, 2011.

RODRIGUES, J. C. F.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 925-938, 2008.

ROY, R.; BHATTACHARYA, G.; SIDDIQUI, K.A.; BHADRA, R. A new antileishmanial compound, phaseolinone. **Biochemical and biophysical research communications**. v. 168(1), p. 43-50, 1990.

ROY, P. et al. Biological targeting and drug delivery in control of Leishmaniasis. **Journal of cell and animal biology**, v. 6, n. 6, p. 73-87, 2012.

SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 11, p. 1668-79, 2011.

SAKTHIANANDESWAREN, A. et al. The wound repair response controls outcome to cutaneous leishmaniasis. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15551-6, 2005.

SALAH, A.B. et al. Topical Paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. **The new england journal of medicine**, v. 368, p. 524-532, 2013.

SALDANHA, A.C.R. et al. Cura clínica na Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79 (Supl.3), p. 52-61, 2009.

SANTA-RITA, R.M., HENRIQUES-PONS, A., BARBOSA, H.S., CASTRO, S.L. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 54, p. 704-10, 2004.

SANTORO, M.M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental cell research**, v. 304, n. 1, p. 274-86, 2005.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 18, n. 12, p. 1056-69, 2011.

SERENO, D.; CORDEIRO DA SILVA, A.; MATHIEU-DAUDE, F.; OUAISSI, A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitology international**, v. 56, p.3-7, 2007.

SILVA-ALMEIDA, M. et al. Extracellular matrix alterations in experimental *Leishmania amazonensis* infection in susceptible and resistant mice. **Veterinary research**, v. 43, p.10, 2012.

SILVEIRA, F.T. Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Gazeta médica da Bahia**, v. 79, Suple. 3, p. 25-29, 2009.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-51, 2004.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 525-34, 2005.

SRIVASTAVA, I.K.; VAIDYA, A.B. A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43(6), p.1334-9, 1999.

SÜLSEN, V.P. et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids from Argentine medicinal plants. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 4, p. 654-9, 2007.

TAMURA, T. et al. Absence of *in vivo* genotoxic potential and tumor initiation activity of kojic acid in the rat thyroid. **Toxicology**, v. 222, p. 213-224, 2006.

THI, E.P.; LAMBERTZ, U., REINER, N.E. Sleeping with the enemy: how intracellular pathogens cope with a macrophage lifestyle. **Plos pathogens**. v. 8(3): e1002551, 2012.

TEIXEIRA, C.R. et al. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 12, p. 8346-53, 2005.

TEMPONE, A.G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 5, p. 382-90, 2005.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immuneresponse to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 51, p. 229-242, 2007.

UEDA-NAKAMURA, T. ATTIAS, M., DE SOUZA, W. Megasome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. **Parasitology Research**, v. 87(2), p. 89-97, 2001.

VALADARES, D.G. et al. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitology international**, v. 60, n. 4, p. 357-63, 2011.

VAN ASSCHE, T. et al. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free radical biology & medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-51, 2011.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309-22, 2012.

VANNIER-SANTOS, M.A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current pharmaceutical design**; v.8(4), p. 297-318, 2002.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. **LEISHMANIA** disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v. 103 (37), p. **13837–13842, 2006.**

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **The journal of international medical research**, v. 37, n. 5, p. 1528-42, 2009.

VENDRAMETTO, M.C.; SANTOS, A.O.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.;

CORTEZ, D.A.; UEDA-NAKAMURA, T. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *Pallescens*. **Parasitology international**, v. 59(2), p.154-8, 2010.

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

WANDERLEY, J. L. M.; MOREIRA, M. E. C.; BENJAMIN, A.; BONOMO, A. C.; BARCINSKI, M. A. Mimicry of Apoptotic Cells by Exposing Phosphatidylserine Participates in the Establishment of Amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in Mammalian Hosts. **The Journal of Immunology**, 176:1834–1839, 2006.

WINBERG, M.E.; RASMUSSEN, B.; SUNDQVIST, T. *Leishmania donovani*: inhibition of phagosomal maturation is rescued by nitric oxide in macrophages. **Experimental parasitology**, v. 117, n. 2, p.165-70, 2007.

ZHAI, L. et al. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. **The journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 793-803, 1999.

ANEXOS

ANEXO I



DECLARAÇÃO CEPAE 008/2008

Projeto: ESTUDO DOS EFEITOS DE UM METABÓLITO SECUNDÁRIO ISOLADO DE FUNGOS DO GÊNERO ASPERGILLUS SOBRE O PROTOZOÁRIO LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS E A CÉLULA HÓSPEDEIRA

Coordenadora: Profa. Dra. Edilene Oliveira da Silva

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado "ESTUDO DOS EFEITOS DE UM METABÓLITO SECUNDÁRIO ISOLADO DE FUNGOS DO GÊNERO ASPERGILLUS SOBRE O PROTOZOÁRIO LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS E A CÉLULA HÓSPEDEIRA" foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE) pelo Pesquisador Responsável, Profa. Dra. Edilene Oliveira da Silva, e recebeu o número de protocolo CEPAE11008-2008.

Belém, 10 de Abril de 2008

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Antônio Pereira', is written over a faint, circular, stylized stamp or watermark.

Prof. Dr. Antônio Pereira
Presidente do CEPAE/UFPa

ANEXO II

PATENTE INTERNACIONAL EUROPEIA

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
18 February 2010 (18.02.2010)(10) International Publication Number
WO 2010/017613 A1

PCT

(51) International Patent Classification:
A61K 31/351 (2006.01) A61P 33/02 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/BR2009/000254(22) International Filing Date:
14 August 2009 (14.08.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
Prot. 000185/08 14 August 2008 (14.08.2008) BR(71) Applicant (for all designated States except US): UNI-
VERSIDADE FEDERAL DO PARÁ [BR/BR]; Av. Au-
gusto Correa, 01, Guamá, 66075-900 Belém - PA (BR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SANTOS, Alber-
dan Silva [BR/BR]; Av. Augusto Correa, 01, Cidade Uni-
versitária José Silveira Netto, Guamá, 66075-110 Belém -
PA (BR). SILVA, Edilene Oliveira da [BR/BR]; TV D.
Romualdo de Seixas, 1398 - Apto. 104, Umarizal,
66055-200 Belém - PA (BR). NASCIMENTO, José
Luiz Martins do [BR/BR]; TV D. Romualdo de Seixas,
1398 - Apto. 104, Umarizal, 66055-200 Belém - PA
(BR). ALVES, Cláudio Naum [BR/BR]; Conjunto
Cidade Nova VIII, WE 39-A, casa 521, Coqueiro,
Ananindeua - PA (BR). RODRIGUES, Ana Paula Dr-
mond [BR/BR]; TV Pirajá 1877, Apto. 304, Bloco B,
66095-470 Belém - PA (BR). CARVALHO, Antônio
Sérgio da Costa [BR/BR]; TV Sétima 62, Bairro Novo,
67100-000 Marituba - PA (BR).(74) Agent: SCHULZ, Claudia Christina; Av. Almirante
Barroso, 52 - 33 andar, Centro, 20031-000 Rio de Janeiro
(BR).(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments (Rule 48.2(h))

WO 2010/017613 A1

(54) Title: USE OF 5-HYDROXY-2-HYDROXYMETHYL- Y -PYRONE (HMP) AS A LEISHMANICIDAL AGENT

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

ANEXO III

PATENTE NACIONAL



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0817954-9 A2**

(22) Data de Depósito: 14/08/2008
(43) Data da Publicação: 11/01/2011
(RPI 2088)



(51) *Int.Cl.*:
A61K 31/351
A61P 33/02

(54) Título: **USO DO 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL-(GAMA)-PIRONA COMO AGENTE DE ATIVAÇÃO DO MACRÓFAGO NO COMBATE DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

(73) Titular(es): Universidade Federal do Pará

(72) Inventor(es): Alberdan Silva Santos, Ana Paula Drumond Rodrigues, Antônio Sérgio Costa Carvalho, Cláudio Naum Alves, Edilene Oliveira da Silva, José Luiz Martins do Nascimento

(57) Resumo: Uso do 5-hidroxi-2-hidroximetil-γ-pirona como agente de ativação do macrófago no combate da Leishmaniose Cutânea. A presente patente refere-se a utilização do HMP (um metabólito secundário produzido por fungo filamentosos), como agente de estimulação da atividade microbicida do macrófago para atuação no combate da Leishmaniose Cutânea (LC) causada pelo protozoário Leishmania (Leishmania) amazonensis. O principal mecanismo de ação foi a ativação da atividade microbicida destas células hospedeiras através do aumento da produção de radicais de oxigênio, aumento da quantidade de lisossomos, aumento dos filamentos de actina e microtúbulos, e do aumento do espalhamento característico do estado de ativação dessas células, eliminando o agente da infecção. Neste sentido a busca de moléculas de fácil obtenção e que não dependam de sazonalidade, além de apresentarem um mecanismo eficiente de combate e que não cause reações adversas é apresentado pelo HMP, um candidato potencial para uso no combate a LC na concentração mínima de 50 µg/mL. Portanto, o resultado apresentou alta atividade leishmanicida, que qualifica o uso do HMP como um potente candidato ao combate da leishmaniose cutânea.

ANEXO IV

PATENTE INTERNACIONAL USA



US 20110178169A1

(19) **United States**(12) **Patent Application Publication**
Santos et al.(10) **Pub. No.: US 2011/0178169 A1**(43) **Pub. Date: Jul. 21, 2011**(54) **USE OF
5-HYDROXY-2-HYDROXYMETHYL-Y-
PYRONE (HMP) AS A LEISHMANICIDAL
AGENT**(76) **Inventors:** **Alberdan Silva Santos**, Belem-PA
(BR); **Edilene Oliveira Da Silva**,
Belem-PA (BR); **Jose Luiz Martins
do Nascimento**, Belem-PA (BR);
Claudio Naum Alves,
Ananindeua-PA (BR); **Ana Paul
Drumond Rodrigues**, Belem-PA
(BR); **Antonio Sergio da Costa
Carvalho**, Marituba-PA (BR)(21) **Appl. No.: 13/058,899**(22) **PCT Filed: Aug. 14, 2009**(86) **PCT No.: PCT/BR2009/000254**§ 371 (c)(1),
(2), (4) **Date: Mar. 31, 2011**(30) **Foreign Application Priority Data**

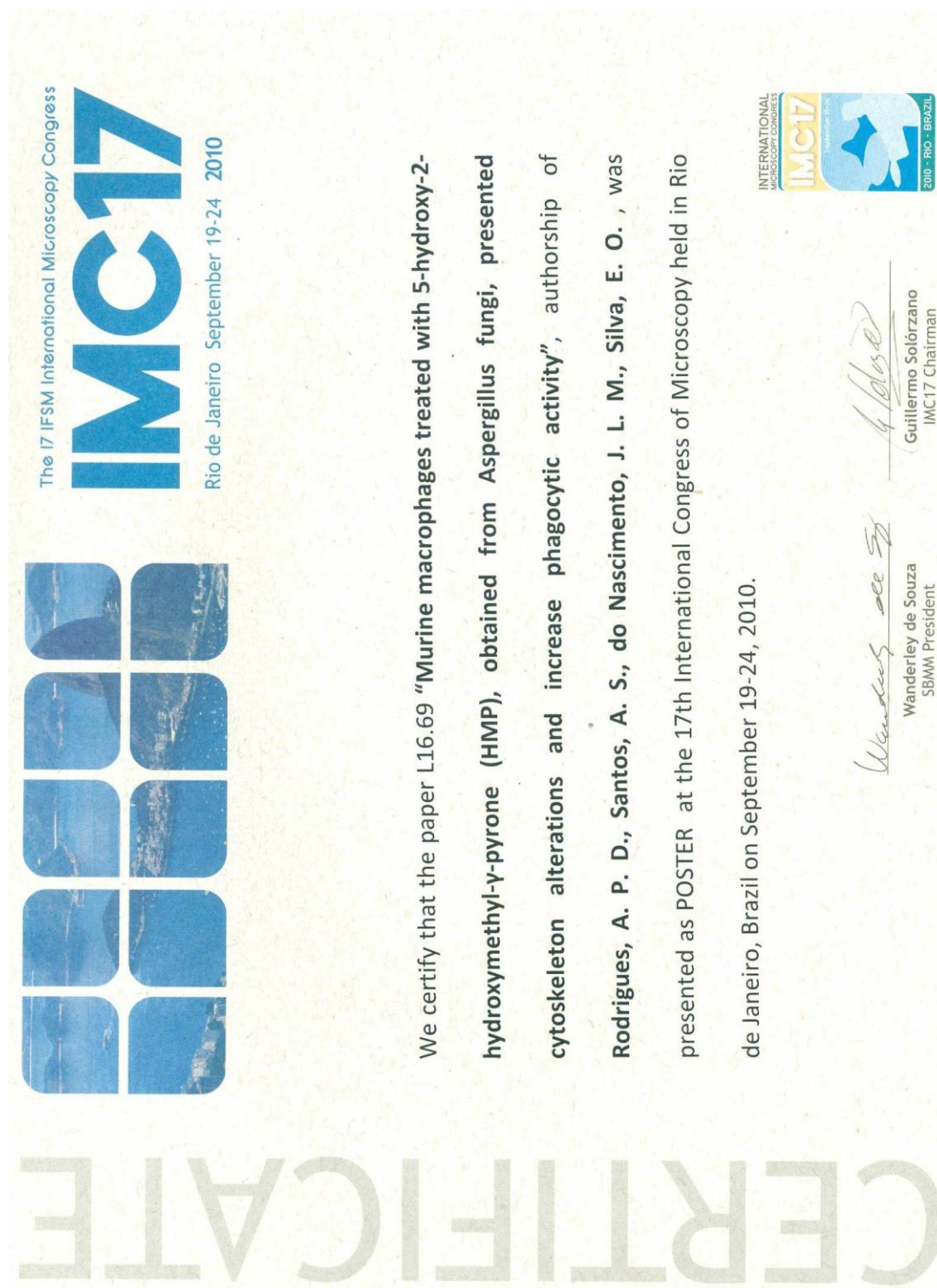
Aug. 14, 2008 (BR) PROT. 000185/08

Publication Classification(51) **Int. Cl.**
A61K 31/366 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C07D 309/38 (2006.01)
A61P 33/00 (2006.01)
(52) **U.S. Cl. 514/460; 435/375; 549/294**(57) **ABSTRACT**

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

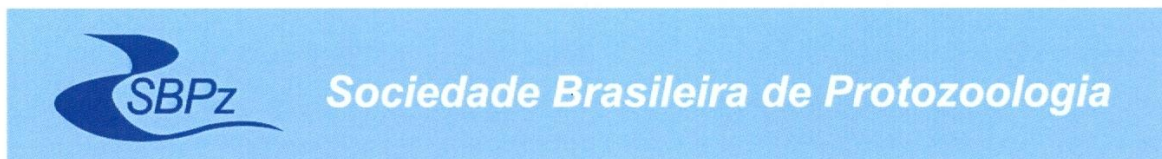
ANEXO V

PARTICIPAÇÃO EM EVENTO



ANEXO VI

PARTICIPAÇÃO EM EVENTO



CERTIFICATE

We hereby certify that the abstract entitled *5-hydroxy-2-hydroxymethyl-γ-pyrone (HMP)*,
obtained from *Aspergillus fungi* has antileishmanial activity *in vivo*
by authors *Rodrigues, A.P.D.; Farias, L.H.S.; Santos, A.S.; Nahum, C.A.; De Mascimento,
J.L.M.; Silva, E.O.*

was presented during the XXVI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology /
XXXVII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease in Foz do Iguaçu, Paraná,
Brasil, from October 25 to 27, 2010.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Angela Kaysel Cruz'.

Angela Kaysel Cruz
President

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M Carolina Elias'.

M Carolina Elias
Secretary

PARTICIPAÇÃO EM EVENTO

II Encontro Anual do INBEB 2009 – 2010

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem

Certificado

Certifico que **Ana Paula Drummond Rodrigues** participou como palestrante no II Encontro Anual do INBEB, realizado nos dias 08, 09 e 10 de novembro de 2010, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).


Coordenador do INBEB
Professor Jerson Lima da Silva

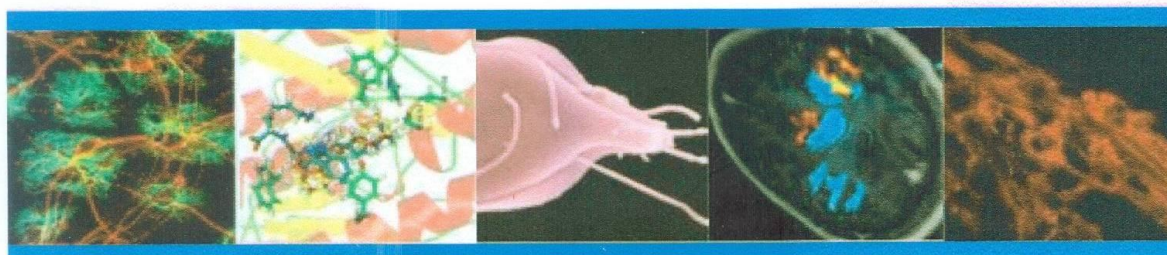
INBEB
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
de Biologia Estrutural e Bioimagem

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico

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

DECIT
Departamento de Ciência e Tecnologia

CAPEs



ANEXO VIII

PREMIAÇÃO

II Encontro Anual do INBEB 2009 – 2010

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem

Certificado

Certifico que **Ana Paula Drummond Rodrigues** recebeu prêmio de melhor pôster pelo trabalho “*IN VITRO AND IN VIVO ANTILEISHMANIAL ACTIVITY OF 5-HYDROXY-2-HYDROXYMETHYL- γ -PYRONE (HMP) OBTAINED FROM *ASPERGILLUS FUNGI*” no II Encontro Anual do INBEB, realizado nos dias 08, 09 e 10 de novembro de 2010, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).*


Coordenador do INBEB
Professor Jerson Lima da Silva

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

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico

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

DECIT
Departamento de Ciência e Tecnologia

CAPE S

