

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



KARINA PONTIN

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE BIOTERÁPICO E EXTRATO DE PRÓPOLIS "IN VITRO" E "IN VIVO" NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DETERMINADA POR *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS*

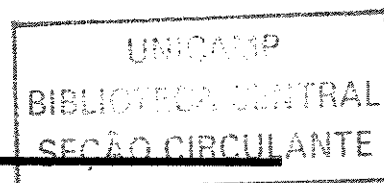
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Karina Pontin e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

CAMPINAS

- 2003 -



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/unicamp
	P778d
V	EX
TOMBO BC/	53486
PROC.	124703
C	D
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/04/03
Nº CPD	

bibid. 290738

CM00182598-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Pontin, Karina

P778d

Determinação da atividade biológica de bioterápico e extrato de própolis "in vitro" e "in vivo" na infecção experimental determinada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Karina Pontin. -- Campinas, SP:[s.n.], 2002.

Orientador: Sérgio de Albuquerque

Tese (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

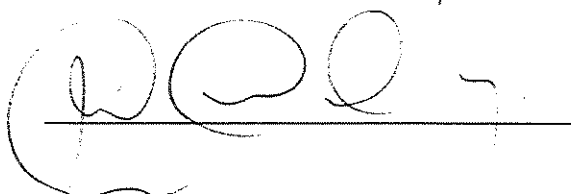
Instituto de Biologia

1. Óxido Nítrico. 2. Leishmaniose. I. Albuquerque, Sérgio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

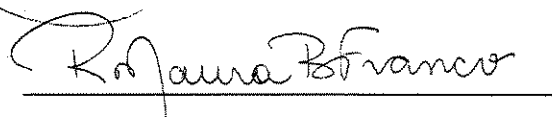
Campinas, 19 de fevereiro de 2003.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque



Profª. Dra. Regina Maura Bueno Franco



Profª. Dra. Vanda Barbosa dos Reis Toth



Prof. Dr. Odair Benedito Ribeiro



Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior



200315406

A Deus,

*“... Que, incomparável e inconfundível na sua infinita bondade,
compreendeu os meus anseios e me deu a necessária coragem para atingir o meu objetivo,
ofereço o meu porvir e peço forças para que eu possa sempre agir com eficiência em meu
trabalho e acerto em minhas decisões”.*

Ao Santo Expedito, São Judas Tadeu e Santo Antônio,

Vocês nunca me faltaram,

Obrigado, Obrigado e Obrigado.

*Ao Fabrício,
agradeço a sua compreensão, o seu amor, e a sua paciência que me
transmitiu em todos os momentos difíceis da minha vida.*

Obrigado por você existir.

Te Amo Demais!

*Aos meus pais João e Nilza,
por mais belas e sinceras que sejam as palavras
ditas neste momento, serão sempre insuficientes
para traduzir o meu amor por vocês.*

*Obrigado pelo apoio,
dedicação e carinho.*

Amo vocês!

*A minha titia Áurea e irmãzinhas Tati e Dolly,
a vocês, que nos vários momentos da minha vida estiveram sempre
ao meu lado, apoiando, sofrendo, sorrindo e amando.*

Agradeço por tê-las como tia e irmãs.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, meu orientador, graças a sua paciência, à sua perspicácia e, principalmente, à sua sabedoria, foram fundamentais para essa vitória. Obrigado por tudo!

Ao Prof. Dr. José Clovis do Prado Junior e a Prof. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão, professores da disciplina de Parasitologia, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pelo companheirismo, pela ajuda e amizade durante todo esse trajeto.

Ao Prof. Dr. Elza, obrigado por fornecer o Laboratório de Homeopatia e pelas explicações dadas durante a realização deste trabalho.

Aos docentes, funcionários e alunos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo apoio, incentivo e amizade.

A Miriam Paula Alonso Toldo, técnica da disciplina de Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela amizade que cresceu entre nós e pela ajuda no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos técnicos da disciplina de Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, principalmente a Toninha e Georgius, por tonarem o ambiente divertido nas horas vagas.

Aos meus colegas do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, por sempre estarem ao meu lado, me auxiliando nos momentos difíceis.

A Margareth, Andréia e Rose, pela paciência e dedicação que vocês tiveram durante todo esse período.

A Valdelicie, pós-graduanda do Instituto de Biologia, do Departamento de Biologia – UNICAMP, por me transmitir suas experiências, tranquilidade, confiança e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos que eu precisei.

A Janaína, pós-graduanda do Instituto de Biologia, do Departamento de Biologia – UNICAMP, pelas inúmeras ajuda e pela amizade sincera que construímos juntas.

A Elaine, pós-graduanda do Instituto de Biologia, do Departamento de Biologia – UNICAMP, pelo apoio, amizade e incentivo que nunca me faltou.

A todos, que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho.

Aos animais utilizados no experimento, cuja colaboração involuntária foi essencial.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1. RESUMO	xiv
2. ABSTRACT	xv
3. INTRODUÇÃO	1
3.1. Diagnóstico da Leishmaniose	6
3.2. Resposta Imunológica à Leishmania	8
3.3. Quimioterapia da Leishmaniose	11
3.4. Própolis na Terapêutica	20
3.5. A Homeopatia como Terapêutica	24
4. CAPÍTULO I – Avaliação da Atividade Biológica <i>in vitro</i> do Extrato da Própolis e do Bioterápico, sobre as Formas Promastigotas e Amastigotas de <i>Leishmania (Viannia)</i> <i>braziliensis</i> .	31
4.1. Resumo	31
4.2. Introdução	32
4.3. Material e Métodos	33
4.3.1. Parasitas	33
4.3.2. Preparações avaliadas	33
4.3.3. Meio de Cultura	35

4.3.4. Ensaaios Biológicos <i>in vitro</i>	35
4.3.4.1. Formas promastigotas	35
4.3.4.2. Formas amastigotas	36
4.4. Resultados e Discussão	38
5. CAPÍTULO II - Atividade Biológica do Extrato de Própolis e do Bioterápico no Tratamento de <i>Mus musculus</i> Experimentalmente Infectados por <i>Leishmania (Viannia)</i> <i>braziliensis</i> .	47
5.1. Resumo	47
5.2. Introdução	48
5.3. Material e Métodos	49
5.3.1. Preparações avaliadas	49
5.3.2. Ensaaios Biológicos <i>in vivo</i>	50
5.4. Resultados e Discussão	52
6. CAPÍTULO III – Determinação da Produção de Óxido Nítrico pela Própolis e por Bioterápico Produzido a partir de Formas Promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .	58
6.1. Resumo	58
6.2. Introdução	59
6.3. Material e Métodos	60

6.3.1. Preparações avaliadas	60
6.3.1. Detecção de óxido nítrico	61
6.4. Resultados e Discussão	62
7. CONCLUSÕES GERAIS	66
8. REFERÊNCIAS	68
9. ANEXO	86

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

CCE – Controle com estímulo

CSE – Controle sem estímulo

CH – Escala centesimal

Células T CD4 – Linfócitos T auxiliares

DH – Escala decimal

DL – Dose letal

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxiribonucleico

Elisa – Enzyme-linked immunosorbent assay

FTS – Fator tímico sérico

GDP – Guanina Difosfato

GTP – Guanina trifosfato

IC₅₀ – Coeficiente de Inibição

IL – Interleucina

INF- γ - Interferon – gama

KCL – Cloreto de potássio

KOH – Hidróxido de potássio

LC – Leishmania Cutânea

L-NMMA – N-mono metil-L-arginina

LPS - Lipopolissacáride

LIT – Liver Infusion Triptose

LM – Leishmania Mucosa

LTA – Leishmania Tegumentar Americana

LV – Leishmania Visceral

NO – Óxido Nítrico

ORL – Otorrinolaringologia

NOSi – Enzima óxido nítrico sintase induzida

PCR – Polymerase chain reaction

Sb – Metalóide antimônio

SbIII – Antimonial trivalente

TC D – Tripanosominum

TGF- β - Transforming growth factor - β

Th1 – Células T “helper” 1

Th2 – Células T “helper” 2

TM – Tintura mãe

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral

1. RESUMO

Os antimoniais são atualmente as drogas de escolha para o tratamento da Leishmaniose, porém apresentam problemas como uma grave toxicidade e situações de resistência parasitária. Muitos autores vêm averiguando a possibilidade dos produtos de origem vegetal e animal desempenharem importante papel na terapêutica desta enfermidade, promovendo uma menor toxicidade e custo inferior. No presente trabalho foi avaliada a atividade leishmanicida de um extrato da própolis, produto apiterápico, e de um bioterápico, medicamento homeopático, sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, por meio de ensaios *in vitro*, e *in vivo* por meio do tratamento em animais *Mus musculus* experimentalmente infectados pelo parasita. Pelas observações decorrentes dos ensaios *in vitro*, a própolis apresentou sobre as formas promastigotas porcentagem de lise e valor de coeficiente de inibição (IC₅₀) melhores, quando comparados com o controle positivo (anfotericina B). Tanto o bioterápico quanto a própolis não apresentaram resultados satisfatório sobre as formas amastigotas. Nos ensaios *in vivo*, durante os 90 dias de tratamento com os compostos em análise, foi verificada a variação do diâmetro médio das lesões dos camundongos *Mus musculus* infectados com *L. (V.) braziliensis*, observando uma diminuição no tamanho das lesões. Ambos os compostos apresentaram resultados favoráveis em relação ao controle negativo (solução de cloreto de sódio à 0,9%). Sabendo-se da importância da produção do óxido nítrico (NO) para o controle da infecção sobre diversos parasitas intracelulares, foi avaliada a capacidade de indução de NO pela própolis e pelo bioterápico, observando uma indução significativa apenas no caso da própolis. Tais achados são animadores para uma pesquisa mais aprofundada em relação a estes diferentes tipos de medicamentos, como por exemplo, a caracterização química e o isolamento do princípio ativo da própolis, responsável pela atividade biológica, e a comprovação e padronização da metodologia homeopática no processo de inativação do bioterápico, a fim da melhoria da ação terapêutica.

2. ABSTRACT

Nowadays antimonials have been the drugs chosen for the Leishmaniasis treatment. Nevertheless, they have shown problems such as high toxicity and some parasite resistance occurrences. Many researchers have investigated the possibility that products from animal and vegetal origin may play an important role in the therapeutics of this disease, with less toxicity and lower prices. This work evaluates the leishmanicidal activity of propolis extract, an apitherapeutic product, and also of a biotherapeutic homeopathic drug over the *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigote and amastigote forms, through in vitro and in vivo assays by means of *Mus Musculus* animals treatment, which were experimentally infected. Resulting from the in vitro assays, propolis revealed a better lysis percentage and inhibition coefficient (IC 50) over the promastigote forms when compared to positive control (amphotericin B). Both the biotherapeutic drug and propolis extract did not show reasonable results over amastigote forms. Regarding to the in vivo assays, during a 90-day-treatment, a variation of the lesion mean diameter of the *Mus Musculus* mice infected by *L.(V.) braziliensis* was observed, there was a reduction in the lesion size. Both drugs showed good results in respect to negative control (0.9% saline solution). Being aware of the importance of NO production to control the infection on several intracellular parasites, the capacity of inducing NO production was evaluated using both propolis and biotherapeutics. An expressive induction was observed only concerning propolis. Such find encourages a further research on those drugs, for instance, the chemical characterization and the isolation of propolis active principles, responsible for its biological activity, as well as the standardization of homeopathic methodologies in the biotherapeutic inactivation with the purposes of a better therapeutic drug action.

3. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma infecção parasitária determinada por espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Possui um alto impacto social e econômico, sendo a segunda maior incidência parasitária, logo após a malária (LAINSON & SHAW, 1978), podendo ser considerada uma das seis parasitoses de maior importância mundial (BERMAN, 1998). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente 88 países se encontram atingidos pela leishmaniose, sendo que cerca de 12 milhões de pessoas estão infectadas e, aproximadamente 350 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a doença. A taxa de incidência anual de novos casos é de aproximadamente 2 milhões de indivíduos infectados, sendo, 1,5 milhões para a Leishmaniose Cutânea e 500 mil para a Leishmaniose Visceral (KAYSER *et al.* 2001).

Taxonomicamente, o gênero *Leishmania* pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, classe Zoomastigophorea, ordem Kinetoplastida, sub-ordem Trypanosomatina e família Trypanosomatidae, cujos gêneros são todos parasitas obrigatórios (MAGILL *et al.* 1993).

O gênero *Leishmania* compreende 27 espécies; entretanto, a classificação e identificação destas espécies são complexas, pois são baseadas em características intrínsecas, como morfologia, aspectos bioquímicos e análise de DNA e extrínsecas como aparência clínica das lesões e distribuição geográfica (SHAW, 1994; ASHFORD, 1997). Devido a esta complexidade, as espécies de leishmania que parasitam o homem são organizadas em 2 sub-gêneros: *Viannia* e *Leishmania*; ou ainda, em 2 grandes grupos, do Velho e do Novo Mundo. Estas classificações não são reciprocamente excludentes, sendo que o sub-gênero *Viannia* encontra-se exclusivamente no Novo Mundo e o sub-gênero *Leishmania* é encontrado no Velho e Novo Mundo (LAINSON & SHAW, 1992).

Ressalte-se que, neste último caso, considera-se apenas a localização geográfica onde são encontrados os parasitas como uma característica extrínseca, enquanto a classificação por sub-genêros leva em consideração a posição da forma promastigota no tubo digestivo do vetor (DESJEAUX, 1992).

Assim as formas promastigotas do sub-gênero *Viannia* são encontradas no intestino posterior do flebotomíneo, migrando para a parte anterior na fase de metaciclogênese, enquanto os promastigotas do sub-gênero *Leishmania* residem exclusivamente na região do intestino anterior (LAINSON & SHAW, 1992).

As leishmanioses do Novo Mundo são endêmicas em pelo menos 24 países das regiões tropical e sub-tropical, sendo o Brasil o país com a mais incidência (GRIMALDI *et al.* 1989).

Seis espécies do gênero *Leishmania* têm sido identificadas como causadoras de doença cutânea no Brasil, das quais cinco pertencem ao subgênero *Viannia*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Viannia) shawi*; e uma ao subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (SHAW, 1994). Provavelmente as duas espécies mais importantes pelo número de casos de infecção humana são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, VIANNIA (1911), e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (FLOCH, 1954).

A transmissão de *L. (V.) braziliensis* ocorre quando as fêmeas, hematófagas, de dípteros pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, infectadas com o parasita, inoculam a forma promastigota infectante na pele de várias espécies de mamíferos, ao realizar seu repasto sangüíneo. Após a inoculação das formas promastigotas, estas se diferenciam no hospedeiro em formas amastigotas, aflageladas, que se desenvolvem no interior dos macrófagos (GUPTA *et al.* 2001).

A metaciclogênese é um processo adaptativo das leishmanias que consiste na transformação de promastigotas não infectantes em formas infectantes ou promastigotas metacíclicos. Este processo tem sido associado a alterações enzimáticas, morfológicas (HOWARD *et al.* 1987), modificações na expressão dos antígenos de superfície (HOWARD *et al.* 1987; KWEIDER *et al.* 1987) e à ação do complemento (HOWARD *et al.* 1987).

Dados recentes sugerem que os mecanismos de resistência das formas promastigotas de *Leishmania* à ação do complemento, assim como os eventos iniciais da interação leishmania-macrófago, embora não completamente elucidados, sejam fundamentais para o estabelecimento e curso de infecção. Estes mecanismos estão relacionados a vários fatores, como a fase de desenvolvimento do parasita, a espécie e a expressão de antígenos de superfície na forma promastigota, durante o processo de metaciclogênese (SACKS, 1989).

A sobrevivência intracelular do parasita pode estar relacionada à rapidez de sua transformação em amastigota (LEWIS *et al.* 1974), uma vez que estas formas encontram-se melhor dotadas bioquimicamente e enzimaticamente para resistir aos mecanismos leishmanicidas dos macrófagos (PEARSON *et al.* 1983a).

As formas amastigotas localizados no interior dos macrófagos são organismos acidófilos, capazes de resistirem a ação microbicida das hidrólises ácidas, liberando lisoenzimas para sobreviver e multiplicar-se por divisão binária no interior dos macrófagos, até causar a lise da célula, sendo então fagocitadas novamente por outros macrófagos.(ZILBERSTEIN & SHAPIRA, 1994).

Sobre a infecção do homem e de várias outras espécies de mamíferos por tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, existe a dependência de complexas interações entre o parasito e o hospedeiro vertebrado, que iriam determinar a apresentação clínica e o curso evolutivo da leishmaniose. Estas interações se realizam entre duas formas do ciclo evolutivo das

leishmanias, (promastigotas desenvolvidos no inseto vetor e amastigotas intracelulares) e os macrófagos do hospedeiro (HARKER, 1992).

A *Leishmania Tegumentar Americana* (LTA) representa um conjunto de síndromes, cuja apresentação clínica é determinada tanto por fatores dependentes do parasita como da resposta imunológica do hospedeiro (HAMANN, 1989).

Ainda, HARKER (1992) relata que, apesar da reconhecida importância clínica da leishmaniose mucosa, causada por *L. (V.) braziliensis*, permanecem essencialmente desconhecidos os fatores determinantes da lesão mucosa. Além de ampliar nosso conhecimento sobre a história natural da doença, o entendimento das relações parasito-macrófago possibilitaria também alcançar melhores perspectivas relativas à quimioterapia, a imunoterapia e à prevenção da leishmaniose através de vacina.

A LTA, tendo o agente etiológico mais comum a *L. (V.) braziliensis*, caracteriza-se por lesões ulceradas com bordas elevadas, rígidas e violáceas, geralmente únicas (LIANOS-CUENTAS, 1984).

Essa linhagem é caracterizada por apresentar alta agressividade aos tecidos cutâneos e mucosos, escassez, difícil isolamento dos parasitos nos tecidos e resistência ao tratamento por antimonialis, podendo ocorrer, freqüentes recidivas da doença. Cinco por cento dos pacientes com lesões na mucosa evoluem para morte, por complicações (MARSDEN, 1985a).

As lesões em mucosas embora se apresentem em pequena percentagem dos pacientes com leishmaniose, constituem uma manifestação particularmente importante devido às seqüelas deformantes com conseqüências não só anatômicas como também psicológicas (MAGALHÃES *et al.* 1990).

Essas lesões caracterizam-se por comprometimento nasal, freqüentemente com perfuração do septo. Em dois terços dos pacientes, ficam estritamente restrito ao nariz, sendo que

no restante, são atingidos faringe, palato, laringe e lábios, nesta ordem de frequência, sendo a patologia laríngea potencialmente letal por obstrução direta das vias aéreas apresentando-se raramente de maneira isolada, diferente do que acontece com as lesões cutâneas que eventualmente podem apresentar cura espontânea, as lesões mucosas raramente se autolimitam, sendo de importância crucial o tratamento específico (MARSDEN *et al.* 1991).

A patologia mucosa constitui um fenômeno predominantemente associado com a infecção por *L. (V.) braziliensis*. Este fato leva a deduzir que características ligadas especificamente ao agente etiológico influenciam diretamente na gênese desta manifestação. É reconhecida a capacidade de *L. (V.) braziliensis* produzir lesões metastáticas em modelos animais (SCORZA *et al.* 1992) e tem-se demonstrado em humanos um potencial de disseminação parasitária por via linfática (BARRAL *et al.* 1992), inclusive antes de desenvolver evidências de patologia cutânea ou mucosa (MORAES *et al.* 1993).

A leishmaniose cutânea difusa é uma forma rara da doença, causada por *L. aethiopica*, no Velho Mundo, e espécies do complexo mexicana, *L. mexicana* e *L. amazonensis*, no Novo Mundo. Estes casos de infecção crônica e progressiva atingem 35% dos indivíduos infectados por estas espécies, constituindo basicamente de lesões não ulceradas, formada por uma pápula ou verruga que apresentam-se repleta de parasitas subcutâneos, disseminando-se especialmente pelo rosto (BECKER *et al.* 1999).

Nos casos de Leishmaniose Visceral (LV) o parasita está presente em macrófagos de órgão internos como baço, fígado e medula óssea. A LV não tem cura espontânea e, geralmente leva o indivíduo a óbito quando não tratada. Os sintomas mais comuns são febre, emagrecimento, escurecimento da pele e, em um estágio mais avançado provoca hepatoesplenomegalia, anemia e hipergamaglobulinemia (BERMAM, 1988).

3.1. DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE

O diagnóstico da Leishmaniose se fundamenta em aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Os exames laboratoriais têm sido empregados em testes cutâneos (intradermorreação de Montenegro), exames histopatológicos, pesquisa do parasita em exames diretos, cultivo em meios específicos, inoculação em hamster (*Mesocricetus auratus*) e reações sorológicas (fixação de complemento, ELISA-enzyme linked immunosorbent assay e reação de imunofluorescência indireta).

MONTENEGRO (1926) foi o primeiro a utilizar o teste intradérmico em humanos, obtendo resultado positivo com extrato de culturas mortas de leishmanias. O antígeno de Montenegro pode ser constituído de formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*. O inóculo é injetado no antebraço e são considerados positivos os resultados que apresentarem 5 mm ou mais de área de irritação, com a formação de uma pápula, e esses índices de positividade variam de 82,4 a 100% (TALHARI *et al.* 1985). Nas áreas endêmicas onde se têm poucos recursos o diagnóstico usualmente baseia-se na história clínica, epidemiológica e o achado da intradermorreação de Montenegro positiva (MARSDEM, 1986).

Testes sorológicos para determinar anticorpos anti-leishmania, utilizando a técnica de imunofluorescência indireta e ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), podem ser empregados em regiões que não apresentam patologias que poderiam provocar resultados falso-positivos, como por exemplo, doença de Chagas ou Leishmaniose Visceral, devido à ocorrência de reações cruzadas com outros tripanosomatídeos. (MARSDEM, 1986).

O uso de anticorpos policlonais ou monoclonais para detectar a presença de formas amastigotas em material aspirado ou biópsia, é uma estratégia que pode aumentar a

sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnósticos, principalmente o histopatológico (LYNCH *et al.* 1986).

A confirmação da infecção deveria ser realizada pelo isolamento do parasita em cultura específica, diretamente a partir das lesões do paciente ou das lesões desenvolvidas em hamsters (*Mesocricetus auratus*), inoculados com este material, com maior sensibilidade quando utiliza-se material macerado da biópsia da mucosa atingida (WEIGLE *et al.* 1987).

A histopatologia revela infiltrado celular composto de linfócitos e células plasmáticas, em proporções iguais. Outros achados são as formações de granulomas, com diferentes graus de organização, áreas de necrose e vasculite. A presença de parasitos no estudo histopatológico não é freqüente e observou-se em 38% das amostras examinadas no estudo realizado por (MAGALHÃES *et al.* 1986). Algumas tentativas foram realizadas para estabelecer correlações entre o padrão histopatológico e a evolução clínica da doença mucosa (GUTIERREZ *et al.* 1991), mas até o momento nenhuma classificação, com fins prognósticos, foi universalmente aceita (BITTENCOURT *et al.* 1991).

Recentemente, a utilização de sondas de DNA em PCR (polymerase chain reaction) para detectar ácidos nucléicos do parasita, em aspirados e/ou biópsias das lesões, tem-se revelado como uma nova opção diagnóstica extremamente útil em casos de leishmaniose mucosa, onde usualmente o número de parasitos é baixo, o que limita a sensibilidade dos métodos convencionais (DEGRAVE *et al.* 1994).

3.2. RESPOSTA IMUNOLÓGICA A LEISHMANIA

A resposta do hospedeiro à infecção por *L. (V.) braziliensis* caracteriza-se pelo aparecimento de hipersensibilidade tardia, ou seja, pela reação intradérmica de Montenegro. Paralelamente, ocorre a produção de anticorpos específicos que podem ser úteis no diagnóstico (CASTÉS *et al.* 1983). A reação do hospedeiro à infecção é um fenômeno dinâmico que varia de acordo com o tempo de evolução da doença e a forma clínica. De forma geral, a capacidade de lifoproliferação das células dos indivíduos infectados é estimulada pelos antígenos do parasito e pela produção do interferon gama (CASTÉS *et al.* 1984).

A magnitude da resposta celular está relacionada com o tipo de doença clínica, sendo maior nos indivíduos com leishmaniose mucosa quando comparados com indivíduos com leishmaniose cutânea. Os indivíduos que apresentam cura espontânea das lesões cutâneas, mostram resposta mais intensa do que os indivíduos com lesões clinicamente ativas, sugerindo que esta resposta poderia estar relacionada ao sistema imunológico do indivíduo, no que se refere ao controle da patologia (CARVALHO *et al.* 1985).

Existem evidências que nas lesões mucosas haveria um padrão misto celular com predominância de um perfil T “helper” 2 (Th2), que contribuiria para a evolução crônica, dificultando o controle da infecção neste local, apesar de ser observado um perfil T “helper” 1 (Th1) na produção de citocinas pelas células periféricas (PIRMEZ *et al.* 1993).

Alguns autores sugerem que durante a fase inicial da infecção, o indivíduo apresentaria uma deficiência na resposta, enquanto não houvesse uma definição do equilíbrio ou predominância na produção de algumas citocinas. Estas estariam envolvidas na fase crucial da relação parasito-hospedeiro e seriam o “transforming growth factor- β ” (TGF- β) e a interleucina –

10 (IL-10) como depressoras da resposta imunológica efetiva, favorecendo a ativação de uma resposta do tipo Th2, INF- γ e a IL-12 e, contrapondo esse efeito, favoreceriam o aparecimento de uma resposta protetora do tipo Th1 (HEINZEL, 1994; ALMEIDA *et al.* 1995; BARRAL *et al.* 1995; BARRAL-NETTO *et al.* 1995).

Um determinado perfil de resposta imunológica, especificamente relacionada com a produção de citocinas que caracterizam as respostas do tipo Th1 ou Th2, estaria associada à suscetibilidade ou resistência à infecção por espécies do gênero *Leishmania* nos modelos animais (LOHOFF *et al.* 1998). A principal citocina envolvida neste tipo de resposta é a IL-4 (SCOTT & FARRELL, 1998).

As citocinas podem ainda inibir a infecção de macrófagos em cultura. O IFN- γ e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foram identificados como as citocinas eficientes na resistência da leishmaniose. O IFN γ , talvez o TNF- α , levam ao aumento da produção do óxido nítrico (NO) pelos macrófagos, o qual se acredita ser o agente responsável pela morte dos parasitas (DE PAULA, 1999).

O óxido nítrico é sintetizado a partir da oxidação do átomo de nitrogênio guanídico terminal da L-arginina (PALMER *et al.*, 1988), por ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi), sendo as citocinas importantes moduladoras de sua expressão. Em macrófagos murinos, a NOSi pode ser induzida por citocinas, como IFN- γ (DING *et al.*, 1988) e TNF- α (DRAPIER *et al.*, 1988). Citocinas liberadas por linfócitos Th2 como IL-4 e IL-10, inibem a atividade microbicida de macrófagos. Neste sentido, demonstrou-se que o pré-tratamento de macrófagos com estas citocinas inibe de maneira dose-dependente a indução da enzima NOSi (DING *et al.*, 1988).

A relação direta entre a atividade microbicida de macrófagos estimulados, e a produção de NO, foi verificada por meio da utilização de análogos metilados da L-arginina, como é o caso da N-monometil-L-arginina (L-NMMA). O pré-tratamento de macrófagos com inibidores da NOSi inibe a produção de NO e a atividade microbicida destas células (GREEN *et al.*, 1990; LIEW *et al.*, 1990).

Especificamente em relação ao gênero *Leishmania*, macrófagos peritoneais de camundongos estimulados *in vitro* com IFN- γ , em presença de lipopolissacarídeo (LPS), liberam grandes quantidades de NO destruindo o parasita intracelular. (LIEW *et al.*, 1990).

3.3. QUIMIOTERAPIA DA LEISHMANIOSE

Do ponto de vista histórico, existem evidências que apontam para o uso de antimônio como cosmético no antigo Egito, que provavelmente foi muito difundido, pois era levado ao Vale do Rio Nilo desde terras remotas do sul, provavelmente do atual território do Moçambique (THORWALD, 1962). Sabe-se que durante a época da civilização egípcia, o tratamento da esquistossomose haematóbica incluía o uso de antimônio (MAGUIB, 1963).

Mais recentemente foi utilizado o tártaro emético, forma trivalente do antimônio, para esquistossomose e leishmaniose visceral. Os efeitos colaterais limitaram o uso destes medicamentos (STECK, 1972).

Chamamos de antimoniais a complexos moleculares formados pelo metalóide antimônio (Sb), utilizado hoje na forma pentavalente do ácido antimônico, acoplado a carboidratos (MARSDEN, 1985a; BERMAN, 1988).

O nome de Gaspar Vianna tem importância histórica fundamental não apenas pela acuidade das suas observações no sentido de separar taxonomicamente a *Leishmania braziliensis* das outras espécies, mas por ter sido o primeiro a usar os antimoniais no tratamento da LTA, em 1912, sob a forma trivalente (HAMANN, 1989).

Em 1920 foi produzido pela primeira vez um antimonial na sua forma pentavalente por BRAMACHARI, e nesta década teve particular importância na Índia, que o utilizou no tratamento de leishmaniose visceral (NAPIER, 1927).

Depois da II Guerra Mundial, a disponibilidade do medicamento no Terceiro Mundo ficou dependendo basicamente dos interesses e da penetração no mercado de grandes casas farmacêuticas. Enquanto nações como a Índia e a China produziam seu próprio antimonial,

a maior parte dos países dependia do fornecimento dos Laboratórios Wellcome, da Grã Bretanha, e Rhodia da França (MAQUIB, 1963).

A Rhodia tem entrado com o antimoníato de n-metil glucamina Glucamina (Glucantime®) no mercado latino-americano. Sua eficácia no tratamento de leishmaniose mucosa tem sido assinalada há mais de três décadas no Brasil, vindo a constituir a base da terapia da doença no nosso país, sendo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1984).

A disponibilidade desse fármaco tem sido grandemente limitada em países onde os fenômenos de violência política, nas áreas rurais, fazem com que a distribuição de medicamentos usados no tratamento de endemias como malária e a leishmaniose seja proibida pelas próprias autoridades, tornando mais difíceis ainda as já obscuras perspectivas de controle dessas enfermidades (HAMANN, 1989).

As drogas de primeira escolha para o tratamento de leishmaniose mucosa são os antimoníais pentavalentes e as alternativas nos casos da falta de resposta a estes medicamentos são anfotericina B e pentamidina, drogas de segunda escolha (MARSDEN, 1985a).

O antimonial pentavalente disponível no Brasil é o antimoníato de meglumina (Glucantime®, Rhodia Farma. LTDA. do Brasil) que é distribuído em ampolas de 5 mL, sendo empregado nos países de língua não inglesa, já o estibogluconato sódico (Pentostam® Wellcome) consiste no antimonial mais utilizado nos países de língua inglesa, ambos são antimoníais pentavalentes. Acredita-se que esses antimoníais atuam inibindo as vias glicolíticas e a beta-oxidação de ácidos graxos do parasito (BERMAN *et al.* 1987a).

Sabe-se que o estibogluconato sódico (Pentostam® - Wellcome), é absorvido rapidamente depois da injeção intramuscular e desaparece também rapidamente do compartimento intravascular devido à imediata excreção pelo rim e a biotransformação em antimonial trivalente (SbIII) cuja excreção é mais lenta, assim como à distribuição pelos outros

compartimentos corporais. Tem-se documentado o efeito acumulativo de doses consecutivas (CHULAY *et al.* 1988).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a dose recomendada para o tratamento da leishmaniose cutânea é equivalente a 10-20mg de antimônio/Kg/dia, por três semanas, e para a leishmaniose cutânea mucosa, é de 20mg/Kg/dia, durante 28 dias.

O antimonial pentavalente apresenta problemas como falta de padronização do conteúdo de estibogluconato sódico por ampola, o desconhecimento sobre as condições ideais de armazenamento (BERMAN, 1988) e ainda a presença de (SbIII) em quantidades variáveis (FRANCO, 1992).

A toxicidade que atinge principalmente o aparelho cardiovascular constitui importante limitação para uma aplicação segura desses antimoniais (HERWALDT & BERMAN, 1992). Também pode ocorrer toxicidade renal e osteoarticular, esta última nem sempre se relaciona com a droga. A pancreatite parece ser inicialmente um efeito colateral raro, mas recentemente foi relatada em 16 de 17 pacientes observados durante a terapia com Pentostam® (MC CARTHY, 1993).

O fígado pode ser atingindo de forma leve e assintomática, caracterizando a lesão pelo aumento discreto das transaminases. O sistema hematopoiético também pode ser afetado. Em geral, todos esses efeitos estão associados com a dose (HEPBURN, 1993).

As falhas terapêuticas com estibogluconato sódico são freqüentes, e na última década tem recebido atenção para o problema da resistência de diferentes espécies de *Leishmania* a esta droga. O mecanismo de resistências não tem sido completamente esclarecido, mas o fenômeno é um fato provado categoricamente. As falhas terapêuticas nem sempre significam resistência aos antimoniais; outros fatores como dosagem inadequada, alterações nas características do medicamento em condições de armazenamento deficiente e problemas com a

resposta imunológica do paciente, podem ter um papel no fenômeno (OUELLETTE & PAPADOPOULOU, 1993).

Em relação ao mecanismo de ação, não existe certeza a respeito desses processos aos quais poderiam atribuir um efeito terapêutico aos antimoniais. De um lado existem evidências da atividade *in vitro* sobre os sistemas bioenergéticos do protozoário, como a inibição da síntese de adenosina trifosfato (ATP) e guanina trifosfato (GTP), a partir de seus precursores adenosina difosfato (ADP) e guanina difosfato (GDP), sobre a forma promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, submetidas à ação do antimonial. Esta inibição levaria a uma redução da produção celular de macromoléculas, fenômenos explicados pela inibição na oxidação de ácidos graxos, no metabolismo da glicose, e de enzimas mitocondriais, necessárias para a fosforilação oxidativa (BERMAN *et al.*, 1985; BERMAN & GALLALEE, 1987b; BERMAN, 1988).

Existem evidências de um efeito antiparasitário por meio de ações sobre o sistema imunológico, modulando as respostas celulares, e que pode ser verificado para outros agentes quimioterapêuticos. Sabe-se que imunomoduladores como o Levamisole® podem diminuir a gravidade da infecção por *L. enrietti*, em modelos experimentais conhecidos (REZAI *et al.*, 1988).

A capacidade leishmanicida do macrófago pode ser afetada, por um efeito supressor dos antimoniais. Porém, existem evidências no sentido contrário, isto é, apontando para efeitos imuno-estimulantes, já que a maioria dos imuno-moduladores possui ação sobre diferentes sub-populações de células, ações que por vezes são contrárias dependendo da dosagem utilizada (GOTO *et al.*, 1988).

Em particular, na doença produzida por *L. (V.) braziliensis*, os dados indicam que os efeitos benéficos da terapia antimonial podem decorrer de um aumento da resposta imune específica, mediada por células "T" (MENDONÇA *et al.*, 1986).

As drogas de segunda linha de tratamento são anfotericina B e pentamidina. A anfotericina B é um antibiótico poliênico com atividade leishmanicida reconhecida (BERMAN, 1988). O mecanismo de ação faz-se através da afinidade pelos esteróis da membrana celular, preferencialmente os substituídos no carbono 24, como por exemplo, o ergosterol. Embora a atividade leishmanicida *in vitro* possa ser considerada maior que a do estibogluconato sódico, os efeitos colaterais, em até um terço dos pacientes, são caracterizados pela nefrotoxicidade, alterações eletrolíticas e cardiotoxicidade e limitam sua utilização fora das instituições hospitalares (OLLIARO & BRYCESON, 1993).

O aparecimento da anfotericina B lipossomal diminuiu de forma significativa os efeitos tóxicos da droga, permitindo o uso de doses maiores, mas apresenta o problema de custo elevado, o que a faz inacessível para o uso geral (OLLIARO & BRYCESON, 1993).

Em relação a pentamidina, essa substância é uma diamina aromática, cuja ação leishmanicida está relacionada com a competição com as poliaminas, pelos locais de ligação nos ácidos nucleicos, podendo-se unir preferencialmente ao DNA do cinetoplasto do parasita, podendo inibir também a atividade da timidilato-sintetase alterando potencialmente a síntese de DNA. Embora seja uma droga útil no tratamento de Leishmaniose Mucosa (LM), o seu uso apresenta limitações, devido aos efeitos colaterais como hipotensão, náuseas e vômitos, nefrotoxicidade, hipoglicemia, diabetes e abscessos estéreis. A hipotensão, que se apresenta em 10% dos casos após a administração intramuscular, constitui uma limitação importante para a sua utilização em condições de campo (OLLIARO & BRYCESON, 1993).

Com o intuito de encontrar novas substâncias ou medicamentos de menor toxicidade e de custo inferior, que poderiam ser utilizados nos tratamentos de casos da infecção, bem como em situações de resistência parasitária, diversos autores vêm averiguando a possibilidade de utilização de substâncias de origem animal ou vegetal e produtos sintéticos na

terapêutica da leishmaniose (FOURNET *et al.* 1994; RIBEIRO *et al.*, 1994; SANTOS, 1997; MACHADO *et al.* 2000).

A Diamino-difenil-sulfona (Dapsona®), foi utilizada com sucesso na Leishmaniose Cutânea (LC) do Velho Mundo, mas não demonstrou vantagens em curto prazo sobre o antimonial no tratamento da LC, determinada por *L. (V.) braziliensis* (MECHÁN-HAMANN *et al.*, 1988).

O cetoconazol, administrado em ratos por via oral, a uma dose de 400mg por dia em um período de 15 a 90 dias, apresentou resultados positivos para *L. mexicana* e *L. panamensis*, mas em relação a *L. braziliensis* não apresentou resultados satisfatórios (BERMAN, 1997).

O sulfato de aminosidina, um aminoglicosídeo com estrutura idêntica à paramomicina, tem mostrado bons resultados contra formas do gênero *Leishmania* em ensaios realizados *in vitro* e *in vivo* (HEPBURN *et al.*, 1994). Os autores observaram uma taxa de 48% de cura em pacientes com a forma mucosa de leishmaniose, com um tratamento de duração de 1 ano, relatando para os indivíduos tratados efeitos colaterais freqüentes, como dor no local em 86%, proteinúria em 24% dos pacientes e perda auditiva sub-clínica em um paciente submetido a audiometria (ROMERO *et al.*, 1998).

O antibiótico paramomicina foi utilizado na Índia e no Quênia em pacientes com *Leishmania Visceral*, resistentes ao tratamento à base de antimônio, obtendo resultados favoráveis nestes pacientes (BERMAN, 1997), visto que em outras espécies, como por exemplo, na *L. (V.) braziliensis*, os resultados não foram eficazes (CHANCE, 1995). GROGL *et al.* (1999), analisaram a paramomicina associada a gentamicina, em aplicação tópica em camundongos infectados com *L. major* e *L. mexicana*, obtendo resultados satisfatórios.

A síntese e a avaliação de dinitroanilinas, bem como a verificação da atividade do albendazol sobre *L. (L.) infantum*, foi relatada por ARMSON *et al.*, (1999), onde os autores avaliaram, comparativamente, a atividade dos compostos mediante a verificação da incorporação de [³H] timidina pelas formas amastigotas e promastigotas do parasita. Os autores aventaram assim a hipótese de que a tubulina do complexo protéico, apresentado na superfície da membrana parasitária, possa ser um dos caminhos para o descobrimento de novas substâncias para o tratamento da leishmaniose.

FOURNET *et al.* (1994), avaliaram a atividade leishmanicida dos compostos isolados do vegetal *Ampelocera edentula*, uma planta boliviana utilizada para o tratamento das LC. A suscetibilidade de cinco diferentes espécies de *Leishmania* foi avaliada, em ensaios realizados sobre as formas promastigotas realizados *in vitro*, onde o IC₉₀ dessas avaliações foram insignificantes, onde em concentrações mais baixas, como por exemplo, 25µg/mL, não apresentou uma atividade inibitória contra a multiplicação dos parasitas. Em relação aos ensaios *in vivo*, realizados com camundongos BALB/C infectados com *L. amazonensis* e tratados com isolados da planta *Ampelocera edentula*, observou-se que após 28 dias de tratamento, as lesões apresentaram tamanhos semelhantes ao grupo tratado com o Glucantime®.

A atividade leishmanicida do extrato etanólico do caule e das folhas de *Plumbago scadens* (Plumbaginacea), foi investigada. O extrato do caule foi capaz de inibir em 88% o crescimento das formas promastigotas da *L. amazonensis* a uma concentração de 100µg/mL. Na mesma concentração, a atividade contra as formas amastigotas intracelulares do extrato do caule foi de 61%, sem que nenhum efeito tóxico fosse observado sobre os macrófagos ou células totais de linfonodos de camundongos, indicando uma ação seletiva para os parasitas. Segundo os autores, a menor atividade sobre as formas amastigotas pode ter ocorrido pelo fato de

existirem diferenças metabólicas entre as duas formas, e o extrato estar agindo sobre uma determinada via mais importante para a promastigota, do que para a amastigota, como por exemplo, a via glicolítica (SANTOS, 1997).

Análogos da isqualamina foram investigados e demonstraram atuar como potentes compostos tripanocida e leishmanicida. Vários dos compostos avaliados demonstraram uma atividade significativa *in vitro* contra *Trypanosoma brucei* e *L. donovani* e pouca atividade contra *T. cruzi*. Nos ensaios *in vivo* não foi observado efeito contra os animais infectados com *T. brucei*, tratados com uma dose de 50mg/kg, durante 4 dias pela via intraperitoneal, e somente uma redução de 16% na carga parasitária dos animais infectados com *L. donovani*, tratados pela via intraperitoneal, com a mesma concentração, durante 5 dias (KHABNADIDDEH *et al.*, 2000).

A atividade leishmanicida de neolignanas, isoladas de *Virola surinamensis*, bem como seus análogos sintéticos, foram avaliadas sobre *Leishmania donovani* em culturas axênicas e celulares e em animais experimentais. Algumas substâncias foram ativas contra as formas promastigotas do parasita, mas não demonstraram atividade seletiva quando testadas sobre as formas amastigotas, em animais experimentais. Outras foram ativas para as formas amastigotas cultivadas em macrófagos, demonstrando uma toxicidade para estas células. Ainda, foi verificada a atividade de outros análogos contra as formas amastigotas cultivadas em macrófagos, mas que não atuaram sobre as formas promastigotas (BARATA *et al.*, 2000).

Ainda em relação à busca de novos produtos quimioterápicos, KAYSER *et al.* (2000), estudaram uma série de derivados de naftoquinonas monoméricas e diméricas (substância de origem natural), sobre as formas promastigotas de diversas espécies de *Leishmania*, encontrando uma grande variabilidade de atividade entre as mesmas.

A avaliação da atividade leishmanicida em relação a 20 chalconas, isoladas de plantas, foi realizada *in vitro*. Observou-se o efeito inibitório de uma série de chalconas sobre a

evolução das formas promastigotas extracelulares das espécies *L. donovani*, *L. infantum*, *L. enrietti* e *L. major* e sobre as formas amastigotas intracelulares da *L. donovani*. Na avaliação sobre as formas amastigotas intracelulares foi observada uma toxicidade moderada contra as células do hospedeiro (KAYSER & KIDERLEN, 2001).

Em relação às substâncias ou compostos provenientes de animais, um dos trabalhos que mais se destaca na literatura é aquele realizado por RAMOS *et al.*, (2000), onde os autores relatam a eficácia de veneno de serpentes irradiado sobre as formas promastigotas de *Leishmania*. Os autores constataram uma excelente eficácia desse tipo de composto, uma vez que o IC₅₀ encontrado foi de 95 ng/mL, sendo o mesmo considerado insignificante quando comparado ao DL₅₀, que foi de 0,5 mg/Kg.

3.4. A PRÓPOLIS NA TERAPÊUTICA

A própolis, ou “cola das abelhas”, é um material resinoso, balsâmico coletado pelas abelhas de botões florais e cascas de certas árvores e plantas, utilizadas pelos sacerdotes do Egito e pelos gregos, que deram origem a seu nome “Pro”, em prol e “polis”, cidade; as abelhas utilizavam a própolis em prol da cidade, ou seja, protegendo as colméias contra o ataque de insetos e contra materiais estranhos que ficavam retidos e eram mumificados. Também foi usada pela civilização dos ricos contra infecções e, na África do Sul foi empregada durante a guerra dos boêres (1899-1902) como cicatrizante. Aristóteles considerava a própolis como um remédio para os males da perna, as “chagas e as supurações” (AZEVEDO, 1986).

A própolis foi redescoberta em nossa era por vários pesquisadores que estudam suas verdadeiras propriedades e o seu real aproveitamento para a saúde do homem, sendo que na Europa (Bloco Soviético, França e Alemanha) têm-se realizado pesquisas com resultados surpreendentes em diversos tipos de patologias (AZEVEDO, 1986).

Essencialmente, a própolis é uma resina natural, com um odor agradável, e geralmente composto por 55% de bálsamos e resinas, 30% de ceras, 10% de óleos e 5% de pólen (MITAMURA *et al.* 1996). Os componentes característicos da própolis são vários flavonóides agliconas, isto é, flavononas acompanhados por ácidos fenólicos, seus ésteres, aldeídos fenólicos, álcoois, cetonas, ácidos cinâmico, terpenos e ácido caféico (PARK & IKEGAKI, 1998; CAMPOS, *et al.* 1998).

Por meios de diversos estudos já realizados com a própolis, esta possui diversas ações farmacológicas como antibacteriana, antiviral, antifúngica, anestésica, antiinflamatória, antioxidante, hipotensivo, imunoestimulante e citostático (PARK & IKEGAKI, 1998; CAMPOS, *et al.* 1998).

DANILOV (1988), utilizou a própolis em 680 pacientes com diferentes enfermidades da pele. Os resultados deste tratamento servem de embasamento para a hipótese de que “a própolis possui propriedades terapêuticas determinadas, sendo possível o seu emprego no tratamento de pacientes com enfermidades da pele”.

VANHAELEN (1979) realizou um estudo sobre as origens, constituição química e atividade terapêutica da própolis, concluindo que existe uma atividade anti-bacteriana sobre os germes gram-negativos e gram-positivos, antifungicida, de efeito importante na regeneração dos tecidos além de uma ação anestésica acentuada.

Foi constatado que a propolína, obtida do extrato da própolis, ativa o organismo quanto à formação de anticorpos, ativando a fagocitose e a formação de proteínas no sangue, além de promover consideravelmente a regeneração do tecido. Sua ação antibiótica tem um amplo espectro, tanto bactericida como bacteriostático (AZEVEDO *et al.*, 1986).

SCHELLER *et al.* (1977b), estudando a atividade antiparasitária do extrato de própolis, a uma concentração de 150mg/mL, constataram uma atividade *in vitro* letal sobre três diferentes cepas de *Trichomonas vaginalis*.

Foi verificada a atividade anti-protozoários da própolis em animais experimentais infectados com *Eimeria magna*, *Eimeria media* e *Eimeria perforans*, tratados com 3% de extrato etanólico de própolis e outras drogas antiprotozoa. O efeito coccidiostático da própolis foi maior quando comparado a outras drogas (HOLLANDS, 1988). Preparações da própolis foram classificadas como um bom coccidiostático contra *Chilomonas paramecium* (HOLLANDS, 1988).

TORRES *et al.* (1990) verificando a atividade do extrato da própolis sobre *Giardia lamblia*, a uma concentração de 11,6 mg/mL, observaram em ensaios realizados *in vitro* uma inibição do crescimento do parasita de aproximadamente 98%.

HIGASHI & DE CASTRO (1994) demonstraram que o extrato de própolis possui atividade *in vitro* sobre os três estágios evolutivos de desenvolvimento de *T. cruzi*. Também, os autores avaliaram o efeito em diferentes formulações do extrato de própolis em ratos infectados com uma carga parasitária de 10^5 das formas infectantes do parasita, não observando nenhuma atividade *in vivo* (DE CASTRO & HIGASHI, 1995).

Recentemente, MACHADO *et al.* (2000) estudaram a atividade da própolis sobre as formas promastigotas de 3 diferentes espécies do gênero *Leishmania*, encontrando resultados significativos. Os autores observaram que os valores de IC_{50} foram específicos para cada espécie avaliada: *L. amazonensis*, de $88,1 \pm 4,1 \mu\text{g/mL}$; *L. braziliensis*, de $35,8 \pm 3,1 \mu\text{g/mL}$; *L. chagasi*, de $55,2 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$.

Devido ao aumento da utilização da própolis, os seus efeitos colaterais foram observados com uma maior frequência. TODOROV *et al.* (1968) durante pesquisa com a própolis, demonstraram que extratos alcoólicos e aquosos da própolis não ocasionaram irritações nos tecidos, aparentando uma baixa toxicidade. Existem poucos casos de hipersensibilidades à própolis, demonstrados por BURNNEY (1968), onde quadros de dermatites raramente se manifestam. Nos casos que a própolis pode provocar uma reação alérgica, recomenda-se uma aplicação de creme siliconado na superfície antes da aplicação (BURNNEY, 1968).

Para HAUSEN *et al.* (1987a), a própolis contém alguns componentes que causam toxicidade. Dermatite dos apicultores causada pela própolis é bem conhecida, e uma aparente associação entre a sensibilidade da própolis e resina tem sido observada.

HAUSEN *et al.* (1987b) descreveram a incidência de 200 casos de dermatites alérgica ao própolis. Eles identificaram uma substância, a 1,1 dimetil-alil ácido cafeico, como

responsável pela alergia. O flavonóide tectocrisina foi considerado um segundo alérgeno, embora SCHMALLE *et al.* (1986) revelaram que o tectocrisina foi pouco sensibilizante.

Observações sobre a própolis, usada oralmente, sugerem que a absorção intestinal poderia executar um papel importante na prevenção da ação sensibilizante da própolis, limitada na extensão da administração oral, podendo ser proveitosa na prevenção de alergias desencadeadas pela própolis (MACHÁCKOVÁ, 1988).

Já em estudos toxicológicos realizados sobre a própolis na Universidade de La Habana, chegou-se a um exaustivo estudo da toxicidade subcrônica deste composto, e as conclusões foram que a própolis não ocasiona alterações patológicas no organismo, mesmo quando se utilizam doses consideradas altas do ponto de vista toxicológico (HOLLANDS, 1988).

Em um outro estudo realizado em La Habana, observou-se que a própolis administrada por via oral exerce um efeito citohepatoprotetor em ratos submetidos a uma dieta com álcool (MANDADO, 1988). Embora não seja clara a toxicidade da própolis, algumas alterações já foram constatadas, mas os pesquisadores acreditam não ter dados suficientes para impedir a utilização desse agente terapêutico.

3.5. A HOMEOPATIA COMO TERAPÊUTICA

Já em relação aos medicamentos homeopáticos, do tipo bioterápico, a literatura científica nada relata quanto à utilização desses produtos no tratamento da leishmaniose. Entretanto, existem vários trabalhos experimentais e clínicos demonstrando a utilização desse tipo de medicamento no tratamento da doença de Chagas experimental e clínica, sendo o mesmo preparado a partir de formas de cultivo de *T. cruzi* (RIBEIRO *et al.*, 1989; NASI *et al.* 1994; LOPES *et al.* 1994).

A Homeopatia foi documentada por Hahnemann, em 1790, quando fazia a tradução da matéria médica do médico Willian Cullen, sobre a ação da quinina no tratamento da malária. Hahnemann experimentou a quinina e começou a sentir os mesmos sintomas que a malária provocava, descobrindo então o princípio maior da Homeopatia, que é a Lei de Similitude, onde “uma substância que é capaz de provocar doença em uma pessoa sadia é capaz de curar uma pessoa doente que tenha sintomas semelhantes por ela provocados” (POZETTI, 1988).

Para falarmos em pesquisa homeopática no Brasil, temos que fazer uma volta ao passado, mais precisamente ao ano de 1840. Benoit Mure, foi provavelmente quem iniciou a pesquisa homeopática no Brasil, tendo estudado patogeneticamente plantas e animais brasileiros descritos no livro *Patogenesias Brasileiras*. A ele se seguiram alguns poucos trilhando esse mesmo caminho da determinação de novas patogenesias (POZETTI, 1988).

A Homeopatia se encontra nos dias de hoje confrontada e desafiada pela ciência atual a comprovar seus princípios. Faz-se necessário então que a Homeopatia, frente aos avanços científicos e metodológicos deste final de século, atualize seus métodos de pesquisa, para sair do estatuto dogmático e místico e comprovar o que Hahnemann intuiu em sua nomenclatura

original, a partir de suas observações experimentais e clínicas. A pesquisa homeopática deve assim caminhar em três direções complementares para dar sustentação, comprovação e ampliar a teoria e práticas. Estes aspectos envolvem a pesquisa básica físico-química, os ensaios biológicos experimentais e os estudos clínicos controlados (SOUZA, 1999).

As preparações homeopáticas são realizadas com substâncias de origem vegetal, mineral, animal e produtos biológicos. As primeiras contribuem com o maior número de matérias primas e utiliza, geralmente, plantas coletadas em seu habitat natural que são usadas em estado fresco para a obtenção da tintura-mãe (TM) ou preparações básicas, as diluições e dinamizações (ABECASSIS *et al.*, 1980).

As de origem mineral ou química compreendem substâncias simples e compostas e são preparadas por trituração ou diluição, dependendo da solubilidade nos excipientes e veículos homeopáticos, o que permite a utilização de matérias-primas, tais como, sal marinho, o petróleo e outros (ABECASSIS *et al.* 1980).

Em relação às de origem animal incluem-se as tinturas-mãe preparadas com animais inteiros vivos, como *Apis mellifica*, *Formica rufa*, ou dessecados, como *Cantharis*, *Coccus cacti* ou ainda, de venenos, como aqueles de *Lachesis muta*, *Crotalus horridus* dentre outros; os organoterápicos, preparados a partir de órgãos frescos liofilizados de animais sadios, e os opoterápicos, preparados a partir de pó de órgãos dessecados (ABECASSIS *et al.* 1980).

Segundo POZETTI (1990), a patogenesia de uma dada substância compreende o conjunto de sintomas que essa substância provoca no indivíduo sadio, quando a ele é ministrada em doses sub-tóxicas. Desta forma, com a experiência no homem sadio, se demonstra a lei do semelhante, o princípio fundamental da homeopatia.

A Lei de Similitude é um princípio de ordem farmacológica que diz: qualquer substância que, administrada em doses fortes (sub-tóxicas), produz no homem são e sensível

determinados sintomas, é capaz de curar os mesmos sintomas em doses potencializadas, isto é, após diluição e sucussão (agitação).

As preparações realizadas a partir de produtos biológicos (bioterápicos), compreendem as secreções, excreções, tecidos e órgãos patológicos ou não, produtos de origem microbiana e alérgenos. Os bioterápicos podem ser classificados em bioterápicos de estoque e isoterápico, onde este último se divide em auto e heteroisoterápico, os bioterápicos de estoque, são produtos cujo insumo ativo é constituído por amostras preparadas e fornecidas por laboratórios especializados, os auto-isoterápicos, o insumo ativo é obtido do próprio paciente como cálculos, fezes, sangue, secreções, urina, e só a ele destinados, e os heteroisoterápicos, os insumos ativos são externos ao paciente e que, de alguma forma, o sensibilizam como os alérgenos, poeira, pólen, solventes, e outros (FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 1997).

Existem bioterápicos simples como “vacinas de estoque” e complexos, constituídas por culturas microbianas puras, lisadas e atenuadas em condições determinadas, são aqueles definidos pelo seu modo de obtenção ou de preparação (FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 1997).

Após Hahnemann temos um hiato em relação à pesquisa científica usando as diluições infinitesimais (preparado homeopático) que começou a ser preenchido por trabalhos como o de WURMSER (1957) e VISCHINIAC (1965), que evidenciaram a atividade do preparado homeopático em experimentação animal.

BILDET *et al.* (1981), demonstraram que as doses infinitesimais de tetracloreto de carbono 7CH protegeram os ratos de danos hepáticos graves provocados por uma injeção da mesma substância tóxica. Esses autores estudaram, em 1984, a ação preventiva do Phosphorus 7CH e 15CH, administrados previamente à intoxicação pelo tetracloreto de carbono. Os

resultados bioquímicos e anatomopatológicos demonstraram que o Phosphorus, nas diluições 7CH e 15CH, apresentaram um efeito hepatoprotetor.

COTTE & BERNARD (1983) observaram os efeitos de diluições hahnemannianas de Mercurius corrosivus sobre a multiplicação de fibroblastos em células intoxicados por cloreto de mercúrio. O tratamento preventivo por Mercurius corrosivos na dinamização de 5CH e 15CH protegeu as células da intoxicação por esse metal.

A ação dos imunomoduladores: o fator tímico sérico (FTS) e o extrato de Thymus, ambos foram estudados por BASTIDE *et al.* (1985), em dinamizações de 4CH, 7CH, 9CH e 12CH, sobre ratos swiss considerados sadios e ratos NZP considerados imunologicamente deprimidos por uma involução precoce do timo. No primeiro grupo observou-se uma imunodepressão, e no segundo uma estimulação tanto para o Thymus como para o FST.

TUCANDUVA (1986) sugere que há uma proteção conferida a camundongos contra a intoxicação aguda pelo sulfato de atropina, quando se utiliza esta droga, diluída e dinamizada. Mostra ainda que a resposta de Atropina sulphuricum 12CH foi mais efetiva do que com 6CH, 20CH e 30CH.

SANTOS (1990), em experimento realizado com ratos previamente injetados com aloxana, obteve 53% de queda da taxa de glicose nos animais tratados com o fitoterápico *Myrcia uniflora* e com o homeopático Aloxana 6CH. Os tratados com Daonil® (Glibenclamida) demonstraram uma redução da taxa de 61.3%. Estes resultados demonstraram a eficácia do medicamento homeopático no tratamento da diabetes aloxânica experimental.

Em ensaios clínicos, utilizando o bioterápico Trypanosominum TC D 30 em um grupo de pacientes portadores da doença de Chagas na forma crônica sintomática, foi observado uma melhora do quadro sintomatológico da doença, com maior evidência de formas iniciais e

intermediárias dessa fase da infecção. Em relação à fase crônica tardia, não se obteve resultados positivos (GERALDINO, 1986).

RIBEIRO *et al.* (1987) realizaram um estudo comparativo dos índices de cura de camundongos infectados com a cepa Y e Bolívia de *T. cruzi*, tratados com quimioterápicos (Nifurtimox e Benzonidazol) e bioterápico (Trypanosominum TC D 30). Os resultados obtidos em relação a cepa Y foram de 60% de cura dos animais tratados com bioterápico, contra 35% do Nifurtimox e 57% do Benzonidazol. Ainda, os autores observaram que o Nifurtimox não apresentou resultados satisfatórios em relação a cepa Bolívia, enquanto que o benzonidazol apresentou 18% de índice de cura, contra 52% do medicamento bioterápico, não sendo observado nenhum efeito tóxico deste último.

Efeitos de fatores humorais do camundongo tratado com o bioterápico, Trypanosominum TC D 30, em testes de lise de *T. cruzi*, realizados *in vitro*, foram avaliados por RIBEIRO *et al.* (1989). Neste experimento foram utilizados soros de camundongos tratados com o bioterápico, onde a lise correspondeu a aproximadamente 50% em presença do soro imune, enquanto que os tripomastigotas incubados com o soro humano inativo não foram lisados.

NASI *et al.* (1994) avaliaram o grau de proteção determinado pelo bioterápico Trypanosominum TC D 30, em camundongos, frente à infecção pela cepa Y de *T. cruzi*. Após o tratamento preventivo dos animais sadios, por um período de tempo de 10 dias, os autores observaram que o medicamento homeopático conferiu um maior grau de proteção contra a infecção chagásica àqueles animais infectados após um período superior a 20 dias, após o tratamento, aventando assim a possibilidade de ativação do sistema imunológico pelo medicamento.

LOPES *et al.* (1994) avaliaram o parasitismo tissular e histometria em órgãos de camundongos infectados com as cepas Y e Bolívia de *T. cruzi* e tratados com o bioterápico TC

D 30 . Histologicamente, foi observada uma diminuição do parasitismo tissular nos tecidos cardíacos e hepáticos dos animais em experimentação.

O estudo do comportamento das formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* das cepas Bolívia SN (predominantemente formas tripomastigotas delgadas) e Bolívia SD (predominantemente formas tripomastigotas largas), em camundongos controles e tratados com bioterápicos foi realizado por RIBEIRO *et al.*, em 1994. Neste trabalho os autores observaram que, quando inoculadas em camundongos controles, as formas tripomastigotas delgadas desaparecem rapidamente da circulação, realizando seu tropismo tecidual, ao passo que as formas largas continuam circulando por alguns dias. Nos animais tratados com o bioterápico TC D 30, as formas tripomastigotas delgadas são precocemente destruídas, enquanto que as largas são mais resistentes, permanecendo por mais tempo na corrente circulatória, concluindo assim que as formas delgadas do parasita apresentam uma maior suscetibilidade ao medicamento.

Os resultados encontrados pelos autores demonstraram que o *Trypanosominum* TC D 30, de uma maneira geral, apresenta uma ótima eficácia sobre a infecção chagásica, sendo inclusive indicado na matéria médica homeopática mundial.

Diante de toda problemática em relação ao tratamento da leishmaniose, o interesse pela pesquisa de novas substâncias com atividade biológica sobre *Leishmania* vem sendo ampliado com o intuito de obtenção de novos compostos capazes de atuarem sobre o parasita, porém desprovidos dos graves efeitos colaterais. Em relação aos trabalhos citados anteriormente, a própolis vem apresentando resultados satisfatórios em diversas enfermidades, inclusive na Leishmaniose. Já para o bioterápico, poucos relatos existem na literatura.

Assim, os propósitos deste estudo são avaliar a atividade biológica de duas diferentes formas terapêuticas (própolis e bioterápico) sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em ensaios realizados *in vitro* sobre as formas promastigotas e amastigotas (Capítulo 1), nos

ensaios in vivo, sobre as formas amastigotas presentes em animais experimentalmente infectados pelo parasito (Capítulo 2), e avaliar a capacidade de indução de óxido nítrico por esses diferentes tipos de agentes terapêuticos (Capítulo 3).

4. Capítulo I

Avaliação da Atividade Biológica *in vitro* do Extrato da Própolis e do Bioterápico, sobre as Formas Promastigotas e Amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

4.1. Resumo

Diante da problemática no tratamento da leishmaniose, inúmeros compostos vêm sendo testados por diversos autores, entretanto, a própolis e o bioterápico têm apresentado bons resultados no combate de alguns protozoários. No presente trabalho, foi realizada a avaliação da atividade biológica de bioterápico e da própolis por meio de ensaios *in vitro* sob as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Em relação às formas promastigotas, os ensaios foram realizados em meio de cultivo axênico (LIT modificado), e para as formas amastigotas, utilizou-se culturas de macrófagos. Os resultados obtidos para as formas promastigotas demonstraram que estas preparações possuem potencial leishmanicida, onde a própolis apresentou resultados mais favoráveis do que o bioterápico. Estatisticamente não houve nível de significância em relação a própolis e o controle positivo (anfotericina B), já para as formas amastigotas, não observou-se atividade biológica de nenhuma das preparações. Esses resultados sugerem novas pesquisas, por exemplo, a comprovação destes compostos por meios de ensaios *in vivo*.

4.2. Introdução

Os protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida, são parasitas causadores de patologia degenerativa do tecido cutâneo e/ou vísceras, são transmitidos ao homem por meio da picada de fêmeas de insetos flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* (no Novo Mundo) e *Phlebotomus* (no Velho Mundo). Esses parasitas apresentam ciclo biológico complexo, sendo encontrados em duas formas principais, a amastigota, forma intracelular presente nos hospedeiros vertebrados que tem contorno aproximadamente circular, com pouco citoplasma e flagelo reduzido ao segmento intracelular, tornando-a praticamente imóvel, e as promastigotas, que são alongadas e fusiformes, flageladas e móveis, desenvolvendo extracelularmente no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados, bem como em meios de culturas axênicos (PEARSON *et al.* 1983b).

A *Leishmania (Viannia) braziliensis*, agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), é uma zoonose, que impõe como principal característica patogênica uma infecção que varia de casos benignos, apresentando-se como uma lesão cutânea localizada, a casos onde ocorre desfiguramento facial dos indivíduos infectados, tornando-se uma lesão de agressão cutâneo-mucosa, que às vezes chega a atingir tecidos mais profundos (MARSDEN, 1985b).

O tratamento da LTA foi introduzido pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, com o uso do antimonial tártaro emético, medicamento que durante muitos anos foi utilizado na terapêutica, em todo mundo. Atualmente, os antimoniais pentavalentes são as drogas de escolha para o tratamento da leishmaniose, sendo eficazes em 80% dos pacientes, porém apresentam problemas como toxicidade, administração parenteral e dificuldade para estabelecer

quantidades variáveis de antimônio na solução utilizada. A anfotericina B, medicamento utilizado na segunda linha de tratamento, é altamente tóxico, de baixa tolerância e pode apresentar quadros de resistência parasitária (SAMPAIO *et al.*, 1988; SAMPAIO *et al.*, 1990; SAMPAIO *et al.*, 1991).

Sabendo-se que o tratamento da leishmaniose com o antimonial pentavalente e com as drogas alternativas presentes no mercado apresentam limitações, principalmente resposta inadequada em número variável de pacientes assim como uma alta toxicidade, justifica-se o estudo de outras drogas que possuam um índice terapêutico adequado, com uma menor toxicidade e de baixo custo. Em face a estas considerações, torna-se interessante avaliar a possível atividade biológica da própolis e de um bioterápico (produzido a partir de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*), sobre as formas promastigotas e amastigotas do parasito, em ensaios *in vitro*.

4.3. Material e Métodos

4.3.1. Parasitas

A cepa do parasita utilizada foi isolada de um paciente do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, onde vem sendo mantida por meio de repiques em camundongos Swiss e em meio de cultura axênica.

4.3.2. Preparações avaliadas

- **extrato de própolis** – produto apiterápico, originário da cidade de Oliveira, Estado de São Paulo, Brasil. Para se obter a solução da própolis, pesou-se 4mg do extrato puro,

que foi diluído em 200µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 3.800µL de solução de cloreto de sódio à 0,9%; a partir desta preparação foram realizadas diversas concentrações: 1, 10, 30, 50, 100, 250, 500, 750 µg/mL para a realização dos ensaios *in vitro*.

- **bioterápico** – produto homeopático, obtido de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, cultivadas em meio de cultivo axênico - Liver Infusion Triptose (LIT) modificado (vide item 4.3.3.), e inativadas em banho de ultra-som, sendo preparado nos Laboratórios de Parasitologia e Homeopatia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP - Ribeirão Preto.

Para essa preparação farmacêutica, as formas promastigotas foram inativadas em banho de ultra-som (L e R ultrasonic®) durante 4 horas. Após este período, 5 µL foram colocados sobre uma lâmina e observou-se por meio de um microscópio se as formas promastigotas estavam inativadas, ou seja, ausência de motilidade, e alterações morfológicas. O volume obtido destas formas inativadas foi de 9 mL, onde se adicionou 21 mL de cloreto de sódio à 0.9% resultando em uma diluição de 43% da cultura, sendo esta chamada de solução mãe. Em seguida procedeu-se as sucessivas diluições até as potências 30 CH, 200 CH, 30 DH e 200 DH de acordo com a técnica da FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, (1997), a dosagem utilizada do bioterápico foi 100µL, valor estabelecido por NASI *et al.* (1982).

4.3.2.1.Preparação farmacotécnica do bioterápico

Ponto de partida: para a Escala Centesimal (diluição 1:100) o veículo utilizado até a 6CH foi a solução fisiológica 0.9%, seguindo o mesmo veículo da solução mãe, sendo para a escala Decimal (diluição 1:10) esse mesmo veículo foi utilizado até a 3DH, as potências intermediárias foram realizadas com etanol à 70% servindo como solução estoque, e o veículo

para a potência desejada é o etanol 30%. O líquido a ser dinamizado deverá ocupar 2/3 da capacidade do frasco utilizado na preparação, sendo succionado 100 vezes, pelo processo manual, onde a sucussão foi executada por meio de um movimento contínuo e ritmado, no sentido vertical, com o antebraço, de modo que produza choque do fundo do frasco contra um anteparo semi-rígido.

4.3.3. Meio de cultura

O meio de cultura empregado neste trabalho foi o meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT), realizado por CAMARGO, 1964, seguido de algumas modificações. O meio LIT modificado é constituído é por: 8 g de Na_2HPO_4 , 4 g de NaCL, 2 g de dextrose, 5 g de triptose, 5 g de infuso de fígado, 0,4 g de KCL, solução de hemina bovina (10mg/mL), para 1.000 mL. O pH foi ajustado para 7,2 utilizando KCL 2,0N ou KOH 10%, conforme o pH apresentado. Após este procedimento o meio foi autoclavado a 120°C por 15 minutos, e em seguida acrescentou-se 30% de soro bovino fetal inativado, 20mL de solução de hemoglobina, 10mL de solução de glicose a 20%, 5000U/mL de estreptomicina e 5000µg/mL de penicilina, logo após procedeu-se à filtração estéril e distribuiu-se aliquotas de 3 a 5mL em tubos de ensaio previamente esterilizados.

4.3.4. Ensaio Biológicos *in vitro*

4.3.4.1. Formas promastigotas

Para realização do ensaio *in vitro* sobre as formas promastigotas, foi utilizado meio de cultivo axênico, Liver Infusion Tryptose (LIT) modificado. Os parasitas foram

inoculados no meio de cultura em uma concentração de aproximadamente 10^6 formas do parasita/mL. Durante o período de crescimento exponencial dos mesmos, a própolis foi adicionada nas diferentes concentrações citadas anteriormente (vide item 4.3.2.) e, 100 μ L do bioterápico foi adicionado, nas potências desejadas (vide item 4.3.2.). Os ensaios foram em triplicatas realizados em placa de microtitulação (96 poços), de fundo chato, que após a preparação, foi incubada por um período de 24 horas a uma temperatura de 23°C.

Como controle positivo, foi utilizado a anfotericina B e como controle negativo a solução de cloreto de sódio a 0.9%.

Foi avaliada a porcentagem de lise parasitária das formas promastigotas quantitativamente, por meio destas formas sobreviventes, de acordo com a técnica descrita por BRENER (1962), bem como realizada a determinação de Coeficiente de Inibição (IC_{50}) dos compostos testados.

4.3.4.2. Formas amastigotas

Os ensaios *in vitro* utilizando como modelo as formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram realizados em cultura de macrófagos peritoneais, obtidos de camundongos saudáveis.

Inoculou-se intraperitonealmente, em camundongos *Mus musculus*, linhagem swiss, com idade entre 8 a 12 semanas, 1 mL de tioglicolato à 3%. Após 72 horas, os camundongos foram mortos por deslocamento cervical e, com auxílio de uma seringa estéril, foram inoculados 5mL de meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) na cavidade peritoneal. O abdomen do animal foi massageado e a pele rebatida. O exsudato foi

então retirado e armazenado em frasco imerso em banho de gelo. A contagem do número de células foi realizada em câmara de Neubauer.

Em placa de microtitulação (96 poços), foi adicionado 1.5×10^5 macrófagos /mL e 1.5×10^6 parasitas /mL completando-se com RPMI um volume de 200 μ L. Após este período o material foi incubado em estufa de atmosfera de 5% CO₂ (Revco), à 37°C, durante três horas. Em seguida, foi adicionada a concentração desejada das substâncias em análise, onde as concentrações da própolis foram, 10, 100, 250 μ g/mL. Para o bioterápico foram utilizadas as mesmas potências e a mesma concentração utilizada no ensaio *in vitro* sob as formas promastigotas. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B nas mesmas concentrações da própolis e, para o controle negativo utilizou-se apenas os macrófagos, juntamente com os parasitas. Todas as amostras em análise foram incubadas por um período de 5 dias.

Após esse período, procedeu-se a avaliação das amostras por método colorimétrico, utilizando-se o MTT [- 3, (-4,5 dimetiltiazol - 2 - il) -2,5 difenil tetrazolium brometo] como agente cromóforo (ABE & MATSUKI, 2000). A leitura da absorbância da reação desencadeada foi realizada em um leitor de microplacas a um comprimento de onda de 570nm, utilizando-se como referência 630nm e uma calibração de 1,99, para a eficácia do ensaio (MUELAS-SERRANO *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos foram analisados por meio do método estatístico ANOVA, com um grau de significância previamente adotado de ($p < 0,05$).

4.4. Resultados e Discussão

O efeito de diferentes concentrações da própolis sobre as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* é apresentado na Tabela 1. O valor de IC₅₀ encontrado para a própolis foi de 18,26, enquanto para a anfotericina B, foi de 29,63, o que demonstra uma melhor eficiência da própolis em termos de atividade sobre esta forma do parasito.

Compostos	% of lise ± SD X concentração (µg/mL)								IC ₅₀ (µg/mL)
	1	10	30	50	100	250	500	750	
Anfotericina B	36.7±13.8	45.0±3.9	46.9±7.1	48.9±4.2	53.7±7.7	54.9±3.3	68.3±1.5	76.8±4.4	29.63
Própolis	36.0±7.4	51.0±9.2	47.5±9.8	54.4±13.6	48.1±11	62.0±3.4	79.3±2.5	89.6±3.8	18.26

Tabela 1. Avaliação *in vitro* da atividade biológica do Extrato de Própolis sobre as formas promastigotas d *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

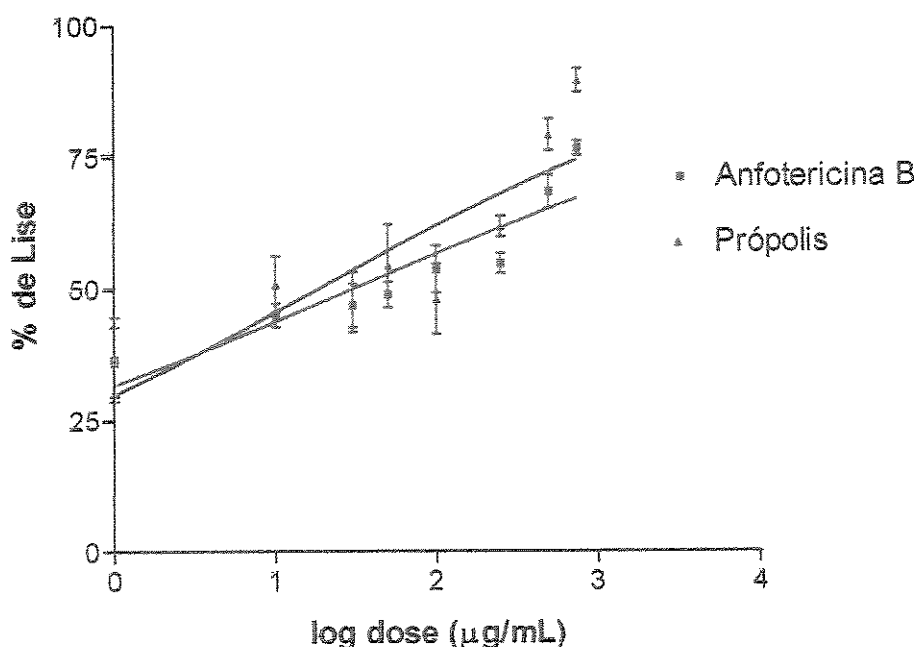


Figura 1. Comparação entre o efeito de diferentes concentrações da própolis e de anfotericina B (controle positivo) sobre promastigotas de *L. (V.) braziliensis* mantidas em meio de cultivo axênico.

Quanto à porcentagem de lise parasitária, (Figura 1), a própolis apresentou 89.6% de lise sobre as formas promastigotas na concentração de 750 µg/mL, contra 76.8% da anfotericina B. Testes estatísticos pelo método ANOVA, revelaram que a diferença entre os valores encontrados para a própolis e para a anfotericina B não foi significativa ($p > 0,05$), quando esses valores foram comparados entre si. Apesar da anfotericina B ter apresentado porcentagem significativa de lise parasitária, devemos levar em conta os efeitos colaterais que esta substância provoca nos pacientes, devido à sua alta toxicidade.

Drogas à base de antimoniato foram aprovadas para a utilização no tratamento de Leishmaniose em 1947 (BERNAM, 1997), onde os derivados trivalentes são mais tóxicos do

que os pentavalentes. Entretanto, existe descrição de casos de Leishmaniose Visceral e Cutânea Difusa refratários ao tratamento convencional (BADARÓ & JOHNSON JR., 1993). Atualmente é observada a resistência a esse tratamento para algumas espécies de *Leishmania* (BECKER *et al.*, 1999).

Apesar de vários relatos da utilização desses antimoniais na terapêutica, não podemos ignorar os obstáculos que essas drogas proporcionam aos pacientes, tais como alta toxicidade, diversos efeitos colaterais como anorexia, náuseas, vômitos, toxicidade cardíaca, sérios efeitos hepatotóxicos, e resistência parasitária. (HERWALDT & BERMAN, 1992).

No entanto, no presente experimento, a utilização da própolis demonstrou resultados favoráveis, apresentando uma atividade leishmanicida, dados os resultados satisfatórios obtidos neste trabalho, comprovando uma melhor eficácia do composto em relação ao controle positivo, devido a sua baixa toxicidade e baixo custo.

Leishmaniose é uma doença parasitária que, apesar de todos os esforços até hoje empregados na pesquisa de novas terapias, a cura ainda permanece sem alternativas viáveis (DE PAULA, 1999).

Apesar dos diferentes quadros clínicos determinados pelas diferentes espécies do gênero *Leishmania*, o tratamento realizado até hoje é basicamente o mesmo, modificando apenas a via, a dose e o tempo de duração (DE PAULA, 1999).

Diante da problemática no tratamento da Leishmaniose, a busca por novos compostos capazes de combater esta enfermidade, vem sendo amplamente pesquisado por diversos autores. KAYSER *et al.* (2000) estudaram *in vitro* uma série de derivados de naftoquinonas monoméricas e diméricas, sobre as formas promastigotas de diversas espécies de *Leishmania*, encontrando uma grande variabilidade de atividade entre as mesmas.

Muitas substâncias de origem natural, tanto animal como vegetal, vêm sendo largamente pesquisadas para a cura de várias doenças e a Leishmaniose inclui-se nessa busca alternativa. KAYSER & KIDERLEN em 2001, observaram *in vitro* sob as formas promastigotas extracelulares e amastigotas intracelulares, que algumas plantas derivadas de chalconas, demonstraram atividade contra os parasitas do gênero *Leishmania*. Esses derivados tiveram uma apreciável atividade antileishmanial, mas também uma toxicidade relativamente alta para o sistema monofagocitário.

A atividade biológica da própolis, no combate às alterações patológicas em diferentes níveis, inclusive algumas determinadas por diferentes espécies de parasitas, já é conhecida e amplamente relatada na literatura (BURDOCK, 1998).

Ilustrando essa afirmação, BOLSHAKOVA, em 1975, utilizou satisfatoriamente a própolis como agente antiséptico, antimicótico e bacteriostático para o tratamento das doenças dermatológicas. Muitas outras aplicações da própolis em dermatologia tem sido descritas, como na regeneração dos tecidos, em neurodermatites e dermatites de contato, no eczema microbiano, em casos de psoríase, úlceras trópicas, etc (BOLSHAKOVA, 1975; SCHELLER *et al.* 1977a). Por meio dos resultados apresentados pelos autores SCHELLER *et al.* (1977a) e TORRES *et al.* (1990), foram observados resultados favoráveis em relação à atividade da própolis nos ensaios *in vitro* sobre alguns protozoários, SCHELLER *et al.* (1977b) avaliaram a atividade deste tipo de composto na concentração de 150mg/mL, sobre três cepas de *Trichomonas vaginalis*, e TORRES *et al.* (1990) observaram uma inibição no crescimento da *Giardia lamblia* de 98%, onde a concentração utilizada foi de 11,6mg/mL, concluindo que este composto possui diversas atividades antiparasitária.

Recentemente, MACHADO *et al.* (2000) estudaram a atividade da própolis sobre as formas promastigotas de 3 diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Os autores observaram

que os valores de IC₅₀ foram específicos para cada espécie avaliada: *L. amazonensis*, de $88,1 \pm 4,1 \mu\text{g/mL}$; *L. braziliensis*, de $35,8 \pm 3,1 \mu\text{g/mL}$; *L. chagasi*, de $55,2 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$.

No presente trabalho, os valores de IC₅₀ obtidos para as formas promastigota de *L. (V.) braziliensis* foram relativamente inferiores quando comparados com os resultados obtidos por MACHADO *et al.* 2000. Esse fato pode ter ocorrido devido às concentrações utilizadas, bem como a origem da própolis, pois de acordo com BUDORCK (1998) este composto pode apresentar diversidade na porcentagem dos componentes que determinam sua ação farmacológica.

Quanto ao bioterápico, podemos observar na potência 200CH uma porcentagem de lise de 60% (Figura 2), quando comparados ao controle. Para essa preparação farmacêutica não foi possível estabelecer uma relação com o controle positivo (anfotericina B) devido a não possibilidade de obtenção de uma curva dose-resposta, pois não existe a possibilidade de determinarmos uma concentração em relação ao bioterápico. Para a determinação da quantidade do bioterápico a ser utilizada no ensaio biológico, foi utilizado o protocolo descrito por NASI *et al.* (1982).

Salientamos que o veículo utilizado nas preparações dos ensaios *in vitro* em relação ao bioterápico não foi o mesmo estabelecido pela Farmacopéia Homeopática (etanol 30%), pois este tipo de veículo poderia alterar os resultados, como por exemplo, determinar a lise celular, principalmente nos ensaios *in vitro* sobre as formas amastigotas do parasita.

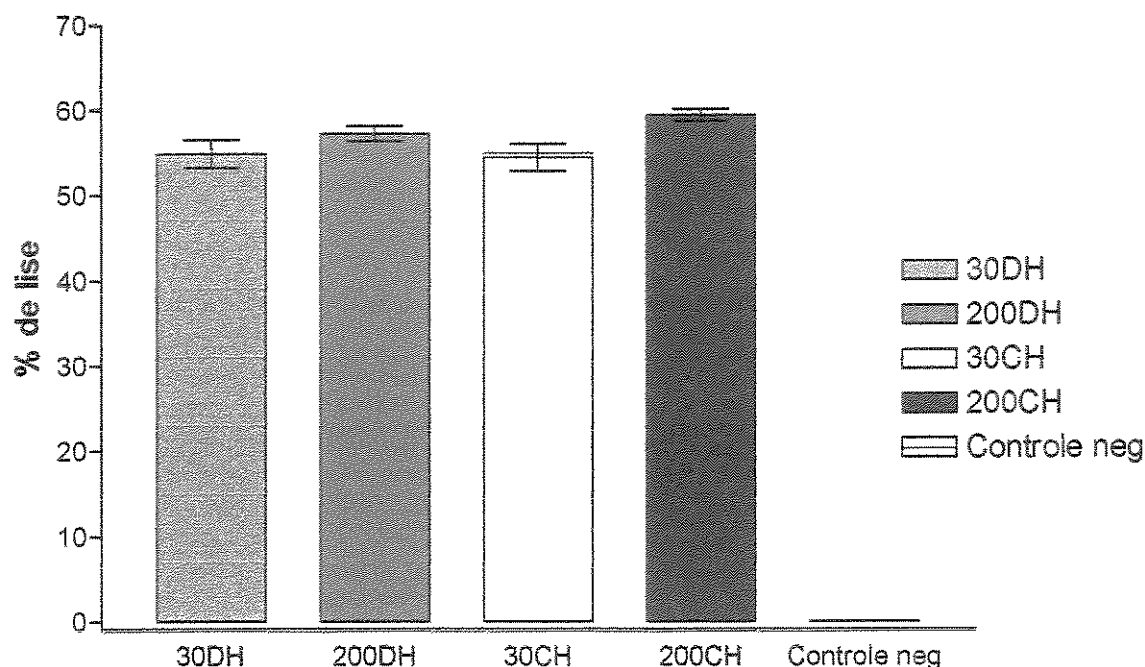


Figura 2. Determinação da atividade biológica do bioterápico sobre as formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em comparação ao controle negativo (solução de cloreto de sódio a 0,9%).

Mesmo apresentando uma pequena variação de atividade entre as diferentes dinamizações, acredita-se que a força medicamentosa apresentada pelo bioterápico não corresponde a uma dependência direta do efeito terapêutico. Assim, acredita-se que o protocolo utilizado não seja aplicável para a avaliação de medicamentos homeopáticos.

Essa afirmação se encontra de acordo com aquelas realizadas por CAIRO (1984), o autor reafirma a teoria de Hahnemann, onde a homeopatia é um “sistema médico” e não um simples “método de cura”, ou seja, sua efetividade depende do organismo como um todo, e de sua resposta contra o mecanismo de agressão desencadeado, não dependendo apenas de aspectos isolados, como é o caso do crescimento das formas promastigotas do parasita em um meio de cultivo axênico.

Para os ensaios *in vitro* sobre as formas amastigotas, a atividade de ambas as preparações não foram favoráveis, para o bioterápico obtivemos um valor máximo de 0,2% de lise parasitária (Figura 3). As mesmas considerações realizadas para os ensaios sobre as formas promastigotas também são válidas para essa metodologia de avaliação, onde para a eficácia do medicamento homeopático necessita do organismo como um todo.

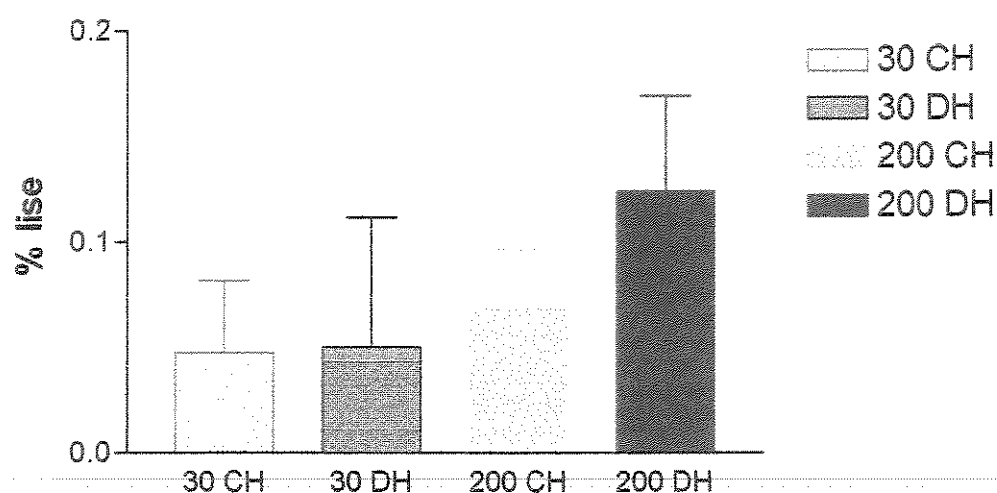


Figura 3. Porcentagem de lise das formas amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, submetidas à avaliação biológica com o bioterápico nas potências 30 CH, 30 DH, 200 CH e 200 DH em ensaios *in vitro*.

Já em relação à própolis, obtivemos um valor máximo de aproximadamente 1,5% de lise parasitária (Figura 4), sendo que os resultados obtidos não foram significativos.

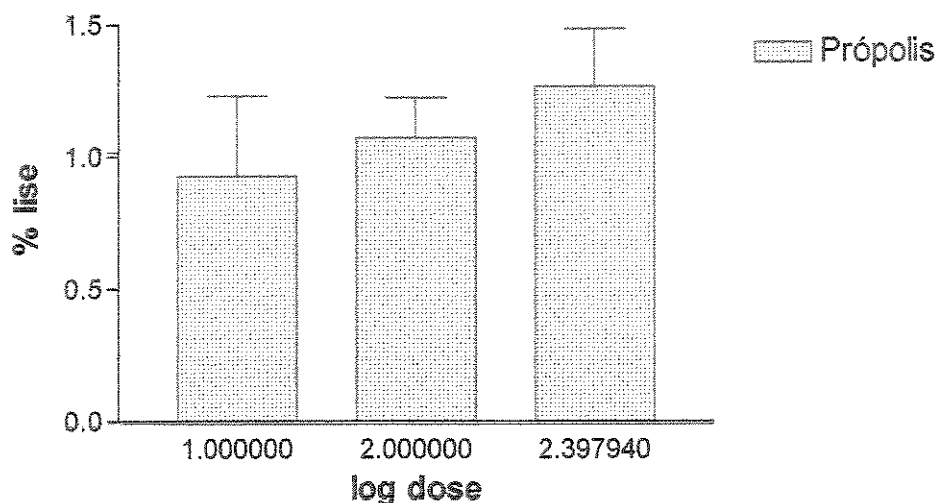


Figura 4. Porcentagem de lise das formas amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, tratados com a própolis nas concentrações de 10, 100 e 250µg/mL em ensaio *in vitro*

SANTOS *et al.* (1997) avaliaram *in vitro* a atividade leishmanicida do extrato etanólico do caule e das folhas de *Plumbago scadens* (Plumbaginaceae). Na concentração de 100µg/mL, o extrato inibiu 88% do crescimento das formas promastigotas da *L. amazonensis*. Já em relação às formas amastigotas intracelulares a atividade foi de 61%.

BARATA *et al.* (2000), avaliando a atividade leishmanicida de neolignanais isoladas de *Virola surinamensis*, bem como seus análogos sintéticos, sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani* em culturas, verificaram que alguns dos compostos foram eficazes apenas para as formas promastigotas, sendo que outros foram eficazes para as formas amastigotas, observando assim uma variabilidade em termos de atividade biológica de acordo com a forma do parasitida avaliada.

De acordo com o relatado por SANTOS *et al.* (1997), a menor atividade sobre as formas amastigotas pode ter ocorrido pelo fato de existirem diferenças metabólicas entre as duas formas, e o princípio ativo estar agindo sobre uma determinada via mais importante para a forma promastigota, do que para a forma amastigota do parasita, como por exemplo, a via glicolítica.

5. Capítulo II

Atividade Biológica do Extrato de Própolis e do Bioterápico no Tratamento de *Mus musculus* Experimentalmente Infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

5.1. Resumo

Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, motivaram-nos a realizar o estudo do efeito terapêutico da própolis e do bioterápico na infecção experimental por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Foi utilizado como modelo experimental camundongos *Mus musculus*, infectados com aproximadamente 2×10^6 formas promastigotas do parasita. O tratamento iniciou-se após o aparecimento dos nódulos iniciais da lesão leishmaniótica, sendo executado pelas vias oral, intraperitoneal e tópica, conforme o grupo experimental, durante 90 dias consecutivos. A avaliação do efeito terapêutico foi realizada de acordo com a variação média do diâmetro da lesão. Ambos os compostos demonstraram relativo efeito terapêutico, quando comparados com o controle negativo, sendo que os grupos tratados com o bioterápico nas potências 30CH e 200CH tanto pela administração oral quanto intraperitoneal, e a própolis administrada por via oral e tópica apresentaram uma maior redução do diâmetro da lesão em relação aos outros grupos tratados.

5.2. Introdução

A leishmaniose constitui um importante problema de saúde pública, especialmente nas Américas Latina e Central, África e esporadicamente na Europa e América do Norte (MARSDEN, 1984). No Brasil, a leishmaniose cutânea é causada principalmente por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*; a mucocutânea, por *L. (V.) braziliensis*; e a visceral por *L. (L.) donovani* (PEREA *et al.*, 1991).

A infecção por *L. (V.) braziliensis* produz um espectro de manifestações que incluem a leishmaniose cutânea (LC), com lesões geralmente únicas, cuja localização varia de acordo com a faixa etária, sendo que em pacientes menores que cinco anos existe a predominância de lesões acima da cintura, e a proporção de lesões acima e abaixo da cintura é mais ou menos equivalente na faixa etária entre 6 e 15 anos. Já as lesões que ocorrem abaixo da cintura só predominam em indivíduos maiores de 15 anos (VELA, 1996).

Como quase todas as doenças parasitárias, as incidências de leishmaniose cutânea e visceral estão crescendo nas regiões endêmicas. Nos últimos 10 anos, ocorreu rápido aumento de pessoas afetadas por essa doença. Recrudescência em forma de epidemia nos centros urbanos tem sido observada em vários pontos do país (GRATZ & JANY, 1994).

As várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* causam um espectro diversificado de formas clínicas que vão desde lesões de pele, que em geral se curam espontaneamente, determinadas principalmente por *L. amazonensis* e *L. major*, até o envolvimento mucoso, causado principalmente por *L. (V.) braziliensis*, com acometimento do septo nasal, laringe, lábios, palato, podendo levar o indivíduo à morte (SANTOS *et al.*, 1997; DE PAULA, 1999).

Desde o início do século quando o médico Gaspar Vianna tratou com sucesso um caso de leishmaniose mucocutânea usando tártaro emético, o antimônio está presente nas formulações contra todas as formas de leishmaniose. A partir da década de 1940 até os dias de hoje, o tratamento de primeira escolha é baseado em injeções intramusculares diárias de antimonial pentavalente, sendo desconfortável e potencialmente tóxico, além de ser freqüentemente ineficaz (HEPBURN, 1994).

O alto custo do tratamento, a dificuldade de administração e a toxicidade medicamentosa são fatores limitantes na terapêutica da leishmaniose, que, por sua vez, surge como endemia crescente. A constatação da falta de resposta do tratamento ao antimonial, caracterizando formas resistentes da doença e o longo período de tratamento, tornam urgente a necessidade de medicamentos alternativos para o tratamento da leishmaniose, como por exemplo aqueles derivados de princípios ativos animais e/ou vegetais, como é o caso da própolis, bem como medicamentos pertencentes à medicina alternativa, como é o caso dos bioterápicos, uma vez que ambos apresentaram resultados animadores em ensaios *in vitro* previamente realizados.

5.3. Material e Métodos

5.3.1. Preparações avaliadas

As preparações analisadas foram a própolis, produto apiterápico originário da região da cidade de Oliveira, Estado de São Paulo – Brasil, em uma concentração de 600µg/mL, e um bioterápico, medicamento homeopático preparado a partir de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, obtidas de meio de cultivo axênico (Liver Infusion Triptose - LIT modificado) e inativadas por meio de um ultra-som (L e R ultrasonic). Após este procedimento foi realizada

uma diluição de 3 partes do material inativado para 7 partes do veículo, solução de cloreto de sódio a 0,9%, procedendo-se às diluições e às potências desejadas, de acordo com técnica da FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA (1997). A preparação do bioterápico foi realizada no Laboratório de Parasitologia e Homeopatia da Faculdade de Ciências Farmacêutica – USP– Ribeirão Preto.

5.3.2. Ensaios Biológicos *in vivo*

Os ensaios *in vivo* foram realizados em camundongos *Mus musculus* albinos, machos, linhagem swiss, pesando 20 a 23g cada. Estes animais foram infectados experimentalmente com aproximadamente 2×10^6 formas promastigotas da *L. (V.) braziliensis*, inoculadas subcutaneamente na cauda dos camundongos. Após o aparecimento das lesões, iniciou-se o tratamento nos animais com as preparações propostas.

Os animais foram divididos em grupos, seguindo o seguinte protocolo:

Grupo I (controle negativo) – 20 animais experimentalmente infectados, onde cinco camundongos foram tratados intraperitonealmente, cinco foram tratados por via oral, cinco foram tratados simultaneamente pelas vias oral e tópica, e cinco somente pela via tópica, com solução de cloreto de sódio a 0,9%.

Grupo II (grupo tratamento) - 10 camundongos experimentalmente infectados, onde cinco animais foram tratados com a própolis por via oral e cinco por aplicação tópica (dose de 600µg/mL).

Grupo III (grupo tratamento) - 5 camundongos experimentalmente infectados, os quais foram tratados com a própolis por aplicação pelas vias tópica e oral, simultaneamente.

Grupo IV (grupo tratamento) - 10 camundongos experimentalmente infectados, onde 5 animais foram tratados com o bioterápico na potência 30CH por via oral e 5 por via intraperitoneal.

Grupo V (grupo tratamento) - 10 camundongos experimentalmente infectados, onde 5 animais foram tratados com o bioterápico na potência 30DH por via oral e 5 por via intraperitoneal.

Grupo VI (grupo tratamento) - 10 camundongos experimentalmente infectados, onde 5 animais foram tratados com o bioterápico na potência 200CH por via oral e 5 por via intraperitoneal.

Grupo VII (grupo tratamento) - 10 camundongos experimentalmente infectados, onde 5 animais foram tratados com o bioterápico na potência 200DH por via oral e 5 por via intraperitoneal.

Para os grupos tratados com a própolis por via oral foi administrada dosagem de 1,5mg/Kg/dia para cada animal (MAKSIMOVA-TODOROVA *et al.*, 1985), e para os grupos tratados com o bioterápico foi administrado 0.1mL/animal/dia do medicamento homeopático, de acordo com o protocolo estabelecido por NASI *et al.* (1982). Em todos os grupos, o período de tratamento foi de 90 dias consecutivos.

A determinação dos resultados foi realizada de acordo com a variação do diâmetro das lesões, medidos com ajuda de um paquímetro digital, com intervalos de 30 dias, até completar os 90 dias de tratamento.

Para a análise estatística entre os diferentes grupos avaliados foi utilizado o método de ANOVA, considerando-se como significante os resultados que apresentaram valores de p menores que 5%.

5.4 Resultados e Discussão

O grupo tratado com a própolis pelas vias de administração oral e tópica simultaneamente demonstrou melhores resultados, quando comparado com o controle negativo e com os outros grupos de tratamento (Figura 1). O diâmetro médio das lesões deste grupo foi inferior em relação aos demais, sendo que não foi observada a cura parasitológica e nem mesmo a regressão total da lesão em nenhum dos camundongos avaliados (Anexo - Figuras A e B).

Ressalte-se que, em alguns animais, as lesões permaneceram nodulares durante todo o período de tratamento (Anexo - Figura B).

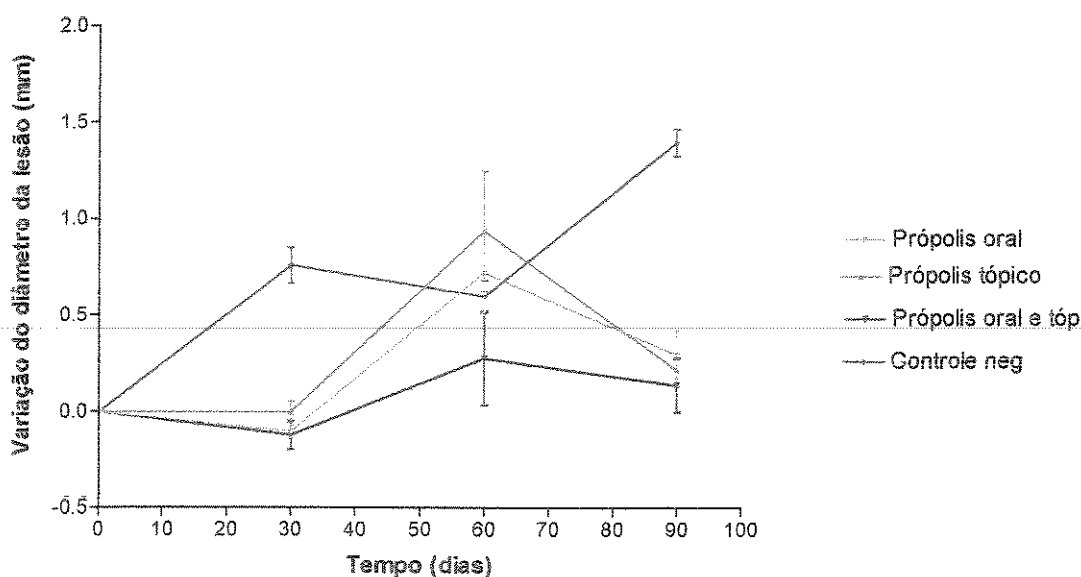


Figura 1. Variação do diâmetro médio das lesões em camundongos *Mus musculus*, infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e submetidos ao tratamento por extrato da própolis, a uma concentração de 1,5mg/kg/dia, durante um período de 90 dias, pelas vias de administração oral, tópica e oral e tópica, concomitantemente.

Embora nos ensaios *in vitro* obtivemos resultados bastante favoráveis para as formas promastigotas, nos ensaios *in vivo* não observamos a cura dos animais, o que corrobora o

observado nos ensaios *in vitro* sobre as formas amastigotas (Capítulo 1). Ainda, não foi observada significância entre os grupos avaliados ($p>0,05$).

Situação semelhante a essa foi observada por DE CASTRO & HIGASHI (1995), onde os autores avaliaram a atividade da própolis sobre o *T.cruzi*, observando pelos resultados *in vitro* uma atividade biológica altamente significativa em relação ao parasita. Já em relação aos ensaios *in vivo*, os autores não evidenciaram uma atividade da própolis sobre este protozoário, mesmo em concentrações elevadas, e em diversas formulações do produto apiterápico.

Por suas observações, a razão para esta diferença poderia ser a rápida metabolização da própolis nos animais experimentais, alegando ainda que precisaríamos de estudos mais avançados no que diz respeito ao fracionamento da resina (própolis), seleção de frações ativas nos ensaios *in vitro* e, se possível, a purificação dos principais constituintes desse extrato, que poderiam ser avaliados experimentalmente nos ensaios *in vivo*, uma vez que a própolis é composta por diversas classes de substâncias, como por exemplo, aldeídos fenólicos, flavonas, flavononas, álcoois, etc (PARK & IKERGAKI, 1998; CAMPOS, *et al.*, 1998).

Em relação aos bioterápicos, podemos observar (Figuras 2 e 3) que no início do tratamento houve uma redução do diâmetro médio das lesões, tanto para o grupo submetido ao tratamento pela via oral (Figura 3), quanto aquele submetido ao tratamento pela via intraperitoneal (Figura 2), quando comparados ao grupo controle. Após o 30º dia de tratamento, podemos observar um nítido aumento do diâmetro médio das lesões, que se prolonga até próximo do 60º dia, onde ocorre nova regressão do quadro. Diante dos fatos apresentados, a utilização do bioterápico como agente terapêutico demonstrou resultados altamente significantes, ou seja, após

90 dias de tratamento as variações de tamanho das lesões apresentaram-se menores em relação ao controle negativo.

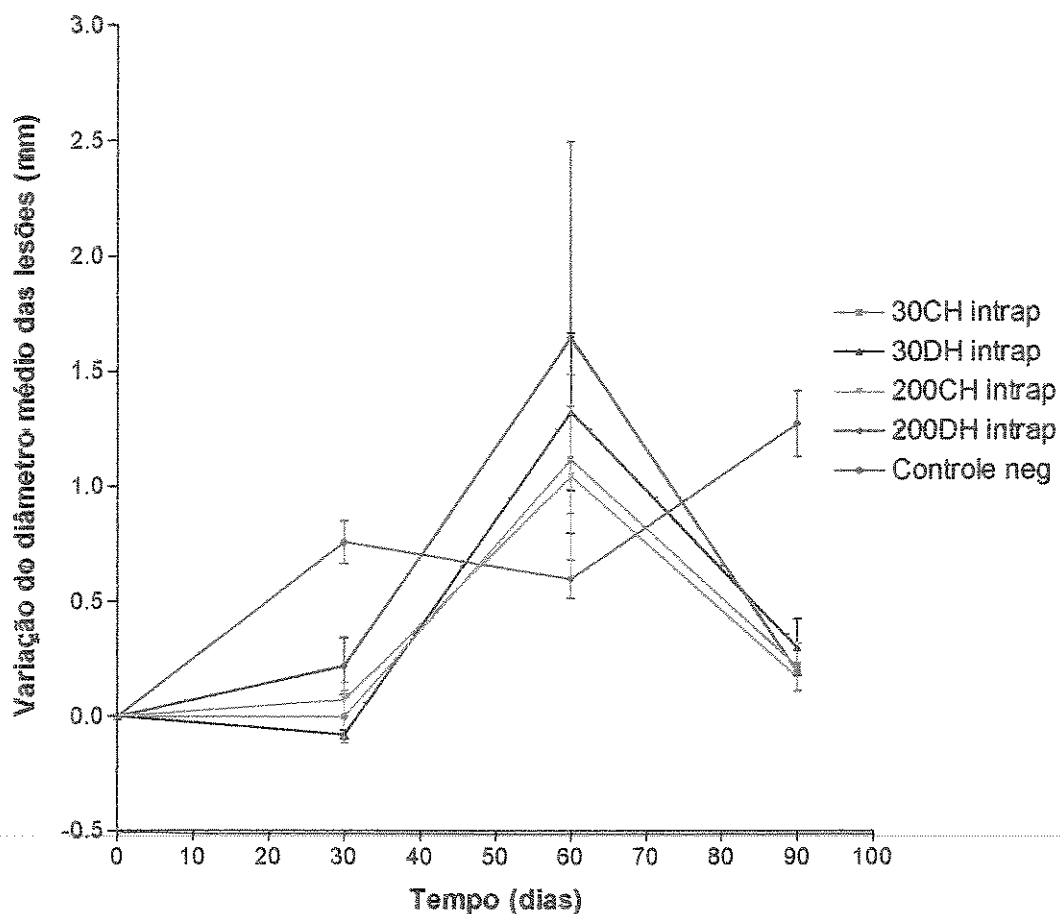


Figura 2. Variação do diâmetro médio das lesões em camundongos *Mus musculus*, infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e submetidos ao tratamento com 100 μ L/dia de bioterápico, em diferentes dinamizações (30DH, 200DH, 30CH e 200CH), durante um período de 90 dias, pela via de administração intraperitoneal.

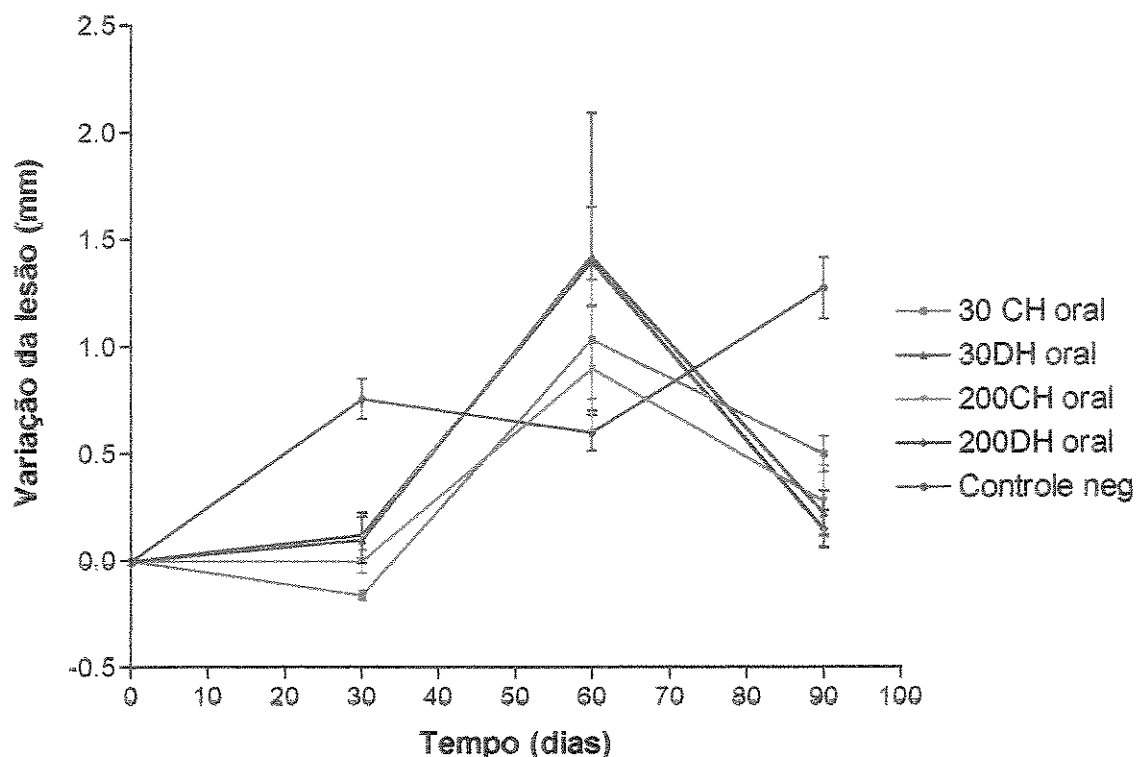


Figura 3. Variação do diâmetro médio das lesões em camundongos *Mus musculus*, infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e submetidos ao tratamento com 100µL/dia de bioterápico, em diferentes dinamizações (30DH, 200DH, 30CH e 200CH), durante um período de 90 dias, pela via de administração oral.

Apesar de também não observarmos a cura parasitológica dos animais tratados pelo bioterápico, é válido salientar o potencial terapêutico dessa preparação farmacêutica nos animais infectados por *L. (V.) braziliensis*. Ainda, salientamos que tanto os grupos tratados com o bioterápico pela via oral como pela via intraperitoneal nas potências 30CH e 200CH, apresentaram maiores reduções de tamanho das lesões, demonstrando resultados mais favoráveis quando comparados aos demais grupos (Anexo – Figuras A, C e D), mesmo não observando-se valores estatisticamente significantes entre os diferentes grupos tratados ($p > 0,05$).

Os efeitos benéficos determinados por avaliações clínicas da utilização de bioterápicos em doenças parasitárias são pouco descritos na literatura científica. Ensaios clínicos com o bioterápico Trypanosominum TC 30, nas formas crônicas e sintomáticas da doença de Chagas, foram analisados por GERALDINO (1986), onde foi observada uma melhora significativa no quadro geral do paciente e dos órgãos lesados, após o uso desse medicamento.

Em termos de avaliação experimental a situação é semelhante, havendo poucos trabalhos relacionados à experimentação biológica de bioterápicos. RIBEIRO *et al.* (1989) avaliaram os efeitos de proteção em camundongos infectados por *T. cruzi* e tratados com bioterápico Trypanosominum TC D30, por meio de ensaios de lise por complemento *in vitro*. Neste experimento foi observada, aproximadamente, 50% de lise das formas do parasita, quando incubadas com soro obtido de animais tratados previamente com o bioterápico, enquanto que os tripomastigotas incubados com o soro normal e não imune, não foram lisados.

LOPES *et al.* (1994) avaliaram o parasitismo tissular e a histometria em órgãos de camundongos tratados com o bioterápico TC D 30 e infectados com as cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*. A histopatologia dos tecidos cardíaco e hepático, revelou nesses animais uma diminuição do parasitismo tissular.

Em relação ao presente trabalho, acredita-se que esses resultados poderiam ter sido mais favoráveis se o processo de inativação do bioterápico não fosse realizado por meio de banho de ultrassom, visto que nesse tipo de processo ocorre uma destruição das características bioquímicas e celulares do parasita (LEHNINGER *et al.*, 1995), anulando a Lei do Semelhante, onde semelhante cura semelhante, a principal Lei da Homeopatia. Dessa forma, acredita-se que a inativação pelo etanol, que mantém praticamente todas as características do parasita, e como foi realizada por alguns autores na avaliação de outros bioterápicos (RIBEIRO *et al.*, 1989; NASI *et al.*, 1994) proporcionarão melhores resultados.

A pesquisa de novos bioterápicos como forma de tratamento de doenças parasitárias mostra a necessidade de buscar alternativas necessárias para o perfeito equilíbrio de saúde da população, entretanto, requerem uma modificação na metodologia clássica de pesquisa experimental e na legislação da homeopatia, criando-se novos parâmetros que possam atender a Lei de Similitude e não somente a alopatia, que é uma mediana totalmente paralela.

6. Capítulo III

Determinação da Produção de Óxido Nítrico pela Própolis e por Bioterápico Produzido a partir de Formas Promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

6.1. Resumo

A ativação dos macrófagos é crucial para o controle de infecções causadas por parasitas intracelulares, e o óxido nítrico (NO) produzido por macrófagos é o principal responsável pela atividade microbicida contra vários patógenos intracelulares. O sinal mais importante para a ativação dos macrófagos é o mediado pela interleucina IFN- γ , e outras citocinas como o TNF- α , fatores inespecíficos, como o lipopolissacáride (LPS), também podem estar envolvidos neste processo de ativação dos macrófagos. Frente a isso ao avaliar a atividade da própolis e do bioterápico sobre cultura de macrófagos peritoneais, obtidos de camundongos *Mus musculus*, um dos objetivos propostos foi verificar a capacidade de indução da produção de NO em relação a essas preparações. Os resultados obtidos demonstraram a capacidade da própolis em induzir esse reativo, em uma concentração superior a 250 μ g/mL.

6.2. Introdução

A leishmaniose é uma severa doença debilitante que infecta, anualmente, um elevado índice de pessoas por todo o mundo, sendo que muitos desses indivíduos residem em áreas rurais onde não se tem acesso ao tratamento (ASFORD *et al.*, 1992).

A doença é causada por um parasito protozoário flagelado que sobrevive e se multiplica no interior de macrófagos dos hospedeiros mamíferos e são transmitidos por insetos do gênero *Phlebotomus*, que têm sua prevalência principalmente na Europa, Ásia e África, tendo em vista que no Continente Americano o gênero *Lutzomyia* é predominante (ALEXANDER & YOUNG, 1992).

A infecção do homem e várias outras espécies de mamíferos por tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* depende de complexas interações entre parasito e o hospedeiro vertebrado, que irão determinar a apresentação clínica e o curso evolutivo da leishmaniose. Estas interações se realizam entre duas formas do ciclo evolutivo das leishmanias (promastigotas desenvolvidos no inseto vetor, amastigotas intracelulares) e os macrófagos do hospedeiro (HARKER, 1992).

LOCKSLEY & LOUIS (1992) discutiram, de modo claro, que a participação da resposta imunológica celular na indução da atividade microbicida de macrófagos é de fundamental importância na resistência do hospedeiro. Certamente, o tipo de resposta a ser desenvolvida pode ser influenciado pelas citocinas produzidas durante a infecção. De uma maneira geral, a população de linfócitos T auxiliares (células T CD4) subdividem-se em duas sub-populações: Th1 e Th2, as quais foram definidas de acordo com o seu padrão de secreção de citocinas (MOSMANN *et al.*, 1986). A sub-população Th1 secreta IL-2 e IFN- γ induzindo, preferencialmente, a ativação de macrófagos e respostas mediadas por células (CHER &

MOSMANN, 1987), enquanto Th2 secreta preferencialmente IL-4 e IL-10, que estão envolvidas na desativação de macrófagos e imunidade humoral (COFFMAN *et al.* 1988).

MONCADA *et al.* (1991), relatam que o óxido nítrico está envolvido em diversas funções biológicas em diferentes sistemas, como a vasodilatação sanguínea, agregação de plaquetas e neurotransmissão. É considerada como uma molécula efetora contra vários patógenos intracelulares, incluindo *Toxoplasma gondii* (ADAMS *et al.* 1990), *L. major* (LIEW *et al.* 1991), *Trypanosoma cruzi* (GAZZINELLI *et al.* 1992) e *Candida albicans* (CENCI *et al.* 1993).

Com base em resultados anteriores, o presente trabalho tem como objetivo a verificação da produção do óxido nítrico em experimentos *in vitro*, utilizando como agentes efetores dessa produção um bioterápico, produzido a partir de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e pela própolis.

6.3. Material e Métodos

6.3.1 Preparações avaliadas

- a) **própolis**, produto apiterápico obtido da região da cidade de Oliveira, Estado de São Paulo, Brasil.
 - b) **bioterápico**, obtido de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, cultivadas em meio de cultura axênica (LIT modificado). Essa cultura foi inativada por meio de um ultra-som (L e R Ultrasonic) por 4 horas. O volume obtido dessa cultura inativada foi de 9 mL, onde adicionou-se 21mL de solução de cloreto de sódio 0,9%. A seguir, procedeu-se a realização das
-

concentrações e potências desejadas, de acordo com o preconizado na FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA (1997). Este procedimento foi realizado nos Laboratório de Parasitologia e de Homeopatia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP - Ribeirão Preto.

6.3.1.Deteção de óxido nítrico

Camundongos albinos, da linhagem Swiss, receberam 1 mL de tioglicolato 3%, pela via intraperitoneal, 96 horas antes de serem mortos e terem a cavidade peritoneal lavada com 5 mL de meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) estéril. O lavado foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm e seu sobrenadante desprezado. O “pellet” formado foi ressuspenso em 1mL de meio RPMI-1640, contendo 10% de soro bovino fetal e antibióticos (penicilina e estreptomicina). Desta suspensão foi retirada uma alíquota de 10µL, a qual foi diluída em solução de azul de tripan, para a determinação e contagem das células viáveis. Foram distribuídas aproximadamente 2×10^5 células por poço, em microplaca de titulação de 96 “wells”. O material foi incubado em estufa contendo atmosfera de 5% de CO₂, durante 30 minutos, a 37° C. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado, e nos poços, distribuiu-se a própolis nas concentrações de 10, 100 e 250µg/mL e, 100µL do bioterápico nas seguintes potências: 30CH, 30DH, 200CH e 200DH, completando-se o volume (200µL) com o meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal, o experimento foi realizado em triplicata. Aos poços referentes ao controle positivo, foi adicionado meio rico, contendo RPMI-1640, soro bovino fetal (10%), IFN-γ e LPS (30ng/mL) e, para o controle negativo adicionou apenas o meio RPMI-1640. Após 24 horas de incubação, a placa foi centrifugada a 1500rpm

durante 4 minutos, 100 μ L do sobrenadante foi recolhido e transferido para outra microplaca. Foi então adicionado igual volume de reagente de Greiss, permitindo a revelação por meio de espectroscopia, utilizando-se filtro de 540nm. A curva padrão de 100 μ M a 0.9 μ M foi realizada utilizando NO₃⁻ com diluição seriada na base 2 (GREEN *et al.* 1982).

A avaliação estatística foi realizada pela aplicação do método One-way ANOVA, considerando-se significante os valores de p menores de 5%.

6.4 Resultados e Discussão

Apenas a própolis na concentração de 250 μ g/mL demonstrou um aumento significativo da produção na indução de óxido nítrico (Figura 1), quando comparado com a amostra tratada com INF- γ /LPS (controle positivo). Estatisticamente, o experimento foi avaliado pelo método de ANOVA, onde verificamos para essa concentração um grau de significância de $p < 0,001$.

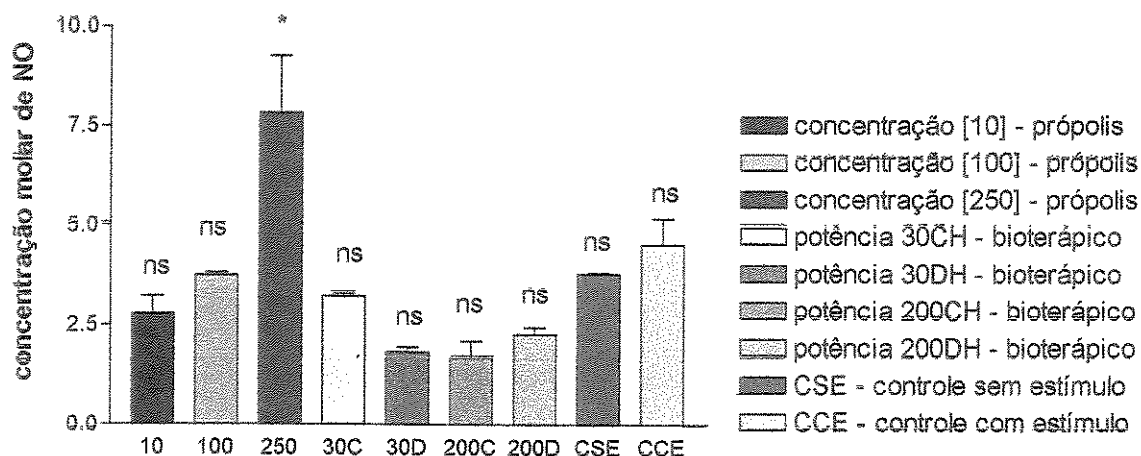


Figura 1. Determinação da produção celular de Óxido Nítrico, por absorvância, após 24 horas da adição do Bioterápico e da Própolis em cultura de macrófagos peritoniais, obtidos de camundongos *Mus musculus*.

^{ns} não significante; * $p < 0,001$.

A ativação dos macrófagos é importante para o controle de infecções causadas por parasitas intracelulares como os pertencentes ao gênero *Leishmania*. Neste sentido, tem sido demonstrado claramente que o óxido nítrico produzidos por macrófagos, é o principal responsável por sua atividade microbicida contra vários patógenos intracelulares (GREEN *et al.*, 1990). Um sinal importante para a estimulação dos macrófagos é o IFN- γ e outras citocinas como o TNF- α , e fatores inespecíficos como o LPS, que podem estar envolvidos neste processo de ativação (ALCINA & FRESNO, 1987).

Em experimentos *in vivo*, várias evidências correlacionaram a produção de NO com o controle da infecção por *L. major*. Neste contexto, LIEW *et al.* (1990) demonstraram que o tratamento de camundongos da linhagem CBA, resistentes à infecção por *L. major*, com o

inibidor específico da NOSi (L-NMMA) determinou um aumento da intensidade e da carga parasitária da lesão.

STENGER *et al.* (1996a) demonstraram que a expressão da NOSi, na lesão e linfonodo de camundongos resistentes à infecção por *L. major*, está diretamente relacionada à ausência de parasitos nestes sítios e que animais susceptíveis expressam menos NOSi que animais resistentes. Este mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que o tratamento com inibidor da NOSi foi capaz de reativar a infecção latente em animais geneticamente resistentes à infecção, demonstrando assim que o controle da replicação do parasito intracelular é dependente da produção de NO (STENGER *et al.*, 1996b)

Estudos *in vivo* realizados por (TITUS *et al.* 1989) em camundongos susceptíveis e resistentes à infecção por *Leishmania major*, foram tratados com TNF- α recombinante humano. Em relação aos camundongos tratados com esta citocina, observaram uma melhora na infecção, enquanto aqueles tratados com anti-TNF- α , houve uma exacerbação no curso da infecção, sugerindo que o TNF- α desempenha um papel protetor no decorrer da infecção de leishmaniose (TITUS *et al.* 1989; VIEIRA *et al.* 1996; FONSECA, 1997).

HEINZEL *et al.* 1991 e LOUIS *et al.* 2001, demonstraram que a produção de INF- γ possui uma capacidade de curar lesões de diversas linhagem de camundongos infectados com *Leishmania major*.

De acordo com (DIMOV *et al.* 1992; BRATTER *et al.* 1999), observaram a capacidade da própolis induzir *in vivo* a produção de TNF- α , IL-6 e IL-8, estas citocinas são responsáveis pelo combate aos parasitas intracelulares. Ainda a importância do IFN- γ na indução de Óxido Nítrico foi demonstrada por meio de experimentos nos quais essa citocina foi capaz de

aumentar a transcrição da NOSi e a liberação de NO por macrófagos de camundongos estimulados (DING *et al.* 1988; DRAPIER *et al.* 1988).

Várias citocinas atuam de forma sinérgica com o IFN- γ aumentando a produção de NO e potencializando a atividade microbicida das células estimuladas. Neste sentido foi verificado que o TNF- α atua sinergicamente com o IFN- γ na indução da NOSi e conseqüentemente na produção de NO por macrófagos *in vitro* (DING *et al.* 1988).

Podemos ressaltar que a própolis possui um papel importante no controle de infecções, devido a capacidade de indução de TNF- α , que atua em conjunto com o IFN- γ , promovendo um aumento da produção de NO. Sabendo ainda do importante papel do TNF- α no estímulo celular para o controle da infecção por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, acredita-se que a própolis possa atuar no sentido de estimular o organismo do hospedeiro para o combate ao parasitismo, podendo assim atuar como agente coadjuvante no processo terapêutico da infecção.

Em relação ao bioterápico, em nenhuma das potências ocorreu indução de NO. Acredita-se que essa não indução na produção de NO esteja relacionada com a teoria homeopática, onde a eficácia do medicamento homeopático necessita de uma força vital, ou seja, o organismo como um todo, e não apenas de um conjunto de células isoladas, como é realizado nos ensaios *in vitro*.

7. Conclusões Gerais

Diante do exposto, podemos concluir de uma maneira geral que:

a) Para os ensaios *in vitro*:

- A atividade biológica da própolis sobre as formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, demonstrou resultados mais satisfatórios em relação ao controle positivo (anfotericina B); para o bioterápico, esse protocolo não foi efetivo no processo de avaliação;
- Para as formas amastigotas, nem a própolis, nem o bioterápico apresentaram bons resultados, o que demonstrou que essas preparações não foram capazes de matar o parasito intracelular, em um sistema *in vitro*, onde aventamos a necessidade de participação do sistema biológico como um todo para a ocorrência de um efeito efetivo de lise parasitária.

b) Para os ensaios *in vivo*:

- Nesse ensaio, para a própolis administrada concomitantemente por via oral e tópica, observamos melhores resultados quando comparamos aos demais grupos experimentais;
 - Em relação ao Bioterápico, observamos que as potências 30 CH e 200 CH administradas tanto por via oral como por via intraperitoneal, promoveram melhores
-

resultados quando comparados com as outras potências, embora nenhum dos compostos em análise determinou cura parasitológica dos animais tratados;

- Apesar da não observação de cura parasitológica, podemos salientar a elevada importância da experimentação *in vivo* para medicamentos homeopáticos, tendo em vista que os resultados só foram significativos quando da utilização do sistema biológico complexo, o que está em pleno acordo com os princípios que regem a homeopatia, como ciência.

c) Na verificação da indução da produção do óxido nítrico:

- Foi observado que a própolis, na concentração de 250µg/mL, determina uma elevação significativa da produção de NO, indicando que um dos possíveis mecanismos de ação desse extrato possa ser pela determinação de “stress” oxidativo, em um sistema biológico complexo (modelo *in vivo*).
-

8. REFERÊNCIAS

ABE, K.; MATSUKI, N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. **Neurosci. Res.**, v. 38, p.325-329, 2000.

ABECASSIS, J. Fabrication du médicament homéopathique. In: NETIEN, G.; TRAISNEL, M.; VERAÏN, A. **Galenica**. Paris:, 1980. p.69-82, (Technique at Documentation, v.16).

ADAMS, B.; HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; KRHENBUHL, J. L. Microbiostatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **J. Immunol.**, v. 144, p. 2725-2729, 1990.

ALCINA, A.; FRESNO, M. Activation by sinergism between endotoxin and lymphokines of mouse cell line J774 against infection by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Immunol.**, v. 9, p.175-186, 1987.

ALEXANDER, B.; YOUNG, D. D. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a colombian focus of *Leishmania (V.) braziliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.87, n.3, p.397-403, 1992.

ALMEIDA, R. P.; ROCHA, P.; JESUS, A. R.; COSTA, J.; CARVALHO, E. M. Evaluation of cellular immune responses in patients with different clinical forms of tegumentary leishmaniasis. **Allerg. Immunol.**, v.14, p.11-19, 1995.

ARMSON, A.; KAMAU, S.W.; GRIMM, F.; REYNOLDSON, J.A.; BEST, W.M.; MacDONALD, L.M.; THOMPSON, R.C.A. A comparison of effects of a benzimidazole and the dinitronitriles against *Leishmania infantum*. **Acta. Trop.**, v.73, p.303-311, 1999.

ASHFORD, R. W.; DESJEAUX, P.; DERAADT, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. **Parasitol.Today**, v. 8, p.104-105, 1992.

ASHFORD, R. W. The leishmanises as model zoonoses. **Ann.Trop.Med.Parasitol.**, v.9, n.7, p.693-701, 1997.

AZEVEDO, I. B. S.; SAMPAIO, R. F.; MONTES, J. C.; CONTRERAS, R. L. L. Tratamento das escaras de decúbito com própolis. **Rev. Bras. Enf.**, v.39, n.2/3, p.33, 1986.

BADARÓ, R.; JOHNSON, JR. W. D. The role of interferon-gama in the treatment of visceral and difuse cutaneous leishmaniasis. **J. Infec. Dis.**, v.167, suppl. 1, p.13-17, 1993.

BARATA, L. E. S.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J. D.; PAINE, A.; CROFT, S. L. Anti-leishmanial activity of neoglicans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v.55, p.589-595, 2000.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; ALMEIDA, R.; DE JESUS, A. R.; GRIMALDI JR. G.; NETTO, E. M.; SANTOS, I.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.47, p.587-592, 1992.

BARRAL, A.; GUERREIRO, J.; BOMFIM, G.; CORREIA, D.; BARRAL NETTO, M.; CARVALHO, E. M. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous leishmaniasis infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.53, p.256-59, 1995.

BARRAL-NETTO, M.; MACHADO, P.; BARRAL, A. Human cutaneous leishmaniasis: recent advances in physiopathology and treatment. **Europ. J. Dermatol.**, v.5, p.104-113, 1995.

BASTIDE, M.; DOUCET-JABOEUF, M.; GUILLEMAIN, J.; PELEGRIN, A.; TETAU, M. Mise en évidence du principe de similitude par action de doses Infinitésimales de Thymus et d'Hormone Thymique chez la souris. **Cah. Biothe.**, v. 88, p.45-47, 1985.

BECKER, I.; VOLKOW, P.; VELASCO-CASTREJON, O.; SALAIZA-SUAZO, N.; BERZUNZA-CRUZ, M.; DOMINGUEZ, J. S.; MORALES-VARGAS, A.; RUIZ-RENIGIO, A.; PEREZ-MONTFORT, R. The efficacy of pentamidine combined with allopurinol and immunotherapy for the treatment of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Parasitol. Res.**, v. 85, n.3, p.165-170, 1999.

BERMAN, J. D.; WADDEL, D.; HANSON, D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrob. Ag. Chem.**, v.27, p.916-920, 1985.

BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V.; BEST, J. M. Sodium stibogluconate (pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid B-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochem. Pharmacol.**, v.36, p.197-201, 1987a.

BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V. *In vitro* antileishmanial activity of inhibitors of steroid biosynthesis and combinations of antileishmanial agents. **J. Parasitol.**, v.73, p.671-673, 1987b.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for Leishmaniasis: Biochemical mechanism, Clinical efficacy and future strategies. **Rev. Infect. Dis.**, v.10, p.560-585, 1988.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect. Dis.**, v.24, p.684-703, 1997.

BERMAN, J. D.; BADARO, R.; THAKUR, C. P.; WASUNNA, K. M.; BEHBEHANI, K.; DAVIDSON, R.; KUZOL, F.; PANG, L.; WEERASURIYA, K.; BRYCESON, A. D. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in Endemic developing countries. **WHO**, v.76, n.1, p.25-32, 1998.

BILDET, J.; AUBIN, M.; BARONNET, S.; BERJON, J.J.; GOMEZ, H.; MANLHIOT, J.L. Resistence de la cellule hépatique du rat après une intoxication infinitesimale au tetrachlorure de carbone. **Ann. Homeopath. Fr.**, v.23, p.79-90, 1981.

BITTENCOURT, A. L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopatological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.85, p.51-6, 1991.

BOLSHAKOVA, V. F. Employment of propolis in dermatology. In: INTERNATIONAL BEEKEEPING JUB. CONGRESS., 20., 1975, Apimondia. p.134-136.

BRATTER, C.; TREGEL, M.; LIEBENTHAL, C.; VOLK, H. D. Prophylatic effectiveness of propolis for immunostimulation: a clinical pilot study. **Forsch. Komplementarmed.** v.6, n.5, p.256-260, 1999.

BRENER, Z. Therapeutic activity an criterion of cure on mice experimentalit infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.4, p. 389-396, 1962.

BRYCESON, A. Therapy in man. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. v.2, p.858-875.

BURDOCK, G. A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. **Food Chem. Toxicol.**, v. 36, p. 347-363, 1998.

BURNNEY, M. H. Contact dermatitis in beekeepers due to propolis (bee glue). **Br. J. Derm.**, v.80, p.17-23, 1968.

CAIRO, N. **Guia de medicina homeopática**. 21.ed. São Paulo: Livraria Teixeira, 1984. 1058p.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 6, p. 93-100, 1964.

CAMPOS, R. O. P.; PAULINO, N.; SILVA-CÉLIO, H. M. D.; SCREMIN, A.; CALIXTO-JOÃO, B. Anti-hyperalgesic effect of an ethanolic extract of propolis in mice and rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.50, p.1187-1193, 1998.

CARVALHO, E. M.; JOHNSON, W. D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P. D.; COSTA, J. M. L.; REED, S.; ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J. Immunol.**, v.135, p.4144-4148, 1985.

CASTÉS, M.; AGNELLI, A.; VERDE, O.; RONDÓN, A. J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous Leishmaniasis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.27, p.176-86, 1983.

CASTÉS, M.; AGNELLI, A.; RONDÓN, A. J. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v.57, p.279-86, 1984.

CENCI, E.; ROMANI, L.; MENCACCI, A.; SPACCAPELO, R.; SCHIABBELLA, E.; PACCETTI, P.; BISTONI, F. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit oxide-dependent macrophage Killing of *Candida albicans*. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, p. 1034-1038, 1993.

CHANCE, M. L. New development in the chemotherapy of leishmaniasis. **Anna. Trop. Med. Parasitol.**, v.89, suppl. 1, p.37-43, 1995.

CHER, D. J.; MOSMANN, T. R. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. **J. Immunol.**, v.136, p. 3688-3692, 1987.

CHULAY, L. D.; FLECKENSTEIN, L.; SMITH, A. H. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.82, p.69-72, 1988.

COFFMAN, R. L.; SYMOUR, B.; LEBMAN, D.; HIRAKI, D.; CHRISTIANSEN, J.; SHRADER, B.; CHERWFINSKI, H.; SVELKOU, H.; FIKKENMAN, F.; BOND, M.; MOSMANN, T. R. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunol. Rev.**, v.102, p. 5-28, 1988.

COSTA, J. M. L.; VALE, K. C.; CECÍLIO, I. N.; OSAKI, N. K.; NETTO, E. M.; TADA, M. S.; FRANÇA, F.; BARRETO, M. C.; MARSDEN, P. D. Aspectos psicossociais e estigmatizantes de leishmaniose cutâneo-mucosa. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.20, p.77-82, 1987.

COTTE, J.; BERNARD, A. Effect de dilutions hahnemanniennes de Mercurius corrosivus sur la multiplicatin en culture de fibroblastes intoxiqués par le chlorure mercurique echloruremercurique. In: BOIRON, J., ABECASSIS, J., BELON, P. **Aspects de la recherche en homéopath.** Lyon: Boiron, 1983. v.1, p.51-59.

DANILOV, L. N. **Tratamento com própolis de algumas enfermidades da pele.** s.l.p.: Apicenter do Brasil, 1988. p.1-29. Apostila.

DE CASTRO, S.L.; HIGASHI, K.O. Effect of different formulations on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Ethonopharmacol.**, v.46, p.55-58, 1995.

DE PAULA, C. R. D. **Estudo comparativo entre isotionato de pentamidina, administrada em três doses, com o esquema usual de metil-meglumina para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana.** f. 116, Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 1999.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*- A mini-review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.89, p.463-69, 1994.

DESJEAUX, P. Human leishmaniasis: Epidemiology and public health aspects. **World Health Stat. Q.**, v. 45, p.267-275, 1992.

DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylact activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. *Vaccine*, v.10, n.12, p.817-823, 1992.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reative oxygen intermediates from mouse peitoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent. *J. Immunol.*, v.141, p.2407-2412, 1988.

DRAPIER, J. C.; WIETZERBIN, J.; HIBBS-JR, J. B. Interferon-gama and tumor necrosis factor induce the L-arginine dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.*, v. 18, p.1587-1592, 1988.

FARMACÓPEIA homeopática brasileira. 2. ed. São Paulo: ed. 1997. p.

FLOCH, H. *Leishmania guyanensis* sp. Agente de la leishmaniose tegumentaire des Guyanas et de l'Amérique Centrale. *Bull. Soc. Panthol. Exp.*, v.47, p.784-787, 1954.

FRANCO, M. A. **Determinação de antimoniais (SbIII e Sb V) em fármacos.** 1992. f. 98, Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 1992.

FONSECA, S. G. **Envolvimento do sistema óxido nítrico na resistência à infecção experimental por *Leishmania major* mediada pelo TNF-alfa.** 1997. f. 120, Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade Estadual de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.

FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; ROBLLOT, F.; CAVÉ, A. Antileishmanial Activity of a Tetralone Isolated from *Ampelocera edentula*, a Bolivian Plant Used as a Treatment for Cutaneous Leishmaniasis. *Plant. Med.*, v.60, p.8-12, 1994.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HEINY, S.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen-oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur. J. Immunol.*, v.22, p.2501-2506, 1992.

GERALDINO, J.M. Ensaios clínicos com o bioterápico *Trypanosoma cruzi* D30 nas formas crônicas e sintomáticas da doença de Chagas. *Pesq. Homeop.*, v.9, n.1, p.40-50, 1986.

GOTO, H.; NICODEMO, E. L.; CORBETT, C. E. P. Interference of Glucantime on supressor effect of plasm on PHA- induced lymphocyte blast transformation in active Visceral Leishmaniasis. In: ANNUAL MEETING ON BASIC RESEARCH IN CHAGAS DISEASE, 15., 1988, Caxambú. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.83, suppl. 1, p.118, 1988.

GRATZ, N.; JANY, W. C. What role for insecticides in vector control programs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.50, p.11-20, 1994.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLODOWS, K.; SKEPPER, P. L.; WESHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [N¹⁵] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, n.126, p.83-90, 1982.

GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS JR, J. B.; NACY, C. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an-L-arginine-dependent Killing mechanism. **J. Immunol.**, v.144, p.278-283, 1990.

GRIMALD, G.; TESH, R.B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.41, p.687-725, 1989.

GROGL, M.; SCHUSTER, B. G.; ELLIS, W. Y.; BERMAN, J. D. Successful topical treatment cutaneous leishmaniasis with a combination of paramomycin (aminosidine) and gentamicin. **J. Parasitol.**, v.85, n.2, p.354-359, 1999.

GUPTA, N.; NOYAL, N.; RASTOGI, A. K. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. **Trends Parasitol.**, v.17, n.3, p. 150-153, 2001.

GUTIERREZ, Y.; SALINAS, G. H.; PALMA, G.; VALDERRAMA, L. B.; SANTRICH, C. V.; SARAVIA, N. G. Correlation between histopathology, imune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.43, p.281-89, 1991.

HAMANN, E. M. Ensaio terapêutico com quatro dosagens de antimonial no tratamento de leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 1989. f. 149, Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 1989.

HARKER, P. R. **Interação de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* com macrófagos da Linhagem U-937.** f. 67, Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 1992.

HAUSEN, B.M.; WOLLENWEBER, E.; SENFF, H.; POST, B. Propolis allergy I. Origin, properties, usage and literature review. **Contact Dermatitis**, v.17, p.163-170, 1987a.

HAUSEN, B.M.; WOLLENWEBER, E.; SENFF, H.; POST, B. Propolis allergy II. The sensitizing properties of 1,1 dimethylallyl caffeic acid ester. **Contact Dermatitis**, v.17, p.171-177, 1987b.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; MUTHA, S. S.; LOCKSLEY, R. M. production of interferon-gama, interleukin-2, interleukin-4, and interleukin-10 by CD4⁺ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.7011-7015, 1991.

HEINZEL, F. P. interleukin 12 and the regulation of CD4⁺ T-cell subset responses during murine leishmaniasis. **Parasitol. Today**, v.10, p.190-92, 1994.

HEPBURN, N. C. Trombocytopenia complicating sodium stibogluconate therapy for cutaneous leishmaniasis. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.87, p.691, 1993.

HEPBURN, N. C.; TIDMAN, M. J.; JUNTER, J. A. A. Aminosidine (paromomycin) versus sodium stibogluconate for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.88, p.700-703, 1994.

HERWALDT, B. L.; BERMAN, J. D. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (pentostan) and review of pertinent clinical studies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.46, p.296-306, 1992.

HIGASHI, K.O.; DE CASTRO, S.L. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have no impact on its interaction with host cells. **J. Ethnopharmacol.**, v.43, p.149-155, 1994.

HOLLANDS, I. Estudio de la toxicidad subcrónica del Propóleos Cubano. **Invest. Cuban Propól.**, v. 30, p.94-100, 1988.

HOWARD, M. K.; SAVERES, G.; MILES, M. A. *Leishmania donovani* metacyclic promastigots: transformation in vitro, lectin agglutination, complement resistance and infectivity. **Exp. Parasitol.**, v.64, p.147-56, 1987.

IYENGAR, R.; STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.84, p.6369-6373, 1987.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; LAATSCH, H.; CROFT, S.L. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Trop.**, v.77, p.307-14, 2000.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F. In vitro Leishmanicidal Activity of Naturally Occurring Chalcones. **Phytother. Res.**, v.15, p.148-152, 2001.

KHABNADIDEH, S.; TAN, C. L.; CROFT, S. L.; KENDRICK, H.; YARDELEY, V.; GILBERT, I. H. Squalamine Analogues as Potential Anti-Trypanosomal and Anti-Leishmanial Compounds. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.10, p.1237-1239, 2000.

KWEIDER, M.; LEMETRE, J.L.; DARCY, F.; KUSNIERS, J.P.; CAPRON, A.; SANTORO, F. Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65.000-Dalton surface antigen. **J. Immunol.**, v.138, p.299-305, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniosis in Latin-America. **Nature**, v. 273, p. 595-600, 1978.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to amazonian Brazil. **Ciênc. Cult.**, v.44, n.2/3, p.94-106, 1992.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 2.ed. Sarvier, 1995. 839p.

LEWIS, D. H. Infection of tissue culture cells of low phagocytic ability by *Leishmania mexicana mexicana*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.68, p.327-36, 1974.

LIANOS-CUENTAS, E. A.; MARSDEN, P. D.; CUBA, C. C.; BARRETO, A. C.; CAMPOS, M. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. **Lancet II**, p.295, 1984.

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating Killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J. Immunol.**, v.145, p.4306-4310, 1990.

LIEW, F. Y.; SEVERN, A.; MILLOTT, S.; SCHIMIDT, J.; SALTER, M.; MONCADA, S. A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v.21, p.2489-2494, 1991.

LOCKSLEY, R. M.; LOUIS, J. A. Immunology of leishmaniasis. **Curr. Opin. Immunol.**, v.4, p.413-418, 1992.

LOHOFF, M.; GESSNER, A.; BOGDAN, C.; ROLLINHOFF, M. The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v.115, p.191-202, 1998.

LOPES, R.A.; RIBEIRO, R.D.; NASI, A.M.T.T. Parasitismo Tissular e Histometria em órgãos de camundongos tratados com Bioterápico D 30 e desafiados com cepas do *T. cruzi*, morfologicamente distintas. **Pesq. Homeop.**, v.9, n.1, p.24-25, 1994.

LOUIS, J.; HIMMERLRICH, H.; LAUNOIS, P. Mechanism underlying Th2 cell maturation and susceptibility to *Leishmania major* in Balb/c mice. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIOSIS, 2., 2001, Grécia. **Abstract Book...**p.20-24.

LYNCH, N. R.; MALAVE, C.; INFANTE, R. B.; MODLIN, R. L.; CONVIT, J. In situ detection of amastigotes in American cutaneous leishmaniasis using monoclonal antibodies. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p.6-9, 1986.

MACHACKOVÁ, J. The incidence of allergy to propolis in 605 consecutive patients patch tested in Prague. **Contact Dermatitis**, v.18, p.210-212, 1988.

MACHADO, G.M.C.; DE CASTRO, S.L.; AQUINO NETO, F.R.; PEREIRA, A.S.; PRZYTYK, E.; LEON, L.L. Studies on propolis activity against promastigotes of three *Leishmania* species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, suppl. 2, p.309, 2000.

MAGALHÃES, A. V.; MORAES, M. A. P.; RAICK, A. N.; LIANOS-CUENTAS, A.; COSTA, J. M. L.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por

Leishmania braziliensis braziliensis. Classificação histopatológica. **Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo**, v.28, p.421-30; 1986.

MAGALHÃES, H. M. T. V.; COSTA, J. M. L.; COSTA, R. M.; FRANÇA, F.; VALE, K. C.; MARSDEN, P.; MAGALHÃES, A. V. Mudança do componente cognitivo da atitude de uma população de região endêmica do sul da Bahia diante da leishmaniose tegumentar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.23, p.49-52, 1990.

MAGILL, A. J.; GROGL, M.; GASSER Jr, R. A.; SUN, W.; OSTER, C.N. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. **N. Engl. J. Med.**, v.328 n.19, p.383-7, 1993.

MAGUIB, R. The egyptians knew bilharziasis 5000 years ago. **Kasr-el-aini J. Surg.**, v.4, p.1-4, 1963.

MAKSIMOVA-TODOROVA, V.; MANOLOVA, N.; GEGOVA, G. Antiviral action of some fractions isolated from propolis. **Acta. Microbiol. Buta**, v.17, p.79-84, 1985.

MANDADO, S. Observaciones ultra estructurales en los hepatocitos de ratones tratados com Propolisina y de sus controles alcohólicos y acuosos. **Invest. Cubanas Própolis**, v.30, p.221-230, 1988.

MARSDEN, P. D. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XIV. Leishmaniasis. **Rev. Infect. Dis.**, v.6, p.736-744, 1984.

MARSDEN, P.D. Pentavalent antimonials: old drug for new diseases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.18, p.187-98, 1985a.

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis ("espundia", ESCOMEL, 1911). **Trans.Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.80, p.859-76, 1985b.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.80, p.859-876, 1986.

MARSDEN, P. D.; BADARÓ, R.; NETTO, E. M.; CASLER, J. D. Spontaneous clinical resolution without specific treatment in mucosal leishmaniasis. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.85, p.221, 1991.

MCCARTHY, A. E.; KEYSTONE, J. S.; KAIN, K. C. Pancreatitis occurring during therapy with stibogluconate: two case reports. **Clin. Infect. Dis.**, v.17, p. 952-953, 1993.

MERCHÁN-HAMANN, E.; ROSA, A. C. O.; MARSDEN, P. D. Ensaio terapêutico de uso de Sulfonas no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 1988, Manaus, **Resumos do Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical...**p.56.

MENDONÇA, C. C.; COUTINHO, S. G.; AMENDOEIRA, R. R.; MARZOCHI, M. C. A.; PIRMEZ, C. Human american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative response and influence of therapy. **Clin. Exp. Immunol.**, v.64, p.269-276, 1986.

MITAMURA, T.; MATSUNO, T.; SAKAMOTO, S.; MALMURA, M.; KUDO, H.; SUZUKI, S.; KUWA, K.; YOSHIMURA, S.; SASSA, S.; NAKAYAMA, T.; NAGASAWA, H. Effects of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis on chemically induced skin tumors in mice. **Anticancer Res.**, v.16, p.2669-2672, 1996.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v.43, p.109-142, 1991.

MORAES, M. A. P.; CORREIA FILHO, D.; SANTOS, J. B. Linfadenopatias na leishmaniose tegumentar americana: considerações sobre dois casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.26, p.181-185, 1993.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIERDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Identification according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v.136, p.2348-2355, 1986.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J.J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting a Colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol. Res.**, v.86, p.999-1002, 2000.

MURRAY, H. W. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent Killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **J. Immunol.**, v.129, p.351-57, 1982.

NAPIER, L. E. The pentavalent compounds of Antimony in the treatment of Kala-Azar. Na Analysis of the results of the treatment in the first 61 cases. **Ind. J. Med. Res.**, v.15, p.181-186, 1927.

NASI, A.M.T.T.; RIBEIRO, R.D.; LOPES, R.A. Emploi de biothérapiques dans le traitement de souris infectées par *Trypanosoma cruzi* résultats préliminaires. **Ann. Homeopath. Fr.**, v.3, p.53-64, 1982.

NASI, A.M.T.T.; RIBEIRO, R.D.; LOPES, R.A. Ativação de macrófagos de camundongos com o emprego de Bioterápico. **Pesq. Homeop.**, v.9, n.1, p.3-4, 1994.

OLLIARO, P. L.; BRYCESON, A. D. M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. **Parasitol. Today**, v.9, p.323-328, 1993.

OULLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. Mechanisms of drug-resistance in leishmania. **Parasitol. Today**, Oxford, v.9, p.323-328, 1993.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, p.664-666, 1988.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Preparation of eater and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparation. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.62, p.2230-2232, 1998.

PEARSON, R. D.; HARCUS, J. L.; ROBERTS, D.; DONOWITS, G. R. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. **J. Immunol.**, v.131, p.1994-99, 1983a.

PEARSON, D. R.; WHEELER, A. D.; HARRISON, H. L.; KAY, D. The immunobiology of leishmaniasis. **Rev. Infect. Dis.**, v.5, p.907-927, 1983b.

PEREA, W. A.; ANCELLE, T.; MOREN, A.; NAGELKERKE, M.; SONDORP, E. Visceral Leishmaniasis in Southern Sudan. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.85, n.1, p.48-53, 1991.

PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; MYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEIÇÃO-SLIVA, F.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns in American cutaneous leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, v.91, p.1350-1395, 1993.

POZETTI, G. L. Evolução da Pesquisa Homeopática no Brasil. **Pesq. Homeop.**, v.6, 29-36, 1988.

POZETTI, G. L. **Notas de Farmácia Homeopática**. São Paulo: Instituto Homeopático François Lamasson., 1990. 91p.

RAMOS, D. C. C.; CARDOSO, A. G. T.; SPENCER, P. J.; NASCIMENTO, N.; MESTRINER, C. L. B.; COTRIM, P.C. Growth inhibition of *Leishmania* spp. by irradiated snake venoms. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, suppl. 2, p.311-312, 2000.

RÉE, G. H. Gaps in our armoury against parasites of man. **Parasitology**, v.90, p.617-620, 1985.

REZAI, H. R.; BEHBEHANI, A. B.; GETTNER, S.; ARDEHALI, S. Effect of Levamisole on the course of experimental leishmaniasis in guinea-pigs and mice: Haematological and Immunological findings. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.82, p.243-249, 1988.

RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; CARMO, T. A.; GARCIA, T. A. R.; ALBUQUERQUE, S.; TOLDO, P. R. A. Estudo comparativo dos índices de cura de camundongos tratados com quimioterápicos e Trypanosominum TC D30. **Pesq. Homeop.**, v.9, n.1, p.19-21, 1987.

RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; NASI, A. M. T. T.; GARCIA, T. A. R.; CARRARO, A. A. Efeitos de Fatores humorais do Camundongo Tratado com Trypanosominum TC D30, em testes de Lise do *Trypanosoma cruzi* "in vitro". **Pesq. Homeop.**, v.4, p.10-14, 1989.

RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; NASI, A. M. T. T. Comportamento de cepas do *Trypanosoma cruzi*, inoculadas através das vias intraperitoneal e subcutânea, em camundongos tratados com Bioterápico na D30. **Pesq. Homeop.**, v.9, n.1, p.31-34, 1994.

RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A.; NASI, A. M. T. T. Estudo da participação da Imunidade Humoral e Celular na Doença de Chagas Experimental em Camundongos Tratados com Bioterápico D30. **Pesq. Homeop.**, v.9, n.1, p.9-10, 1994.

ROMERO, G. A. S.; LESSA, H. A.; ORGE, M. G.; MACEDO, V. O.; MARSDEN, P. D. Tratamento da leishmaniose mucosa com sulfato de aminosidine: resultado de dois anos de acompanhamento. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.**, v.31, n.6, p.511-516, 1998.

SACKS, D. L. Minireview. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Exp. Parasitol.**, v.69, p.100-103, 1989.

SAMPAIO, R. N. R.; SOARES, S. K. P.; ROSA, A. C.; NETTO, E. M.; MAGALHÃES, E. V.; MARSDEN, P. D. Tratamento com pentamidina de seis casos de forma mucosa de leishmaniose tegumentar. **Ann. Bras. Dermatol.**, v.63, p.439-442, 1988.

SAMPAIO, R. N. R.; MÉRCHAN, E. M.; VEXENAT, A.; TRISTÃO, R. J.; MARSDEN, P.D. Combined antimonial allopurinol therapy in mucosal leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.85, p.373-374, 1990.

SAMPAIO, S. A. P.; CASTRO, R. M.; DILLON, N. L.; MARTINS, J. E. C. Treatment of cutaneous leishmaniasis with amphotericin B. A report of 70 cases. **Int. J. Dermatol.**, v.10, p.179-181, 1991.

SANTOS, E. Action hypoglycémiant de l'alloxane 6 CH sur les rats diabétiques alloxaniques. **Homeopathie**, v.3, p.38-39, 1990.

SANTOS, E. C. T.; PAIVA, S. R.; KAPLAN, M. A. C.; BERGMANN, B. R. Atividade anti-leishmania de *Plumbago scandens* (Plumbaginaceae). **Rev. Bras. Farm.**, v.78, n.1, p.13-15, 1997.

SCHELLER, S.; STOJKO, A.; SZWARNOWIECHA, I.; TUSTANOWSKI, J.; OBUSZKO, Z. Biological properties and clinical application of propolis VI. **Arzneim-Forsch. Drug Res.**, v.27, p. 2138-2140, 1977a.

SCHELLER, S.; SZAFLARSKI, J.; TUSTANOWSKI, J.; NOLEWAJKA, E.; STOJKO, A. Biological properties and clinical application of propolis I. **Arzneim-Forsch. Drug Res.**, v.27, p.889-890, 1977b.

SCHMALLE, H. W.; JARCHOW, O. H.; HAUSEN, B. M.; SCHULS, K. H. Aspects of relationships between chemical structure and sensitizing potency of flavonoids and related compounds. In: ____ **Plant Flavonoids in Biology and Medicine**. Nova York: Academic Press. 1986. p.387-390.

SCORZA, J. V.; OVIEDO, M.; LOBO, H.; MARQUEZ, J. C. *Leishmania braziliensis* ssp. In the nasal mucosa of guinea pigs inoculated in the tarsi. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.87, p.81-86, 1992.

SCOTT, P.; FARRELL, J. P. Experimental cutaneous leishmaniasis: induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. In: immunology of Intracellular Parasitism. **Chem. Immunol.**, v.70, p.60-80, 1998.

SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 471-478, 1994.

SOUZA, M.L. Controlled trials in homeopathy individualization x bias: In: **Congress of the Liga Mmedicorium Homoeopahica Internationalis**. v.54, p.47, 1999.

STECK, E. A. Chemotherapy of the Leishmaniases. In: STECK, E. A. The Chemotherapy of protozoan diseases, Ist edition, **Walter reed Army institute of Research**, v.2, p.7.1-7.90, 1972.

STENGER, S.; THURING, H.; ROLLINGH, O. F. F. M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, v.180, p.783-793, 1996a.

STENGER, S.; DONHAUSER, N.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.**, v.183, p.1501-1514, 1996b.

STEVENS, J. R.; GILSON, W. The molecular evolution of Trypanosomes. **Parasitol. Today**, v.15(11), p.432-37, 1999.

TALHARI, S.; SARDINHA, J. C.; SCHETTINI, A. P. M. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. Resultados preliminares com a pentamidina. **An. Bras. Dermatol.**, v.6, p.361-364, 1985.

THORWALD, J. **Macht und Geheimnis der fruhen Artze**. Munchen: Droemersch Verlagsanstalt Th. Knaur Nachf, 1962.

TITUS, R. G.; SHERRY, B.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental cutaneous leishsmaniasis. **J. Exp. Med.**, v.170, p.2097-2104, 1989.

TODOROV, V. E. S.; DRENOVSKI, S. T.; VASILEV, V. Pharmacodynamics of propolis. **Farmatsiya**, v.18, n.5, p.23-31, 1968.

TORRES, D.; HOLLANDS, I.; PALACIOS, E. Efeito de un extracto alcohólico de prpóleos sobre el crecimiento de *Giardia lamblia* in vitro. **Rev. Club. Cienc. Vet.**, v.21, n.1, p.15-20, 1990.

TUCANDUVA NETO, R. R. C. M. Proteção conferida a um organismo contra os efeitos da atropina por doses infinitesimais dessa mesma droga. **Rev. Homeop.**, v.169, p.31-38, 1986.

VANHAELEN, M. Propolis II identification par chomatographies haute-performance (liquide, gaz-liquide et sur couches minces) des constituants. Bioautographie des chromato – grammes des composés antibacteriens. **J. Pharm.**, v.34, n.6, p.317-328, 1979.

VELA, J. S. A. **Fatores de risco para a transmissão de leishmaniose cutânea em crianças de 0 a 5 anos em uma área endêmica de *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 122f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 1996.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de Leishmania (nota preliminar). **Brazil-Medico.**, v. 25, p. 411, 1911.

VIEIRA, L. D.; GOLDSCHMIDT, M.; NASHLEANAS, M.; PFEFFER, K.; MAK, T.; SCOTT, P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. **J. Immunol.**, v.2, p.827-835, 1996.

VISCHNIAC, I. Influence des doses infinitésimales de Plomb sur l'évolution de l'intoxication au Plomb chez l'animal. **Homoeopath. Fr.**, v.53, p.21-33, 1965.

WEIGLE, K. A.; DÁVALOS. M.; HEREDIA. P.; MOLINEROS. R.; SARAIVA. N. G.; D'ALESSANDRO, A. Diagnosis of cutaneuos and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.36, p.489-96, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Las Leishmaniasis: Informe de un comité de expertos de la OMS, 1984. p.701 (Serie de Informe Técnicos).

WURMSER, L. Influence des doses infinitesimales sur la cinétique des éliminations. **Doc. L. H. F.**, v.39, p.13, 1957.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *leishmania* parasites. *Rev. Microbiol.*, v.48, p.449-70, 1994.

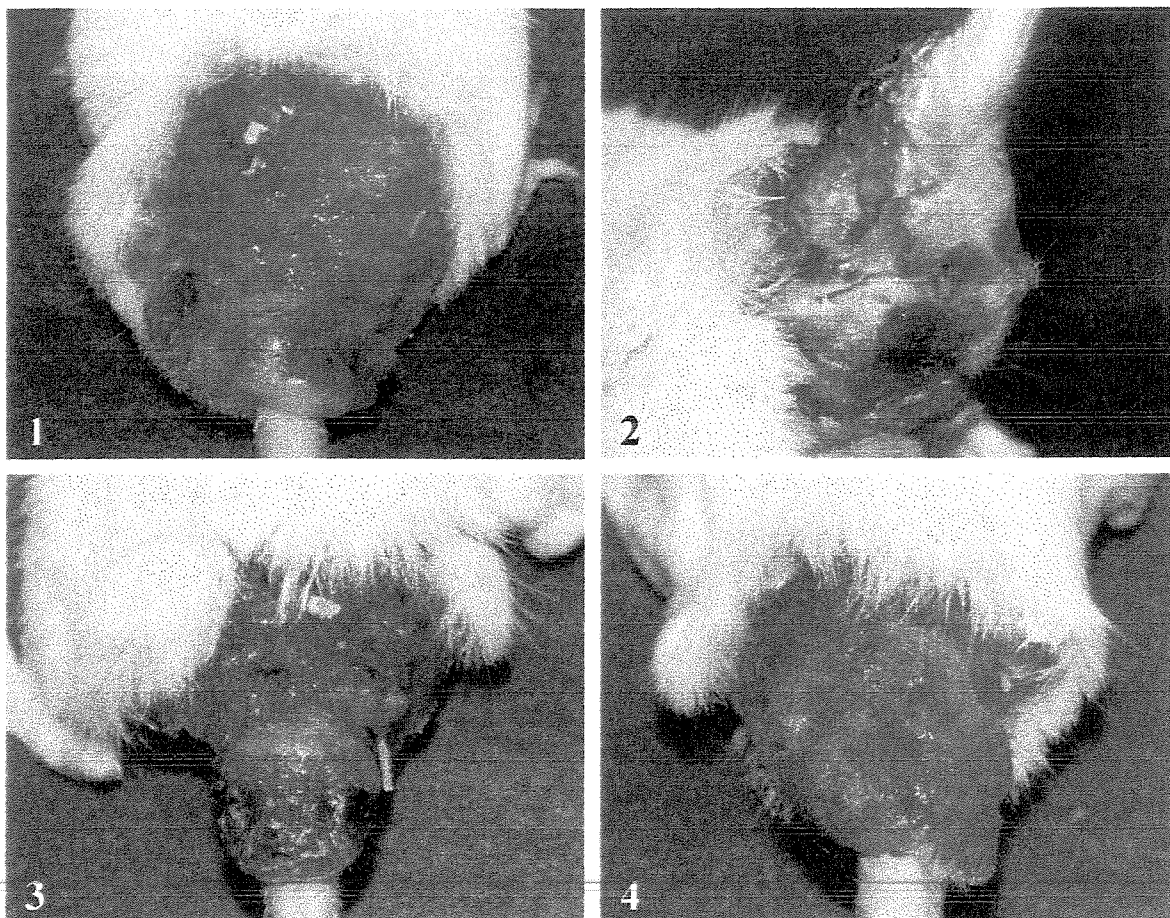


Figura A: Imagens fotográficas das lesões causadas por *L. (V.) braziliensis* em camundongos *Mus Musculus*, após 90 dias do tratamento com cloreto de sódio 0,9%. 1 – Grupo controle negativo tratado por via oral. 2 – Grupo controle negativo tratado por via tópica. 3 - Grupo controle negativo tratado por via oral e tópica, concomitantemente. 4 - Grupo controle negativo tratado por via intraperitoneal. (Fotos gentilmente fotografadas por Fabrício Villela .Mamede)

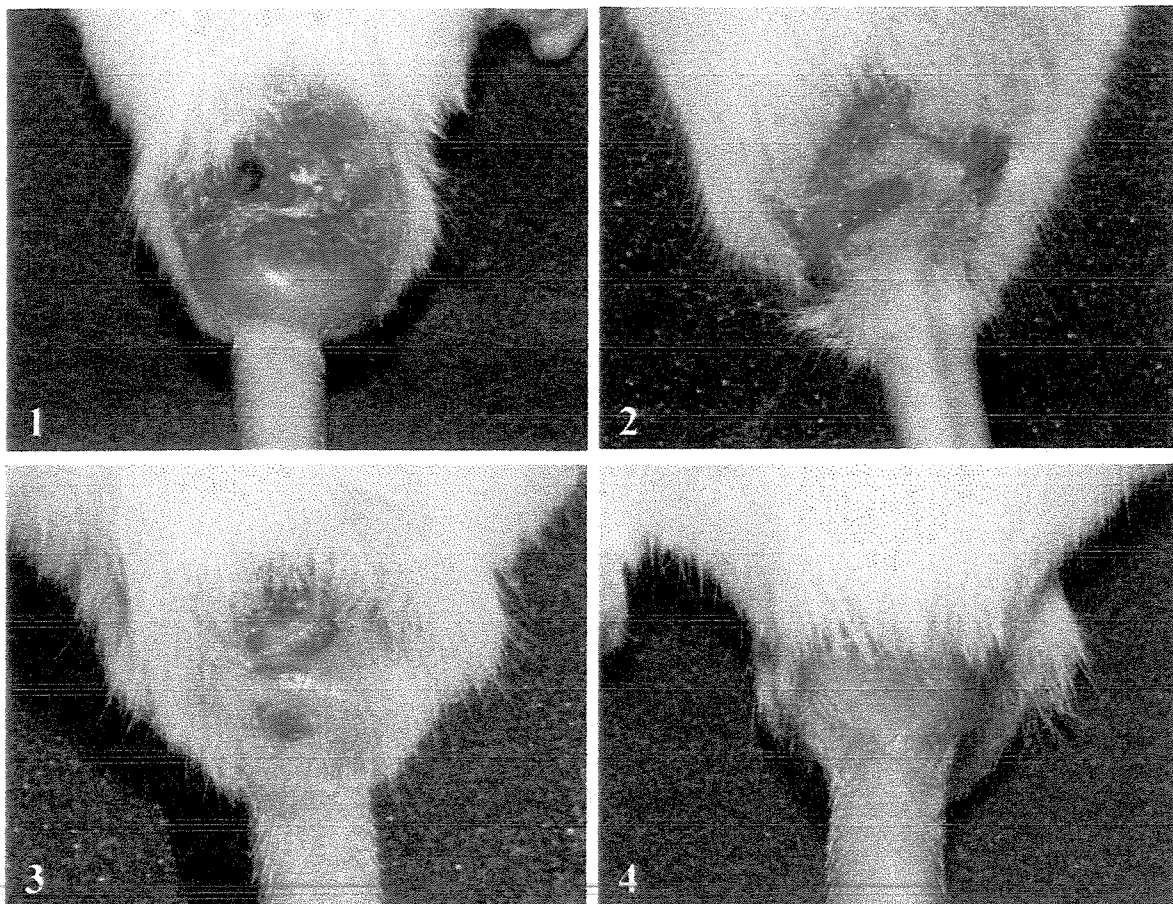


Figura B: Imagens fotográficas das lesões determinadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em camundongos *Mus Musculus*, após 90 dias de infecção e submetidos ao tratamento com a própolis. 1 – Grupo tratado por via oral. 2 – Grupo tratado por via tópica. 3 e 4 – Grupo tratado por via oral e tópica, concomitantemente. Observa-se no grupo tratado por ambas as vias, animais que permaneceram apenas com nódulo leishmaniótico (4).

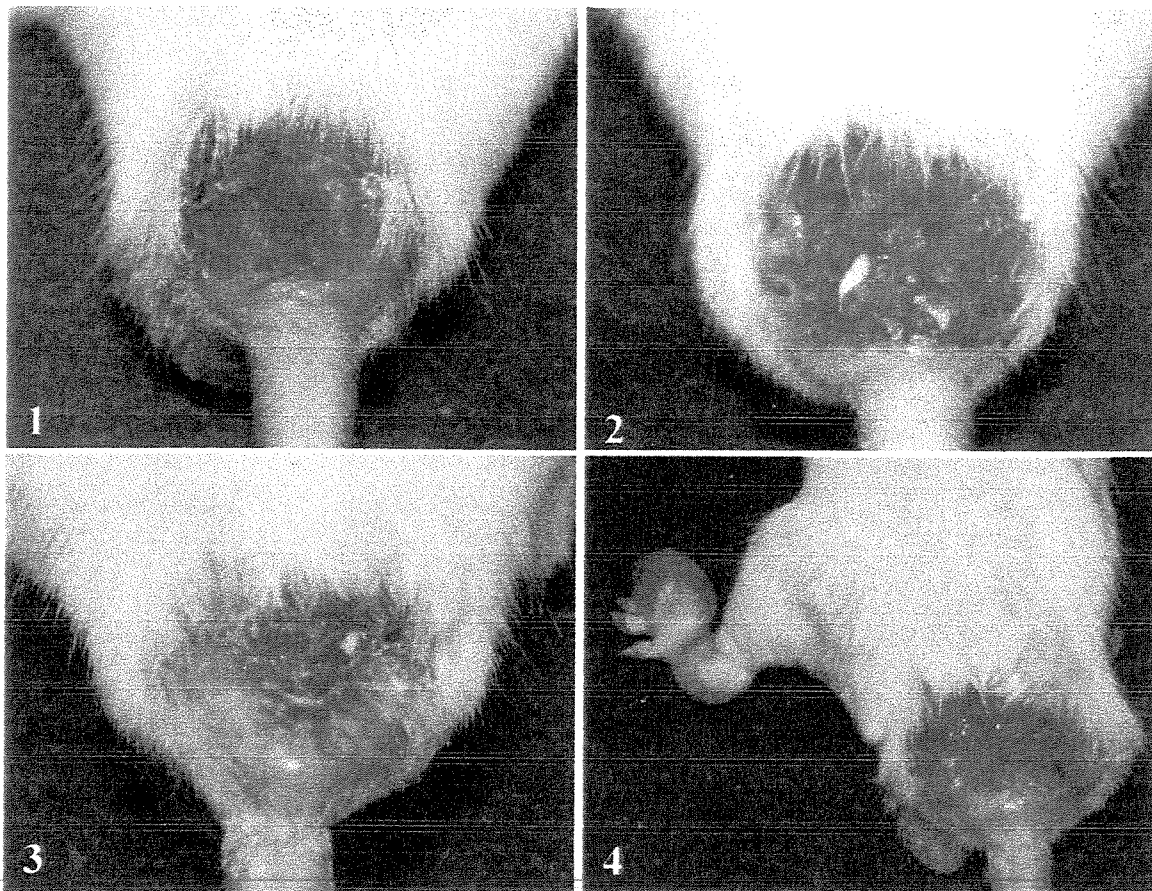


Figura C: Imagens fotográficas das lesões causadas por *L. (V.) braziliensis* em camundongos *Mus Musculus*, após 90 dias do tratamento com o bioterápico, por via oral. 1 – Grupo tratado na potência 30 CH. 2 – Grupo tratado na potência 30 DH. 3 – Grupo tratado na potência 200 CH. 4 – Grupo tratado na potência 200 DH. (Fotos gentilmente fotografadas por Fabrício Villela .Mamede)

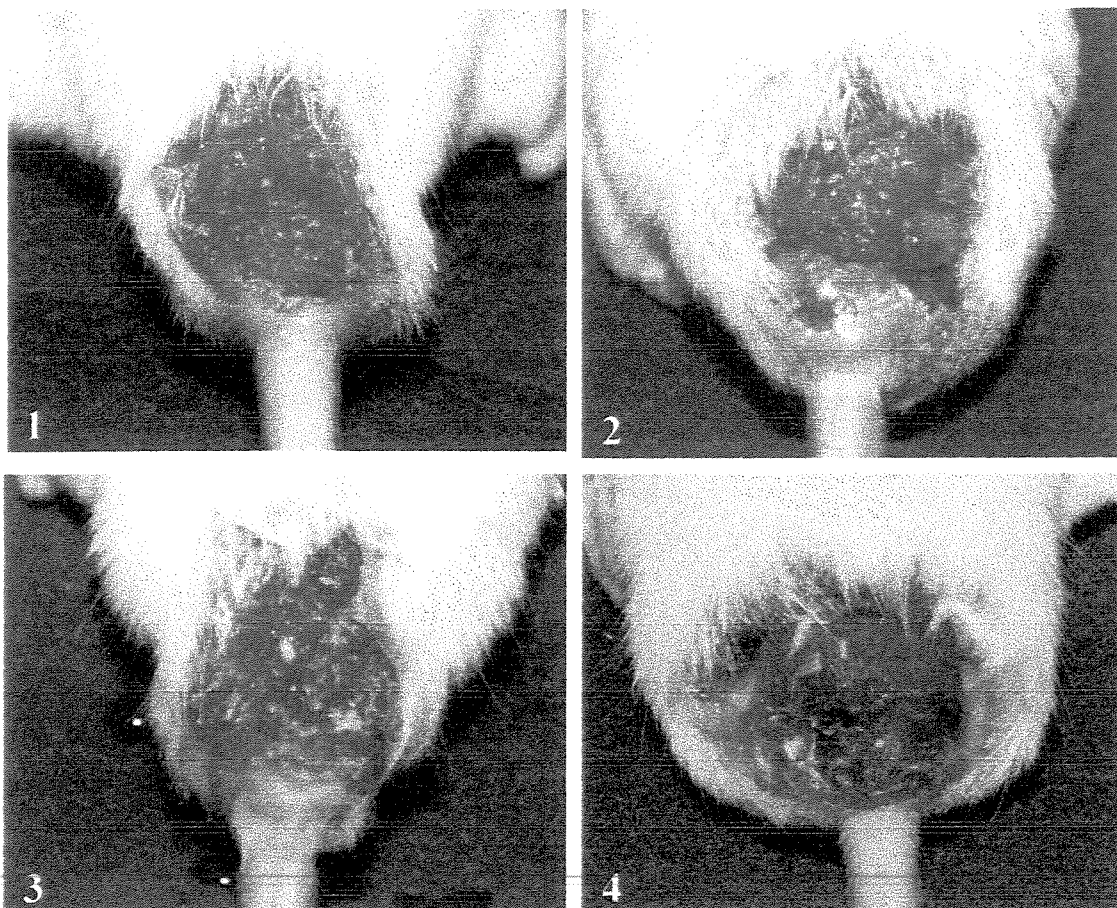


Figura D: Imagens fotográficas das lesões causadas por *L. (V.) braziliensis* em camundongos *Mus Musculus*, após 90 dias do tratamento com o bioterápico, por via intraperitoneal. 1 – Grupo tratado na potência 30 CH. 2 – Grupo tratado na potência 30 DH. 3 - Grupo tratado na potência 200 CH. 4 - Grupo tratado na potência 200 DH. (Fotos gentilmente fotografadas por Fabrício Villela .Mamede)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE