

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



DIANA COPI AYRES

**“AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIFERENTES COMPOSTOS  
NOS MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DA LEISHMANIOSE SOB  
DIFERENTES CONDIÇÕES DE OXIGÊNIO”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a):

*Diana Copi Ayres*  
*Selma Giorgio*

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
para obtenção do Título de Mestre em  
Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Giorgio

Campinas, 2007

UNIDADE BC  
Nº CHAMADA: Ay74a  
T/UNICAMP  
V. \_\_\_\_\_ EX. \_\_\_\_\_  
TOMBO BCCL 75100  
PROC 16.145.07  
C \_\_\_\_\_ D x  
PREÇO 11.00  
DATA 27.11.07  
BIB-ID 417998

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

<b>Ay74a</b>	<p>Ayres, Diana Copi Avaliação da eficácia de diferentes compostos nos modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de leishmaniose sob diferentes condições de oxigênio / Diana Copi Ayres. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientadora: Selma Giorgio. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Leishmania. 2. Hipóxia celular. 3. Oxigenação hiperbárica. 4. Quimioterapia. 5. Própolis. I/ Giorgio, Selma. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
--------------	--

**Título em inglês:** Efficacy of different compounds in leishmaniasis *in vitro* and *in vivo* models under different oxygen tensions.

**Palavras-chave em inglês:** Leishmania; Cellular hipoxia; Hyperbaric oxigenation; Chemotherapy; Propolis.

**Titulação:** Mestre em Parasitologia.

**Banca examinadora:** Selma Giorgio, Silmara Marques Allegretti, Maria Cristina Marcucci Ribeiro.

**Data da defesa:** 09/10/2007.

**Programa de Pós-Graduação:** Parasitologia.

Campinas, 9 de setembro de 2007.

**BANCA EXAMINADORA**

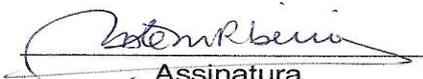
Profa. Dra. Selma Giorgio (Orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

  
Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro

  
Assinatura

Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Dedico este trabalho principalmente à minha mãe  
Cecília Copi, que sempre lutou para que eu pudesse  
estudar e me deu todo o apoio e ajuda necessários para  
que a conclusão deste sonho fosse possível.

Ao meu amor Silvio Anunciação, pelo carinho, apoio e  
compreensão nos momentos mais importantes da minha  
vida.

Aos amigos da família Nourani, que sempre me  
trataram com muito amor e carinho e são como uma  
segunda família para mim.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Selma Giorgio, pela receptividade, oportunidades concedidas, pelo exemplo de dedicação e responsabilidade e pelos valiosos ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de leishmaniose, Adriana Degrossoli, Maira Cegatti, Marcelle Colhone, Letícia Alves Pinto e Wagner W. Arrais da Silva por todo o auxílio e apoio necessários para a realização deste trabalho, além do carinho e amizade fora do ambiente de trabalho.

Aos demais colegas do Laboratório de Leishmaniose pela amizade e apoio técnico.

Aos professores, funcionários e demais colegas do Departamento de Parasitologia pela amizade e apoio técnico.

À amiga Eliana Lippe, do Departamento de Histologia, pela amizade, carinho e colaboração constantes.

À Profa Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro da UNIBAN de São Paulo, pela colaboração com o extrato etanólico de própolis e pelos géis de Propaína e papaína, além das valiosas sugestões oferecidas ao longo deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Silmara M. A., Maria Cristina M. R., Fábio T. M. Costa e Áureo T. Y. pela participação na análise prévia desta tese.

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a finalização deste trabalho.

*“O homem é uma mina rica em jóias de inestimável valor, a educação, tão somente, poderá fazê-la revelar seus tesouros...”*

*(Bahá'u'llá)*

*“A alegria que se tem em pensar e aprender faz-nos pensar e aprender ainda mais.”*

*(Aristóteles)*

## RESUMO

A *Leishmania amazonensis*, espécie transmitida principalmente na região amazônica, está associada com a presença de lesões cutâneas locais e a quimioterapia é a principal forma de controle da doença, já que vacinas efetivas ainda necessitam ser desenvolvidas. Neste contexto, tem havido uma intensa busca por compostos sintéticos ou produtos naturais com potencial para o tratamento da leishmaniose que evite a exposição de pacientes a drogas potencialmente tóxicas.

A própolis é uma resina que abelhas coletam de diferentes exsudatos de plantas. Ela apresenta muitas atividades farmacológicas e já vêm sendo utilizada para o tratamento de diversas doenças.

No presente trabalho, avaliamos a atividade leishmanicida da Anfotericina B, Glucantime, Miltefosina e dos imunostimuladores *Propionobacterium acnes* (*P. acnes*) e Polyinosinic-Polyribocytidylic acid (Poly IC) no modelo *in vitro* em condições de hipóxia (6% O<sub>2</sub>) e de Glucantime, própolis e *P. acnes* no modelo *in vivo* em condições de hiperóxia (100% O<sub>2</sub> a uma pressão de 2.5 ATA).

Primeiramente, nós descrevemos o efeito da Anfotericina B, Glucantime, Miltefosina, *P. acnes* e Poly IC em condições de normóxia e hipóxia. Em condições hipóxicas, todos os compostos foram menos efetivos em macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*.

Avaliamos também o efeito de diferentes tratamentos no modelo *in vivo* de infecção com *L. amazonensis* na região do dorso. Nossos resultados mostram a análise dos efeitos do extrato etanólico de própolis vermelha tipificada, assim como dos géis de própolis e papaína, Glucantime e *P. acnes* isolados ou juntamente com o tratamento

hiperbárico. Grupos de camundongos BALB/c tratados com Glucantime, Glucantime e HBO ou Glucantime e gel de própolis apresentaram uma diminuição significativa do tamanho das lesões, comparado com as lesões de animais do grupo controle.

Diferenças significativas entre os tecidos das lesões de camundongos infectados com *L. amazonensis* e não tratados, tratados com gel de própolis, gel de papaína, Glucantime, Glucantime e gel de própolis ou *P. acnes*, submetidos ou não a HBO foram observadas através da análise histopatológica.

Finalmente, investigamos a produção das citocinas INF- $\gamma$  e IL-4 por camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e tratados com gel de HBO, própolis, Glucantime, Glucantime e gel de própolis ou Glucantime e HBO. O único grupo de camundongos a apresentar uma produção de INF- $\gamma$  maior que o grupo controle foi o grupo tratado com Propaína. Não foi observada a produção de IL-4 nos grupos analisados.

## ABSTRACT

*L. amazonensis*, a species transmitted mainly in the Amazon region, which is associated with localized cutaneous lesions and chemotherapy remains the mainstay for the control of leishmaniasis, as effective vaccines have yet to be developed. In this context, there is an intense search for potential new synthetic compounds and natural products for the treatment of leishmaniasis that avoids exposure to potentially toxic drugs.

Propolis is a resinous substance that honey bees collect from different plant exsudates. It possesses versatile valuable pharmacological activities and has, to date, been taken in internal and external dosage forms for the treatments of various diseases. In this work we evaluated the leishmanicidal activity of Amphotericin-B, Glucantime, Miltefosine and the immunostimulatory *Propionobacterium acnes* (*P. acnes*) e Polyinosinic-Polyribocytidylic acid (Poly IC) *in vitro* under hypoxic (6% O<sub>2</sub>) and of Glucantime, propolis and *P. Acnes in vivo* under hyperoxic conditions (100% O<sub>2</sub> at a pressure of 2.5 ATA).

First, we describe the effect of Amphotericin-B, Glucantime, Miltefosine and the immunostimulatory *P. Acnes* and Poly IC under normoxic and hypoxic conditions. Under hypoxic condition all compounds were less effective in *L. amazonensis* infected peritoneal macrophages.

We also evaluated the role of different treatment in a *in vivo* model of rump infection, with leishmaniasis. We describe the effects of ethanolic extract of typified Brazilian red propolis sample, red propolis and papain gel, Glucantime and the immunomodulator *P. acnes* with or without the HBO therapy. For this reason, we have

performed a longitudinal analysis in the expanding lesions of the susceptible BALB/c mouse. BALB/c mice treated with Glucantime, a combined therapy of Glucantime and HBO or Glucantime and propolis gel showed significant delay in lesion development and reduction in lesion parasite burdens compared with control mice.

Significant differences in the tissue pathology between red propolis and papain gel, Glucantime and *P. acnes* with or without the HBO therapy and untreated mice were observed by the end of treatments.

Finally, we investigated the cytokine production by BALB/c mouse infected with *L. amazonensis* and treated with propolis gel, Glucantime and HBO therapy. Propolis gel was the only treatment that increases the INF- $\gamma$  productin. We do not observe IL-4 production in the tested groups.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Esquema mostrando o ciclo de vida da <i>Leishmania</i> .....	<b>04</b>
<b>Figura 2:</b> Esquema mostrando as possíveis vias de resposta imune do hospedeiro vertebrado à <i>Leishmania</i> .....	<b>12</b>
<b>Figura 3:</b> Efeito leishmanicida de fármacos em macrófagos peritoneais infectados com <i>L. amazonensis</i> e mantidos sob as condições de hipóxia e normóxia.....	<b>46/47</b>
<b>Figura 4:</b> Efeito leishmanicida imunoestimuladores em macrófagos peritoneais infectados com <i>L. amazonensis</i> e mantidos sob as condições de hipóxia e normóxia..	<b>49</b>
<b>Figura 5:</b> Progressão da lesão de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	<b>52</b>
<b>Figura 6:</b> Camundongo BALB/c infectado com <i>L. amazonensis</i> .....	<b>53</b>
<b>Figura 7:</b> Sobrevivência de camundongos BALB/c após ingestão de extrato etanólico de própolis tipificada .....	<b>55</b>
<b>Figura 8:</b> Efeito do tratamento de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>57</b>
<b>Figura 9:</b> Camundongos BALB/c infectados com $1 \times 10^5$ amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>58</b>
<b>Figura 10:</b> Camundongos BALB/c infectados com $1 \times 10^5$ amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>58</b>

<b>Figura 11:</b> Efeito dos tratamentos de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>59</b>
<b>Figura 12:</b> Camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	<b>61</b>
<b>Figura 13:</b> Efeito do tratamento de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>64</b>
<b>Figura 14:</b> Efeito do tratamento de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>65</b>
<b>Figura 15:</b> Camundongo Balb/c infectado com <i>L. amazonensis</i> e tratado com <i>P. acnes</i> .....	<b>66</b>
<b>Figura 16:</b> Camundongos Balb/c infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	<b>66</b>
<b>Figura 17:</b> Fotomicrografia de lesão no dorso de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	<b>68</b>
<b>Figura 18:</b> Fotomicrografia de lesão no dorso de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	<b>71</b>
<b>Figura 19:</b> Fotomicrografia de lesão no dorso de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	<b>72</b>
<b>Figura 20:</b> Fotomicrografia de lesão no dorso de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	<b>74</b>
<b>Figura 21:</b> Produção de citocina por camundongos BALB/c infectados com <i>L. Amazonensis</i> .....	<b>76</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Sensibilidade de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> internalizados por macrófagos peritoneais murinos aos agentes leishmanicidas em normóxia e em hipóxia .....	<b>50</b>
<b>Tabela 2:</b> Efeito do tratamento de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>63</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ATA</b>	Atmosfera absoluta
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CAPE</b>	Cafeato de feniletila ( <i>Caffeic acid phenethyl ester</i> )
<b>CRs</b>	Receptores para Complemento
<b>FcRs</b>	Receptores para porção Fc de imunoglobulinas
<b>HBO</b>	Oxigênio hiperbarico ( <i>Hyperbaric oxygen</i> )
<b>HIF</b>	Fator induzível por hipóxia ( <i>Hypoxia-inducible factor</i> )
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>iNOS</b>	Oxido nítrico sintase induzível (inducible nitric oxide sintase)
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MFRs</b>	Receptores de manose-fucose
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico mensageiro

<b>MTT</b>	Dimetiltiazol-2-il difenil brometo de tetrazolio [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfato ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b><i>P. acnes</i></b>	<i>Propionobacterium acnes</i>
<b>Poly IC</b>	Polyinosinic-Polyribocytidylic acid
<b>ROI</b>	Intermediários reativos de oxigênio ( <i>Reactive Oxygen Intermediates</i> )
<b>RNI</b>	Intermediários reativos de nitrogênio ( <i>Reactive Nitrogen Intermediates</i> )
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio ( <i>Reactive oxygen species</i> )
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>Th</b>	Linfócito T “helper”
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa ( <i>Tumor necrosis factor alfa</i> )
<b>TSA</b>	Thio-specific antioxidant protein

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 O parasita .....	2
1.2 Vetor .....	4
1.3 As leishmanioses .....	7
1.4 Aspectos da patogenia das lesões cutâneas .....	8
1.5 Controle das leishmanioses .....	9
1.6 Resposta imune do hospedeiro .....	10
1.7 A leishmaniose murina induzida por <i>L. amazonensis</i> .....	13
1.8 Tratamento das leishmanioses .....	14
1.9 Própolis .....	18
1.10 Imunoestimuladores .....	20
1.11 Relevância da hipóxia .....	22
1.12 Oxigenação hiperbárica .....	24
2. OBJETIVOS .....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
3.1 Animais .....	32
3.2 Meio de Cultura .....	32
3.3 Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais murinos .....	32
3.4 Parasitas .....	33
3.5 Infecção das culturas de macrófagos com <i>Leishmania amazonensis</i> .....	33
3.6 Drogas e Imunoestimuladores .....	34
3.7 Própolis .....	35

3.8 Tratamento de culturas de macrófagos infectadas com <i>L. amazonensis</i> .....	<b>35</b>
3.9 O microambiente hipóxico e o cultivo das culturas de macrófagos peritoneais em hipóxia .....	<b>36</b>
3.10 Avaliação in vitro dos efeitos de drogas leishmanicidas e imunoestimuladores em macrófagos peritoneais murinos infectados com <i>L. amazonensis</i> e mantidos sob as condições de hipóxia e normóxia.....	<b>37</b>
3.11 Padronização da infecção no dorso de camundongos BALB/c com formas amastigotas e promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>37</b>
3.12 Câmara hiperbárica .....	<b>38</b>
3.13 Protocolo de pré tratamento com extrato etanólico de própolis brasileira em camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	<b>38</b>
3.14 Protocolos de tratamento de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> com diferentes compostos .....	<b>39</b>
3.15 Avaliação macroscópica das lesões .....	<b>40</b>
3.16 Histopatologia .....	<b>41</b>
3.17 Dosagens de IFN- $\gamma$ e IL-4.....	<b>41</b>
3.18 Análise estatística.....	<b>42</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
4.1 Avaliação dos efeitos de agentes leishmanicidas e imunoestimuladores em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e mantidos sob as condições de hipóxia ou normóxia.....	<b>44</b>
4.2 Padronização da lesão induzida por <i>L. amazonensis</i> no dorso de camundongos BALB/c.....	<b>51</b>
4.3 Avaliação do pré-tratamento de camundongos BALB/c com extrato etanólico de própolis brasileira.....	<b>54</b>
4.4 Tratamento com Propaína e HBO.....	<b>55</b>
4.5 Tratamento com Glucantime e HBO .....	<b>59</b>

4.6 Tratamento com Glucantime e Propaína .....	61
4.7 Tratamento com <i>P. acnes</i> e HBO.....	64
4.8 Análise histopatológica .....	67
4.9 Dosagem de IFN- $\gamma$ e IL-4.....	75
5. DISCUSSÃO.....	78
6. CONCLUSÕES.....	91
7. REFERÊNCIAS .....	94

# **INTRODUÇÃO**

## 1.1 O parasita

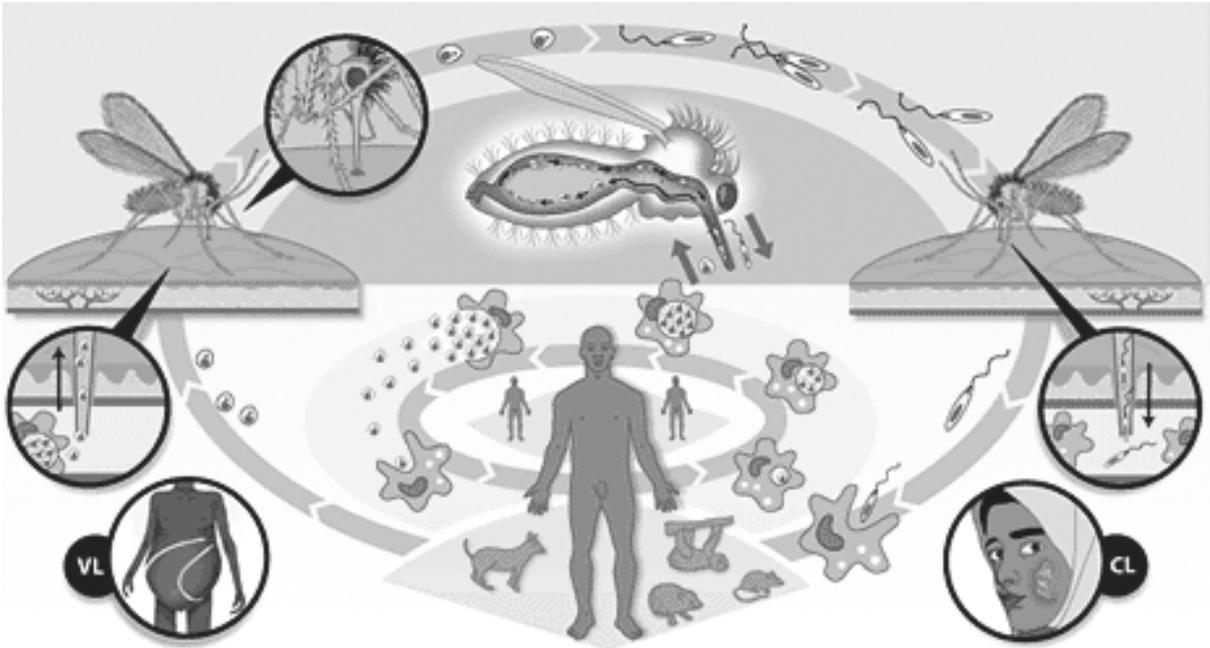
A *Leishmania* spp. é um protozoário pertencente à família trypanosomatidae (STEBUT, 2007). O gênero *Leishmania* foi criado por Ross em 1903 a partir das observações feitas por Cunnigham (1885), Leishman (1900) e Donovan (1903) (GONTIJO & CARVALHO, 2003), recebendo a denominação de *Leishmania donovani* o parasita causador do calazar, em homenagem aos estudos realizados por Leishman e Donovan (MEDEIROS & ROSELINO, 1999).

A leishmaniose humana está presente em quatro continentes, sendo endêmica em 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento (AWASTHI *et al.*, 2004, STEBUT, 2007). O número global de indivíduos infectados segundo a estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) é de 12 milhões, com aproximadamente dois milhões de novos infectados por ano. Cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas; e assim essa parasitose é considerada uma das mais importantes doenças tropicais infecciosas. No Brasil, a leishmaniose é doença de notificação compulsória e estima-se o aparecimento de 20.000 a 40.000 casos clínicos por ano (World Health Organization; Ministério da Saúde). Em 2005 foram relatados 24.291 casos de leishmaniose tegumentar americana e 3.203 casos de leishmaniose visceral, com 525 mortes entre 2004 e 2005 (Ministério da Saúde). Outro fato significativo para a saúde pública em relação à leishmaniose é a reativação de infecções subclínicas assintomáticas em indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida (World Health Organization).

A *Leishmania* apresenta uma forma flagelada e extracelular - promastigota, encontrada no inseto vetor e uma forma imóvel e intracelular - amastigota, presente no

interior de células do sistema fagocítico mononuclear de hospedeiros vertebrados (BOITZ & ULLMAN, 2006).

O inseto vetor do gênero *Phlebotomus* (presente no Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (presente no Novo Mundo) infecta-se quando suga o sangue de um indivíduo infectado ou reservatório animal. O parasita *Leishmania*, em sua forma amastigota, com aspecto arredondado e com 3-7  $\mu\text{m}$  de diâmetro vive em macrófagos. O flebótomo ingere macrófagos infectados durante o repasto sangüíneo e os amastigotas são liberados no estômago do inseto. Os amastigotas se transformam em promastigotas, uma forma móvel, flagelada e alongada (10-20  $\mu\text{m}$ ). Em seguida os promastigotas migram para o trato alimentar do inseto, onde vivem no meio extracelular e se multiplicam por divisão binária. Quando o inseto finalmente realiza o repasto sangüíneo em um mamífero hospedeiro, inocula os promastigotas de *Leishmania* juntamente com a saliva (Fig. 1). Uma vez no hospedeiro, os promastigotas são fagocitados pelos macrófagos onde rapidamente reverterem para a forma amastigota, sobrevivem multiplicando-se dentro dos macrófagos, lisando estas células. Os amastigotas liberados são fagocitados por outros macrófagos, continuando o ciclo (AWASTHI *et al.*, 2004).



**Figura 1.** Esquema mostrando o ciclo de vida da *Leishmania* (CL = leishmaniose cutânea; VL = leishmaniose visceral) (World Health Organization).

## 1.2 Vetor

Os hospedeiros invertebrados são pequenos insetos da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (NEVES, 2000). Segundo REY (2001) das 300 espécies já descritas nas Américas, muito poucas são responsáveis pela transmissão da leishmaniose, tal como ocorre nos outros continentes. Apenas dois gêneros são realmente importantes:

- *Phlebotomus* – onde estão todos os transmissores de leishmanioses da África, Europa e Ásia. Os flebotomos apresentam ampla distribuição geográfica, sendo vistos sob as mais diversas condições climáticas e de altitude e em ambientes silvestres, rurais e até urbanos;

- *Lutzomyia* – compreende a maioria das espécies e quase todas aquelas cujas fêmeas picam o homem. Neste gênero encontram-se todos os vetores de leishmanioses das Américas.

No Brasil, são popularmente denominados como asa branca, birigui, cangalhinha, flebótomo (ou frebote), mosquito palha e tatuquira (NEVES, 2000).

Os flebátomos de importância médica e veterinária medem de 2 a 4 mm de comprimento; apresentam o corpo densamente coberto de pêlos finos, às vezes, apresentando escamas intermescladas sobre as asas e esternitos abdominais. Também são características: posição da cabeça formando um ângulo de 90° com o eixo longitudinal do tórax; quando vivos e em repouso as asas são mantidas divergentes em posição semi-ereta; as pernas são compridas e esbeltas, e a extremidade posterior do abdômem é bem diferenciada – nos machos é bifurcada e nas fêmeas é pontuda ou ligeiramente arredondada (NEVES, 2000).

Unicamente as fêmeas adultas são hematófagas, mas elas se alimentam também de sucos vegetais, como o fazem regularmente os machos (REY, 2001). O crescimento parasitário só será abundante se, após o repasto sangüíneo infectante, a fêmea vier a alimentar-se de sucos vegetais ou de substâncias açucaradas. Essas substâncias vão facilitar a proliferação dos promastigotas no tubo digestivo do inseto, criando condições para a transmissão da infecção, pois a fêmea fortemente parasitada, quando voltar a picar, acaba por regurgitar algum sangue com flagelados que haviam se acumulado no intestino anterior ou no proventriculo. Se, em lugar disso, houver nova refeição de sangue, por volta do quarto ou quinto dia, os flagelados degeneram-se ou a infecção torna-se leve (REY, 2001).

A atividade dos flebotomíneos é predominante crepuscular ou noturna. As fêmeas picam as pessoas até cerca de meia-noite, ou ao amanhecer. Durante o dia, ficam em lugares tranquilos, sombrios e úmidos, protegidos do vento. Nas florestas e em lugares sombrios, as fêmeas mostram-se ativas mesmo durante o dia. Alimentam-se do sangue de animais domésticos e silvestres, picando, sobretudo pequenos roedores e répteis (REY, 2001).

O combate aos flebotomínios mediante inseticidas de ação residual é a medida fundamental para o controle da leishmaniose. Outros recursos são o tratamento dos pacientes, a eliminação de cães parasitados e a proteção contra a picada dos insetos (REY, 2001).

Com raras exceções, as leishmanioses constituem zoonoses de animais silvestres, e mais raramente domésticos, incluindo roedores, marsupiais (gambá), edentados (tatus, tamanduá, preguiça), canídeos e mesmo primatas. O homem também pode representar um hospedeiro, mas parece não ter um papel importante na manutenção dos parasitas na natureza (GONTIJO & CARVALHO, 2003; NEVES, 2000).

A *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*), espécie que utilizamos neste trabalho, circula entre pequenos roedores da floresta e alguns marsupiais, mas é pouco encontrada entre os homens devido ao fato de seu principal vetor ser pouco antropófilo. A doença é encontrada tanto no meio rural como nas cidades, se bem que sua incidência em todas as formas é maior no primeiro (REY, 2001).

### 1.3 As leishmanioses

A leishmaniose tem sido tradicionalmente classificada em diferentes classes de acordo com as síndromes básicas da doença (HERWALDT, 1999; MELBY, 2002). Diferentes espécies de *Leishmania* parecem idênticas, mas são geralmente distinguidas por características clínicas e geográficas. A genética e imunocompetência do hospedeiro podem ser igualmente importantes para algumas espécies do parasita (HANDMAN, 2001). Estudos dos padrões isoenzimáticos, análise de restrição de fragmento de DNA, e de cariótipos cromossômicos têm delineado novas espécies, particularmente no Novo Mundo.

No homem, a doença apresenta-se, pelo menos, com quatro manifestações clínicas: lesões cutâneas limitadas, lesões cutâneas difusas, lesões mucocutâneas e lesões viscerais que se não tratadas são fatais (DESJEUX, 2004).

A *L. amazonensis* causa principalmente lesões cutâneas (WEIGLE & SARAVIA, 1996), estando associada com a leishmaniose cutânea e também com a leishmaniose difusa na América do Sul (GRIMALDI & TESH, 1993).

O curso clínico da leishmaniose cutânea é complexo devido à variabilidade do período de incubação, da infecção subclínica, cura espontânea, propagação metastática, reativação, reinfecções e lesões crônicas (WEIGLE & SARAVIA, 1996). A *L. amazonensis* foi recentemente isolada de pacientes com diversas formas de leishmanioses incluindo cutânea, mucosa, difusa e visceral (BARRAL *et al.*, 1991; BARRAL *et al.*, 1986; SAMPAIO *et al.*, 1985). Os mecanismos patológicos responsáveis pela variedade de efeitos da infecção em humanos não são completamente entendidos; apesar disso, acredita-se que pode ser desenvolvida uma imunidade a reinfecção em pacientes com leishmaniose cutânea (CAMPBELL *et al.*, 2003).

#### 1.4 Aspectos da patogenia das lesões cutâneas

A patogenia inicial de qualquer das leishmanioses humanas é sempre representada por um quadro inicial inflamatório, com comprometimento de células do sistema monocítico fagocitário, formando um nódulo na porta de entrada de infecção do parasita (NEVES, 2003). Os promastigotas inoculados são fagocitados por macrófagos teciduais (histiócitos) e se diferenciam em amastigotas que se multiplicam no interior do vacúolo parasitóforo, culminando na primeira manifestação clínica, o nódulo papular (WEIGLE & SARAIVA, 1996). Este nódulo é produzido por uma massa dérmica contendo macrófagos parasitados e infiltrado linfocítico (GHERSETICH *et al.*, 1999). Esse nódulo pode regredir e curar-se dentro de poucos dias, permanecer estacionário por semanas ou evoluir rapidamente para úlceras. Essas variações dependem de fatores imunológicos, genéticos e da espécie de *Leishmania* envolvida (MURRAY *et al.*, 2005; NEVES, 2003). Na incapacidade da célula hospedeira destruir os amastigotas, a infecção tende a se cronificar e devido à persistência e aumento da carga parasitária, o infiltrado linfocítico inicial é substituído por um denso infiltrado de macrófagos altamente parasitados levando a formação de um granuloma macrofágico (MORAES & SILVEIRA, 1994). As lesões ulceradas geralmente se curam espontaneamente e são suscetíveis ao tratamento, como é caso das lesões provocadas por *L. amazonensis*.

Nas lesões cutâneas difusas provocadas por *L. amazonensis*, caracterizadas pelo aparecimento de nódulos, pápulas e tubérculos no rosto e membros e que raramente ulceram, também se observa abundância de macrófagos infectados, raros linfócitos e aspecto de granuloma macrofágico (GHERSETICH *et al.*, 1999; GRIMALDI & TESH, 1993; WEIGLE & SARAIVA, 1996). Em lesões crônicas de cura mais lenta, macrófagos contendo amastigotas e o infiltrado inflamatório levam à formação de

nódulos dérmicos com manifestações clínicas diversas facilmente confundidas com doenças crônicas de pele como a psoríase, varicela e carcinomas de pele (SILVEIRA *et al.*, 2004; WEIGLE & SARAVIA, 1996).

O processo de infecção e multiplicação intracelular do parasita, frente à incapacidade do hospedeiro em diminuir a carga parasitária, pode levar à formação de um infiltrado de células mononucleares e à formação de granuloma. Este processo infeccioso deve resultar em áreas de perfusão inadequada e conseqüente hipóxia tecidual.

### **1.5 Controle das leishmanioses**

O controle das leishmanioses esbarra no fato dela ser uma zoonose, sendo os animais silvestres e domésticos potenciais reservatórios para o parasita. O crescimento urbano desordenado também tem causado muitas dificuldades no combate ao flebótomo (HANDMAN, 1999).

O controle da leishmaniose visceral tem sido feito através da eliminação de cães soro positivos e da aplicação de inseticida em áreas peridomésticas. Em 1997, Killick-Kendrick *et al.*, demonstraram que coleiras plásticas impregnadas com o inseticida deltamethrin protegeram os cães de 96% das picadas do *Phlebotomus perniciosus*, durante oito meses. Segundo David *et al.*, 2001, se as coleiras impregnadas com deltamethrin mostram uma proteção efetiva contra a picada de flebotomíneos em cachorros, deve-se adotar um procedimento muito simples para controlar esse reservatório animal. Ao invés de matar os cães soro-positivos, as coleiras seriam mais simples e efetivas na sua proteção (DAVID *et al.*, 2001).

Até o momento não existe disponível nenhuma quimioprofilaxia nem imunoprofilaxia (vacina) que proteja contra a leishmaniose cutânea. A primeira medida de controle deve ser evitar a picada do inseto vetor através de telas impregnadas com repelentes e inseticidas. Entretanto, medidas individuais não produzem uma proteção estatisticamente significativa, sendo necessária uma combinação das medidas para produzir um efeito protetor cumulativo. Como forma de controle, deve-se também, diagnosticar os casos da doença e fazer o acompanhamento destes pacientes (BAILEY & LOCKWOOD, 2007).

### **1.6 Resposta imune do hospedeiro**

A leishmaniose é um perfeito exemplo da interação parasito-hospedeiro. Através de anticorpos IgG e de fibronectinas, ocorre o fenômeno de adesão dos promastigotas metacíclicos à superfície dos macrófagos, que possuem receptores para a porção Fc das IgG presentes no local. Os promastigotas aderem a algumas moléculas de superfície como CR1, CR3 e C3b antes de serem internalizados (NEVES, 2003; AWASTHI *et al.*, 2004).

Imediatamente após a inoculação dos parasitas no hospedeiro vertebrado, um processo inflamatório local é iniciado, envolvendo um acúmulo de células no local (BIEL *et al.*, 1992; SUNDERKOTTER *et al.*, 1993). Neutrófilos ou polimorfonucleares são as primeiras células a migrarem para o local da infecção, fagocitando a *Leishmania*. Uma vez ingerido por macrófagos, alguns parasitas são destruídos por enzimas proteolíticas armazenadas em grânulos especiais e pela produção de espécies reativas de oxigênio. O neutrófilo começa a secretar quimiocinas como IL8, essencial para levar mais neutrófilos ao local da infecção. Dois ou três dias depois monócitos/ macrófagos

chegam ao local da infecção, e dentro de poucos dias passam a predominar nessa região (AWASTHI *et al.*, 2004).

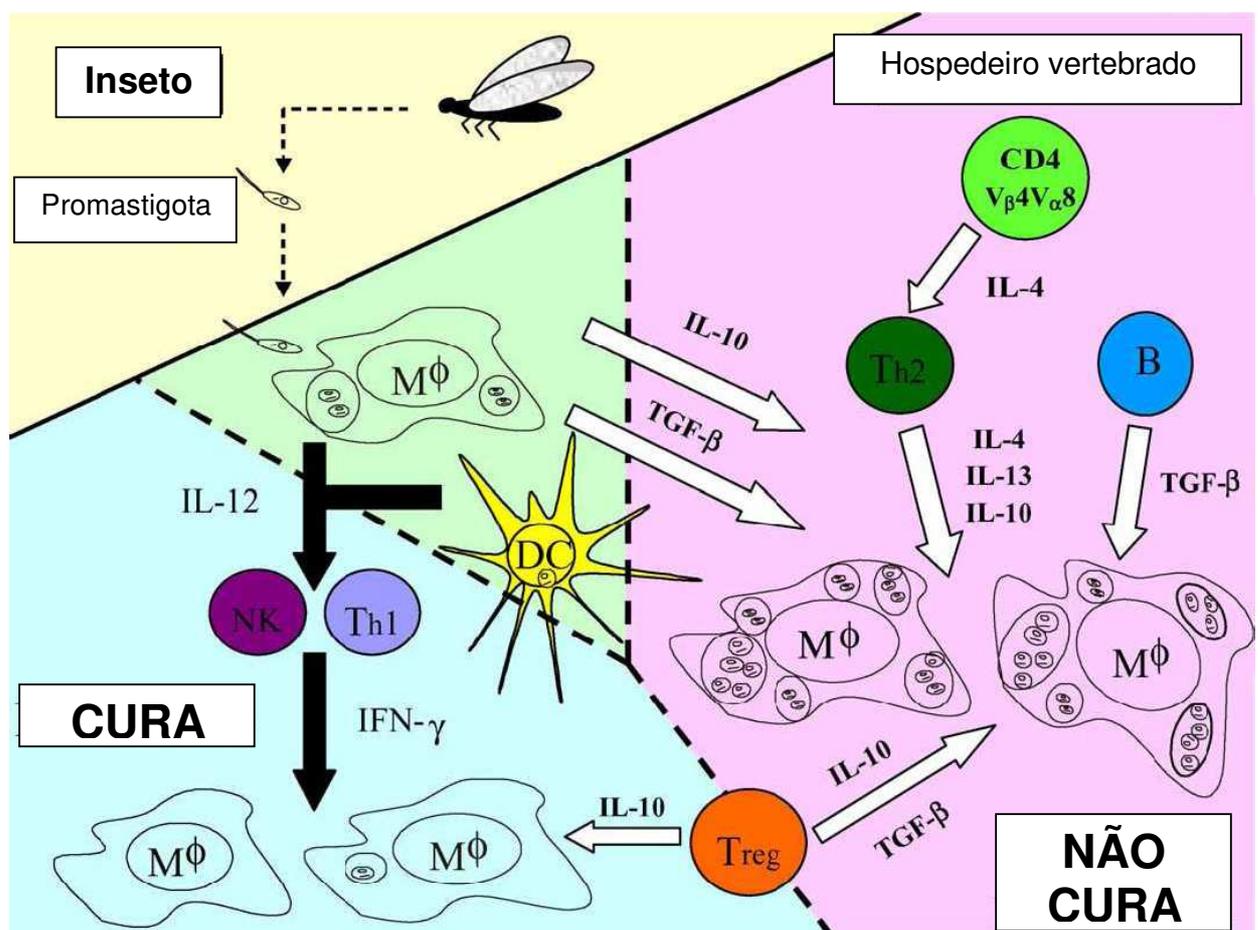
Os linfócitos T “helper” (Th) têm um importante papel na resposta imune. Duas subpopulações funcionalmente distintas de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, Th1 e Th2, têm sido identificadas baseado no perfil de citocinas promovido pelo próprio estímulo antigênico. A presença de IL-12 promove a diferenciação de linfócitos Th em Th1, que produzem grandes quantidades de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL-2. Essas células estão associadas à resposta imune celular conferindo proteção durante a infecção por *Leishmania* como mostrado na figura 1 (GHERSETICH *et al.*, 1999).

A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória produzida por fagócitos e células apresentadoras de antígeno (monócitos, macrófagos, neutrófilos, microglias e células dendríticas) (TRINCHIERI, 2003). Por outro lado, a presença de IL-4 e IL-10, regula a diferenciação de linfócitos Th2, que por sua vez, produzem IL-4, IL-5 e IL-10 e que associadas com a imunidade humoral conferem susceptibilidade a *Leishmania* através da inibição da produção de IFN- $\gamma$  e de IL-12 pelos macrófagos (Fig. 2) (CUNNINGHAM, 2002; GHERSETICH *et al.*, 1999). Os dois mediadores mais bem descritos e envolvidos na morte do parasita por macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) são os intermediários reativos de nitrogênio como o óxido nítrico e o peroxinitrito (KANE & MOSSER, 2000; LINARES *et al.*, 2001).

Alguns estudos realizados em sistema *in vitro*, têm mostrado que macrófagos sofrem mudanças após a infecção, como por exemplo, o aumento da resistência a apoptose, a diminuição da expressão de moléculas MHC e a inibição da produção de

intermediários reativos de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI) (OVERATH & AEBISCHER, 1999).

A presença dos amastigotas no hospedeiro induz resposta imune do tipo celular e humoral. Entretanto, o grau dessas respostas e sua capacidade defensiva são muito variáveis (revisto por ALEXANDER & BRYSON, 2005; NEVES, 2003).



**Figura 2.** Esquema mostrando as possíveis vias de resposta imune do hospedeiro vertebrado à *Leishmania* (modificado de ALEXANDER & BRYSON, 2005).

### 1.7 A leishmaniose murina induzida por *L. amazonensis*

No estudo das respostas imune contra a leishmaniose, assim como no desenvolvimento de quimioterapias e para entender a interface droga-sistema imune, o modelo murino de camundongos isogênicos é a melhor escolha. Para essa escolha do modelo animal são observadas as semelhanças fisiológicas com o humano, além de ser um animal de fácil acesso em laboratório (AWASTHI *et al.*, 2004).

A evolução da leishmaniose em humanos varia de indivíduo para indivíduo, enquanto modelos animais podem sempre apresentar um perfil uniforme da doença (AWASTHI *et al.*, 2004). A lesão induzida por *L. amazonensis* é facilmente avaliada, sendo característica a presença de lesões cutâneas elevadas com centro ulcerado em linhagens murinas susceptíveis como BALB/c, sendo caracterizadas por um grande número de amastigotas em divisão e migração de células inflamatórias (McELRATH, *et al.*, 1987).

Existem dois modelos murinos que vêm sendo estudados para a infecção com *Leishmania*, baseado em sua resistência e suscetibilidade ao parasita. Camundongos da linhagem C57BL/6 controlam a infecção com *L. amazonensis*, apresentando uma resposta imune predominante do tipo Th1. Células Th1 secretam IL2 e IFN-  $\gamma$ , essa última linfocina tem a capacidade de ativar o macrófago para que expresse a enzima iNOS, e catalize a formação de óxido nítrico, molécula capaz de matar os amastigotas intracelulares (Fig. 2).

Um segundo modelo murino utilizado são os camundongos BALB/c, uma linhagem suscetível à *L. amazonensis*, que apresenta resposta imune predominante do tipo Th2, linfócitos que secretam IL4, IL5 e IL10. Esse tipo de resposta limita as funções

de Th1 via IL4 e IL10, e desativam o macrófago (AWASTHI *et al.*, 2004), como mostrado na figura 2.

Na grande maioria dos trabalhos inocula-se *L. amazoensis* pela via subcutânea no coxim plantar de uma das patas traseiras (ARRAIS-SILVA *et al.*, 2006). Em poucos trabalhos usa-se inocular o parasita pela via subcutânea na região do dorso (McELRATH, *et al.*, 1987), modelo que provavelmente é mais parecido com o humano.

Outro modelo convencionalmente utilizado para a pesquisa da leishmaniose é o modelo *in vitro*, que auxilia na avaliação dos resultados. Para isso, pode-se utilizar cultura de parasita ou de célula infectada. Em nosso recente trabalho foram testados extratos etanólicos de própolis brasileira em cultura de macrófagos infectados com *L. amazonensis* além da cultura de ambas as formas deste parasita para avaliação de seu efeito leishmanicida (AYRES *et al.*, 2007).

### **1.8 Tratamento das leishmanioses**

Apesar do uso medicinal de compostos de antimônio já ser conhecido desde a Antiguidade para fins terapêuticos, somente em 1912, Gaspar Vianna observou que os antimoniais trivalentes eram eficazes na terapêutica da leishmaniose tegumentar americana (PONTE-SUCRE *et al.*, 2006).

A quimioterapia usualmente utilizada para o tratamento da leishmaniose está longe de ser satisfatória. O tratamento para a leishmaniose é baseado no antimonial pentavalente, que vem sendo utilizado há mais de 60 anos, sob duas formas: o antimoniato de N-metilglucamina e o stibogluconato de sódio, (CROFT & COOMBS, 2003; GONTIJO & CARVALHO, 2003, NATERA *et al.*, 2007; revisto por ASHUTOSH *et al.*, 2007). O antimonial é indicado para tratamento de todas as formas de leishmaniose

tegumentar, embora as formas mucosas exijam maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas. Os efeitos colaterais mais freqüentes são mialgia, inapetência, cefaléia, febre, vômitos, tontura e inchaço no local da aplicação. A cardio, nefro e hepatotoxicidade dos antimoniais constituem uma importante limitação ao seu uso. Além disso, apresenta elevado custo, sendo muitas vezes difícil sua obtenção em regiões endêmicas (rural). Em algumas regiões como a Índia, tem se tornado comum a resistência a essa droga, tornando o seu uso pouco efetivo (World Health Organization). Estes fármacos também são contra indicados para indivíduos com alergia a drogas, mulheres grávidas e crianças (ARMIJOS *et al.*, 2004; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Provocado pelo aumento de problemas clínicos do tratamento com Glucantime na Índia e pela imunodeficiência humana conferida por vírus (HIV), o uso alternativo de agentes leishmanicidas, primeiramente a Anfotericina B, cresceu substancialmente. A Anfotericina B, fungicida de reconhecida ação leishmanicida, tornou-se a droga de segunda escolha, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Sabe-se que a Anfotericina B apresenta ações intrínsecas imunoestimuladoras, as quais podem mediar alguns efeitos antifúngicos intracelular. Algumas dessas ações incluem a liberação de citocinas como IFN-  $\gamma$ , que aumentam a indução de iNOS e/ou produção de ROI por macrófagos (MURRAY & DELPH-ETIENNE, 2000). A Anfotericina B também induz a liberação de TNF- $\alpha$ , outra citocina com efeito leishmanicida (MURRAY & DELPH-ETIENNE, 2000).

Os efeitos colaterais da Anfotericina B mais comuns incluem náuseas, vômitos, febre, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas. A cardio e

nefrotoxicidade impedem seu uso fora do ambiente hospitalar (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Entretanto, novos fármacos têm sido criados nos últimos anos para o tratamento de leishmaniose, incluindo Am-Bisome®, a excelente formulação lipossomal de Anfotericina B de custo elevado.

A Miltefosina, fármaco utilizado para o tratamento de câncer, foi aprovada como a primeiro fármaco oral para o tratamento da *Leishmania* visceral na Índia e está sendo testada para a cura da leishmaniose cutânea na Colômbia (CROFT *et al.*, 2003; STEBUT, 2007; PONTE-SUCRE *et al.*, 2007; THAKUR *et al.*, 2007). Ela pode ser utilizada tanto por pacientes que respondem como para aqueles que não respondem ao tratamento com antimônio (SUNDAR *et al.*, 1999). Os índices de cura da leishmaniose visceral estão entre 94-97% com poucos efeitos colaterais. Infelizmente, foi observada a reincidência de *L. amazonensis* em alguns pacientes (SINGH, S. & R. SIVAKUMAR, 2004), além do desenvolvimento de resistência do parasita à Miltefosina no modelo *in vitro* (ESCOBAR *et al.*, 2002; SEIFERT *et al.*, 2003). Apesar de apresentar boa eficácia, a Miltefosina é muito cara e apresenta uma longa vida no corpo humano, o que pode levar ao surgimento de cepas resistentes (revisto por ASHUTOSH *et al.*, 2007; SEIFERT *et al.*, 2003).

A resistência a fármacos (antimoniais pentavalentes, como Glucantime) utilizadas tradicionalmente na terapia contra as leishmanioses, aliada aos efeitos colaterais destes compostos fazem com que alternativas efetivas, seguras e baratas ao tratamento sejam estudadas (HERWALDT, 1999; PONTE-SUCRE *et al.*, 2007).

Durante a última década, alternativas de tratamento para a leishmaniose têm sido registradas e se tornado disponíveis em alguns países, como Índia e Colômbia, entretanto muitos desenvolvimentos nesta área estão relacionados à reformulação de

fármacos já existentes. Isso porque a biologia do parasita e a resposta imunológica do hospedeiro permanecem em parte desconhecidas (NATERA *et al.*, 2007; MISHRA *et al.*, 2007).

Devido à facilidade na utilização dos modelos *in vivo* e *in vitro* de infecção com *Leishmania*, a eficiência de vários compostos e de protocolos de vacinação tem sido testados. A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica as vacinas experimentais contra leishmaniose em gerações. Na primeira geração estão as vacinas compostas por parasitas mortos e BCG (Bacilo Calmette-Guérin), por outro lado, as chamadas vacinas de Segunda geração utilizam processos mais sofisticados como o desenvolvimento de parasitas avirulentos, microrganismos modificados geneticamente ou subunidades com capacidade antigênica (World Health Organization). Os estudos continuam, no entanto ainda não há drogas mais eficientes ou vacinas humanas disponíveis para o combate desta importante parasitose, a leishmaniose (revisto por HANDMAN, 1999). Após 25 anos de pesquisa, foi licenciada a primeira vacina contra a leishmaniose visceral canina pelo Ministério da Agricultura do Brasil. A vacina Leishmune é produzida pela Fort Dodge Animal Health e é a primeira vacina contra a leishmaniose visceral canina disponível no mundo (DANTAS-TORRES, 2006).

Há uma intensa busca por compostos sintéticos ou produtos naturais com potencial para o tratamento da leishmaniose. Nas últimas décadas têm ocorrido um movimento denominado “back to Nature”, o qual, na área de desenvolvimento de fármacos tem sido bem visto devido ao sucesso obtido na terapêutica (NEWMAN *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2007). Na literatura há muitos relatos da ação de diversos extratos naturais, principalmente extraídos de plantas de zonas tropicais apresentando efeito leishmanicida, por exemplo, *Hygrophila guianensis*, *Jacaranda caucana* e *Otoba*

*parviflora* (FOURNET *et al.*, 1996; AKENDENGUE *et al.*, 1999; WENIGER *et al.*, 2001; FOURNET & MUNOZ, 2002).

Nos próximos itens apresentaremos dados da literatura e observações relacionadas à ação de compostos e tratamentos que foram testados nos modelos murino e *in vitro* da leishmaniose.

### 1.9 Própolis

A própolis é uma resina produzida pelas abelhas para vedar e esterilizar colméias e tem sido objeto de estudo há vários anos (BANKOVA *et al.*, 2000). Além disso, a própolis é utilizada há séculos na medicina popular e a falta de efeitos colaterais nos diversos tratamentos indica a sua inocuidade. A composição da própolis varia de acordo com as plantas encontradas em regiões específicas (SAWAYA *et al.*, 2004). A própolis brasileira, por exemplo, apresenta uma composição química incomum, com respeito a amostras do resto do mundo. Inúmeros compostos já foram identificados e caracterizados em própolis brasileiras, tais como ácidos prenilados, ligninas e terpenos (MARCUCCI *et al.*, 2000).

As suas propriedades anti-sépticas, cicatrizantes e antiinflamatórias têm sido pesquisadas. Por exemplo, a própolis aumenta a atividade de células *natural killer* contra células tumorais (SFORCIN *et al.* 2002), modula a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio em macrófagos peritoneais nos modelos *in vitro* e *in vivo* (ORSI *et al.*, 2000) e aumenta a atividade fungicida destas células (MURAD *et al.* 2002). O extrato etanólico de própolis também atua na resposta imune estimulando a produção de anticorpos (SCHELLER *et al.*, 1988). O ácido cinâmico, um dos componentes da própolis, atua na defesa do hospedeiro estimulando a proliferação de linfócitos e a

produção de IL-1 e IL-2 (IVANOVSKA *et al.*, 1995). Além disso, investigações clínicas e experimentais têm demonstrado que o extrato de própolis apresenta propriedades antiparasitárias (FREITAS *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que própolis tem ação no modelo *in vitro* contra *Trypanozoma cruzi* (DE CASTRO & HIGASHI, 1995; DE CASTRO, 2001), *Giardia duodenalis* (FREITAS *et al.*, 2006), *Trichomonas vaginalis* (STARZYK *et al.*, 1977) e promastigotas de *Leishmania* (MACHADO *et al.*, 2007).

Recentemente, compostos polifenólicos derivados de produtos naturais foram reconhecidos por suas propriedades anti-tumorais (SUGANUMA *et al.*, 1999; KURODA & HARA *et al.*, 1999), anti-inflamatória e antioxidante (MARTINEZ & MORENO, 2000; CHAN *et al.*, 2000). O cafeato de feniletila (Caffeic acid phenethyl ester - CAPE), por exemplo, é um composto fenólico e ativo componente da própolis européia e de zonas temperadas do planeta. Diversas pesquisas têm demonstrado que o CAPE tem efeito antiproliferativo e induz a apoptose de diversas linhagens de células tumorais (NOMURA *et al.*, 2001; NAGAOKA *et al.*, 2002), além de reduzir a formação de tumor quando incluído na dieta alimentar (MAHMOUD *et al.*, 2000).

Através do estudo da composição química da própolis, é possível dividi-las, segundo a sua origem, em grandes regiões geográficas, pode-se assim, delinear um perfil químico de diferentes amostras e estabelecer padrões de qualidade (MARCUCCI *et al.*, 2007). Para o processo químico de tipificação de várias substâncias presentes na própolis brasileira, emprega-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) identificando-se e quantificando-se com precisão os diferentes compostos presentes. A separação por cromatografia líquida é capaz de identificar os componentes majoritários de amostras de própolis (marcadores principais). O processo inclui a entrada de dados em uma planilha para a quantificação das substâncias identificadas

por CLAE e também estabelece a tipagem da amostra pela quantidade de cada componente próprio da composição química da própolis brasileira. A identificação dos constituintes da própolis, muitos deles possuindo atividade antibacteriana, antimicótica, antirradicais livres e antitumoral, abre um caminho para a utilização da própolis brasileira tipificada pela indústria farmacêutica (MARGUCCI *et al.*, 2007).

Nossos dados recentes demonstraram que amostras tipificadas de quatro tipos própolis brasileiras foram efetivas em reduzir a infecção *in vitro* de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* sem apresentar efeito tóxico nas culturas celulares (AYRES *et al.* 2007; Pedido de patente protocolo 018060007317). O extrato de própolis vermelha foi o mais efetivo e o seu uso para o tratamento de macrófagos não causou nenhum dano celular, como demonstrado pelo teste de viabilidade celular (MTT) (AYRES *et al.*, 2007).

### **1.10 Imunoestimuladores**

O uso de imunoestimuladores, isto é, substâncias que atuam no sistema imune também é uma alternativa para a terapia contra a leishmaniose. A cura da leishmaniose é dependente do desenvolvimento de uma resposta imune efetiva mediada por linfócitos T tipo Th1 que ative macrófagos a produzirem intermediários de nitrogênio para matar amastigotas (AWASTHI *et al.*, 2004). Neste contexto, detalharemos a seguir alguns compostos imunoestimuladores que foram testados nos modelo *in vitro* e *in vivo* de leishmaniose durante este trabalho.

1. *Propinobacterium acnes* (*P. acnes*): *P. acnes* é bacilo Gram-positivo, pertencente à microflora tecidual. Quando essa suspensão bacteriana é administrada em humanos ou animais experimentais, induz efeitos biológicos que modulam a

resposta imune inata e adquirida (ANANIAS *et al.*, 2007). A administração de suspensão de *P. acnes* morto em camundongos aumenta a atividade fagocítica e tumoricida de macrófagos apresenta efeito adjuvante na resposta por anticorpos e aumenta a resistência a infecções por diferentes patógenos, incluindo o *Trypanosoma cruzi* e *L. major* (HILL, 1987; BRAGA, *et al.*, 2003; MUSSALEM *et al.*, 2006).

Estudos recentes demonstraram que o tratamento de camundongos BALB/c com suspensão de *P. acnes* promove resposta do tipo Th1 envolvendo a produção de IL12 e IL18, que induzem a liberação de IFN- $\gamma$  e aumento de IgG2a, inibindo a expressão de linfócitos Th2. Além disso, a redução seletiva de células CD4+NKT e citocinas de Th2, particularmente IL4, também foi observada (BRAGA *et al.*, 2003).

2. Polyinosinic-Polyribocytidylic acid (Poly IC) induz resposta do tipo Th1 com o aumento da produção de mRNA de IFN- $\gamma$ , IL2 e IL6 (VICTORATOS, 1997). Experimentos demonstraram que hamsters infectados com amastigotas de *L. donovani* desenvolveram a capacidade de eliminar patógenos intracelulares quando tratados com stibogluconato (Stibanato) combinado com polyinosinic-polycytidilic acid estabilizado com polilisina e carboximetilcelulose (poly ICLC), um potente indutor de IFN- $\gamma$  e da resposta imune juntamente com L-arginina. Resultados sugerem que baixas doses de Stibanato e poly ICLC mais L-arginina promovem uma inibição contra *L. donovani* em hamsters. Entretanto, quando os dados foram combinados, foi observada uma significativa inibição sem apresentar efeito tóxico (BHAKUNI, 1999).

### 1.11 Relevância da hipóxia

Considerando-se a diferença no efeito de drogas antineoplásicas e tratamentos quimioterápicos em situações de hipóxia (KOCH *et al.*, 2003) e o microambiente hipóxico durante a leishmaniose (ARRAIS-SILVA *et al.*, 2005b), a avaliação da resposta a diferentes tratamentos neste microambiente torna-se importante.

Diversas características de lesões, tumores, reação de hipersensibilidade tardia do tipo 1 e leishmaniose, tais como o aumento da demanda metabólica de infiltrado leucocitário no tecido inflamado, microcirculação e proliferação celular, resultam em ambiente hipóxico (LEWIS, *et al.* 1999). O microambiente hipóxico, fator presente em tecidos lesionados, foi reconhecido como um estímulo metabólico específico ou sinal de resposta celular (LEWIS *et al.*, 1999).

Diversas características das lesões causadas por *Leishmania* sp. em humanos e animais como o ambiente microcirculatório, proliferação parasitária e infecção bacteriana secundária e a demonstração de que o fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) é expresso em lesões cutâneas de camundongos suscetíveis infectados com *L. amazonensis* (EL-ON *et al.*, 1992; GRIMALDI & TESH, 1993; GIORGIO & BARÃO, 1998; ARRAIS-SILVA *et al.*, 2005b) são fortes indicadores de uma redução na tensão de oxigênio intralesional (hipóxia). A hipóxia *in vitro* altera a resposta de macrófagos a *L. amazonensis* e bactérias gram-positivas (COLHONE *et al.*, 2004; PEYSSONNAUX, 2005).

Em condições fisiológicas, as células em organismos pluricelulares necessitam de oxigênio para obtenção de energia. Em tecidos normais, a tensão de

oxigênio (ou pressão parcial de oxigênio,  $pO_2$ ) varia de 20 a 70 mmHg (2,5% a 9% de  $O_2$ ). Diante desta ampla faixa de tensão de oxigênio em tecidos saudáveis, torna-se difícil estabelecer um valor universal que defina a hipóxia. Assim, uma definição mais funcional incluiria o conceito de que a hipóxia ocorre quando o fornecimento de oxigênio é insuficiente para a demanda do tecido, ou ainda, a hipóxia é uma diminuição local na tensão de oxigênio (PAPANDREOU *et al.*, 2005; QU *et al.*, 2005).

Enfim, a hipóxia celular pode surgir de circunstâncias fisiológicas tais como exercícios físicos ou viagens para locais mais elevados, bem como de condições patofisiológicas. A diferença é que enquanto as circunstâncias fisiológicas resultam freqüentemente em uma hipóxia branda e transitória, a condição patológica resulta em um déficit de oxigênio mais severo e por um longo período de tempo (PAPANDREOU *et al.*, 2005).

O efeito da hipóxia na ação de fármacos foi testado por Koch *et al.* (2003) utilizando drogas como Cisplatina, Oxaliplatina, Mitomicina C e Carboplatina em três linhagens de células tumorais. Os resultados mostraram que, sob condições hipóxicas (1% de  $O_2$ ) todas as drogas testadas foram menos efetivas. No entanto, o impacto da hipóxia na quimiosensibilidade dependeu fortemente da linhagem celular estudada.

Exemplos de classes de fármacos funcionalmente afetados pela hipóxia incluem os agentes alquilantes tais como melfalan e antibióticos como a bleomicina (YUN *et al.*, 2004). A hipóxia também afeta a eficiência de fármacos cuja ação depende do dano oxidativo, como por exemplo, a Anfotericina B. Segundo Sokol-Anderson *et al.* (1986) a evidência para este papel do oxigênio na toxicidade da Anfotericina B foi comprovada pela drástica redução na lise de protoplastos de *Candida albicans* vista sob condições de hipóxia. Os efeitos da hipóxia nos fármacos e conseqüentemente na

progressão de tumores fizeram com que testes *in vitro* fossem desenvolvidos para prever as concentrações terapêuticas dos agentes quimioterápicos em condições de hipóxia fisiológica (GRIGORYAN *et al.*, 2005).

A hipóxia experimental parece induzir a adaptação em macrófagos como migração diferencial, aumento de citocinas pró-inflamatórias e atividade de enzima glicolítica, além da diminuição na fagocitose de partículas inertes (DEGROSSOLI *et al.*, 2004).

Os macrófagos são células que se acumulam no centro ou nas adjacências de áreas hipóxicas e pouco vascularizadas de tecidos lesados (revisto por LEWIS *et al.*, 1999). A hipóxia é uma situação a que os macrófagos se adaptam alterando o seu metabolismo, a produção de linfocinas pró-inflamatórias, de proteínas de choque térmico e da enzima iNOS e as atividades exocíticas, endocíticas e fagocíticas (LEWIS *et al.* 1999).

### **1.12 Oxigenação hiperbárica**

A terapia com oxigênio hiperbárico (HBO) é definida como um modelo de tratamento médico no qual, os pacientes ficam totalmente fechados em uma câmara respirando 100% de oxigênio a uma pressão maior que uma atmosfera absoluta (ATA).

A terapia hiperbárica é feita expondo o paciente a uma pressão barométrica maior do que a pressão ambiente (1 atmosfera absoluta ou 1 ATA), onde o paciente respira 100% de oxigênio (OTER *et al.*, 2005). A pressão máxima aprovada e a duração da HBO usada clinicamente é de 3 ATA e 120 minutos (FELDMEIER, 2003) e a pressão geralmente utilizada clinicamente varia de 1,8 a 2,8 ATA por 60-90 minutos (BENEDETTI *et al.*, 2004).

A hiperóxia ( $pO_2$  340-760 mmHg; 45-100%  $O_2$ ) e a oxigenação hiperbárica - HBO ( $pO_2 > 760$  mmHg) têm sido utilizadas com sucesso para o tratamento de várias infecções *in vivo* e em alguns estudos *in vitro*. Apesar de eficaz para o tratamento de várias patologias (ostiomielite, úlceras crônicas e lesões traumáticas), a suplementação de oxigênio ainda é controversa na terapia de outras doenças infecciosas (GARNER *et al.*, 1989; MOON & CAMPORESI, 1999). A exposição à HBO leva a um aumento do oxigênio dissolvido no sangue e conseqüentemente de espécies reativas de oxigênio (ROS) no sangue e tem sido usada com sucesso para o tratamento de uma grande variedade de condições clínicas relacionadas a hipóxia (FELDMEIER, 2003). A eficácia do tratamento depende do aumento do oxigênio dissolvido no sangue (por exemplo: isquemia - dano por reperfusão, infecções tissulares, necrose por radiação, cura de lesões) ou da exposição à alta pressão (por exemplo: embolismo) (JAIN, 1996).

A utilização da HBO baseia-se no fato de que tecidos infectados ou lesados apresentam micro-áreas com baixa concentração de oxigênio (hipóxicas), que se expandem devido à perfusão deficiente e ao aumento do consumo de oxigênio por células e microrganismos infectantes em proliferação. Desta maneira, a HBO proporciona o aumento da solubilidade do oxigênio no plasma a um nível suficiente para que os tecidos retirem o mínimo de oxigênio carregados pelas hemoglobinas (KINDALL, 1999), elevando os níveis sistêmicos e locais do oxigênio necessário para a produção de adenosina trifosfato (ATP), para a síntese de proteínas e para a produção de espécies reativas das quais o oxigênio é o substrato. Os efeitos colaterais da hiperóxia e HBO em humanos, animais e em células de mamíferos são controversos (GARNER *et al.*, 1989; MONN & CAMPONESI, 1999). Altas concentrações de oxigênio são tóxicas para os pulmões, e os tratamentos prolongados com doses excessivas de HBO

provocam complicações respiratórias agudas (MONN & CAMPONESI, 1999). Outros resultados demonstraram que o tempo de tratamento com HBO é crucial para a sobrevivência de células e para a indução de citocinas; a linhagem celular U937, por exemplo, nas primeiras duas horas de exposição a HBO produziu quantidades elevadas de TNF, IL1 e IL6; períodos mais prolongados de tratamento inibiram a síntese destas citocinas, mas induziram a secreção de IL8 (DEDHIA *et al.*, 1993; DESMARQUEST *et al.*, 1998; BURAS *et al.*, 2006). Buras *et al.* (2006) demonstraram que camundongos que apresentavam septicemia, quando submetidos à HBO (2,5 atm absolutas) apresentaram um aumento na secreção de IL-10. Macrófagos alveolares em culturas hiperóxicas tem índices de fagocitose baixos, mas quando retornam a ambiente normóxico, produzem mais ROI e fagocitam mais eficientemente (DEDHIA *et al.*, 1993).

O aumento de O<sub>2</sub> é tóxico para vários parasitas, como *Giardia intestinales*, *Entamoeba histolytica* e *Pneumocystis carinii* (GILLIN & DIAMOND, 1981; PESANTI, 1984).

Como já mencionado, diversas características das lesões causadas por *Leishmania* em humanos e animais como alterações da microcirculação, proliferação parasitária, infecção bacteriana secundária (EL-ON *et al.*, 1992; GRIMALD & TESH, 1992, GIORGIO & BARAO, 1998) e a demonstração de que o fator induzível por hipóxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) é expresso em lesões cutâneas de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* (ARRAIS-SILVA *et al.*, 2005b) são fortes indicadores do microambiente hipóxico nas lesões. A terapia com oxigênio hiperbárico (HBO) aumenta os níveis de oxigênio sistêmico e do tecido e atua como um tratamento adjuvante em (CLARK & MONN, 1999). A exposição a HBO diminui a hipóxia tecidual, restaura o

oxigênio necessário para um normal metabolismo oxidativo e estimula o reparo e angiogênese, assim como a síntese de citocinas e fator de crescimento (LA VAN & HUNT, 1990; TANDARA & MUSTOE, 2004).

A *Leishmania*, apesar de possuir defesas antioxidantes, tais como a expressão de superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase e TSA (thio-specific antioxidant protein) (WEBB et al., 1998) é lisada por intermediários reativos de oxigênio (AUGUSTO et al., 1996). Recentemente, nós demonstramos que HBO é tóxica para amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* e pode reduzir a susceptibilidade de macrófagos à infecção *in vitro* por *Leishmania* (ARRAIS-SILVA, et al., 2005a). Foi demonstrado também que o tratamento com HBO é capaz de inibir a proliferação de *L. amazonensis*, pela diminuição da suscetibilidade de macrófagos infectados (ARRAIS-SILVA et al., 2005a) e reduzir o tamanho da lesão de animais infectados e expostos diariamente a HBO durante 20 dias, assim como os níveis de parasitemia quando infectado na pata (ARRAIS-SILVA et al., 2006). Porém, não existem dados, até o momento, que demonstrem a ação da HBO em camundongos infectados com *Leishmania* na região do dorso.

O efeito adjuvante de HBO na ação de fármacos (nitrocompostos), o efeito positivo no tratamento de infecções por bactérias e fungos, a observação de poucos efeitos tóxicos em pacientes, animais e células, a ação leishmanicida *in vitro* e *in vivo* e a susceptibilidade da *Leishmania* a ROI, são os principais fatores que sugerem uma atividade terapêutica de HBO nessa parasitose.

## **OBJETIVOS**

O **objetivo geral** deste trabalho foi avaliar o efeito de drogas utilizadas na clínica (Glucantime, Anfotericina B e Miltefosine), imunostimuladores e própolis nos modelos *in vitro* e *in vivo* da leishmaniose sob diferentes condições de oxigênio.

**Objetivos específicos:**

1. Avaliar se diferentes fármacos (Glucantime, Anfotericina B e Miltefosine) e imunostimuladores (*P. acnes* e Poly IC) agem diferentemente em macrófagos infectados com *L. amazonensis* em ambiente hipóxico e normóxico;
2. Padronizar a infecção no dorso de camundongos BALB/c com *L. amazonensis*;
3. Avaliar o pré tratamento de camundongos BALB/c com extrato etanólico de própolis brasileira tipificada e a seguinte infecção com amastigotas de *L. amazonensis*;
4. Avaliar o tratamento adjuvante de camundongos com Glucantime (fármaco utilizado na clínica), *P. acnes* ou gel feito com amostra tipificada de própolis brasileira e oxigenação hiperbárica, analisando a evolução e os padrões histopatológicos da lesão;
5. Avaliar a produção de citocinas por camundongos submetidos a HBO e tratados com Glucantime e própolis.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## Lista de compostos utilizados e procedências:

Anfotericina B	Sigma <sup>1</sup>
Concanavalina A (Com A)	Sigma
Gentamicina	Sigma
Giemsa	Sigma
Glucantime	Aventis <sup>2</sup>
Hepes	Sigma
Meio RPMI 1640	Nutricell <sup>3</sup>
Miltefosina	Cayman <sup>4</sup>
Polyinosinic-Polyribocytidylic acid (Poly IC)	Sigma
Soro fetal bovino	Nutricell

<sup>1</sup> Sigma Chemical Co, St Louis, Missouri, USA.

<sup>2</sup> Sanofi-Aventis, São Paulo, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Nutricell, Campinas, São Paulo, Brasil.

<sup>4</sup> Cayman, Ann Arbor, Michigan, USA.

### **3.1- Animais**

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas com idade entre quatro e seis semanas, SPF (Specific Patogen Free), fornecidos pelo Centro Multi-Institucional de Bioterismo – CEMIB/UNICAMP foram mantidos no Isolador do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas durante o decorrer dos experimentos.

Este trabalho foi aprovado pela comissão de ética do Instituto de Biologia (CEEA - IB - UNICAMP), protocolo 1356-1, 26 de setembro de 2007.

### **3.2- Meio de Cultura**

O meio de cultura utilizado nas culturas de parasitas, macrófagos e células de linfonodos foi o RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado a 56°C durante uma hora, 20mM de bicarbonato de sódio, 10mM de tampão HEPES e 25 µg/ml de gentamicina.

### **3.3- Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais murinos**

Camundongos BALB/c foram sacrificados por deslocamento cervical. Com o auxílio de seringa estéril descartável, injetou-se 10 a 15 mL de solução salina estéril suplementada com Gentamicina no peritônio do camundongo; o abdômen do animal foi massageado cuidadosamente e a pele rebatida. Novamente introduziu-se a seringa na cavidade peritoneal do animal para a retirada do exsudato, armazenando-o em frasco imerso em banho de gelo. O número de células foi contado em câmara de Neubauer, considerando-se que 50 a 60% das células obtidas são de macrófagos (BARBIERI *et*

*al.*, 1993; AYRES *et al.*, 2007). Em placas de cultura de 24 poços (Corning, TRP), contendo lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro (Glass Técnica) previamente esterilizadas, cerca de  $5 \times 10^5$  macrófagos foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Após a adesão dos macrófagos nas lamínulas o exsudato foi retirado e adicionou-se meio RPMI 1640. A cultura foi mantida em estufa incubadora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> (COLHONE *et al.*, 2004; ARRAIS-SILVA, *et al.*, 2005a).

### 3.4 - Parasitas

O parasita *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/M2269) foi mantido no laboratório nas formas amastigota e promastigota. Os amastigotas foram mantidos em camundongos BALB/c, linhagem susceptível à infecção, sendo os camundongos infectados subcutaneamente no coxim plantar de uma das patas traseiras (GIORGIO *et al.*, 1998). Os amastigotas foram retirados de lesões desenvolvidas nas patas, através de raspagem com bisturi estéril em solução salina contendo gentamicina (25 mg/L). A suspensão obtida foi filtrada em gaze estéril para a retirada de resíduos teciduais (adaptado de CANTOS *et al.*, 1993). O número de amastigotas foi contado em câmara de Neubauer. Para a diferenciação em promastigotas, frascos de cultura com amastigotas foram mantidos em meio RPMI 1640 em estufa seca a temperatura de 26°C a 28°C.

### 3.5- Infecção das culturas de macrófagos com *Leishmania amazonensis*

As culturas de macrófagos peritoneais murinos foram infectadas com 3 amastigotas para cada macrófago e incubadas por 1 hora em estufa úmida a 5% CO<sub>2</sub> e 21% O<sub>2</sub> a 37°C. Após este período o meio de cultura foi retirado e adicionou-se meio

de cultura fresco. As culturas foram mantidas em estufa úmida a 5% CO<sub>2</sub> e 21% O<sub>2</sub> a 37°C durante 48 horas.

### 3.6 Fármacos e Imunoestimuladores

**Anfotericina B:** foi diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril e utilizado em diferentes concentrações para o tratamento de culturas de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*.

**Glucantime** (cedido pela Secretaria da Saúde da cidade de Campinas): foi diluído em meio RPMI, utilizado em diferentes concentrações para o tratamento de culturas de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* ou inoculado pela via intra-peritoneal quando utilizado no *in vivo*.

**Miltefosina:** foi dissolvida em PBS estéril e utilizado em diferentes concentrações para o tratamento de culturas de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*.

***P. acnes*** (cedido pela Dra. Ieda Maria Longo Maugéri Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo): utilizado em diferentes concentrações para o tratamento de culturas de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* ou inoculado pela via subcutânea quando utilizado no *in vivo*.

**Poly IC:** utilizado para o tratamento de culturas de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*.

### 3.7 Própolis

Foi utilizada uma amostra coletada no estado de Alagoas (AL) - Brasil, própolis vermelha (BRV) (TRUSHEVA *et al.*, 2006). Solução doada pela Dra. Maria Cristina Marcucci - Departamento de Farmácia, UNIBAN. O extrato etanólico de própolis foi preparado utilizando-se técnica modificada de Miorin *et al.* (2003). Propolis (30 g) foi cortada em pequenos pedaços e extraída utilizando-se 100mL de etanol absoluto à temperatura ambiente durante 24 horas. A solução foi filtrada com papel Whatman número 3 e armazenada em frascos de âmbar. Cada solução foi seca e o resíduo utilizado para preparar a solução estoque na concentração de 5% em etanol.

A própolis vermelha também foi utilizada para a obtenção do gel de própolis e papaína (Propaína). Os géis de própolis (Propaína) e papaína foram preparados pelo Biomédico Thiago Antonio Fedele, mestrando do Instituto Butantã, SP e doados pela Dra. Maria Cristina Marcucci - Departamento de Farmácia, UNIBAN.

### 3.8 Tratamento de culturas de macrófagos infectadas com *L. amazonensis*

As culturas de macrófagos peritoneais murinos ( $5 \times 10^5$ /mL) infectadas com amastigotas (3:1 amastigotas por célula) foram tratadas com antimonial pentavalente Glucantime (1,5 a 50  $\mu$ g/mL), Anfotericina B (0,15 a 0,54  $\mu$ g/mL), Miltefosina (1,5 a 20  $\mu$ M/mL), *P. acnes* (0,25 a 1  $\mu$ g/mL) - e Poly IC (125  $\mu$ g/mL) durante diferentes tempos.

### **3.9 O microambiente hipóxico e o cultivo das culturas de macrófagos peritoneais em hipóxia.**

Para estabelecer o ambiente hipóxico utilizou-se uma câmara incubadora modular (Billups-Rothenberg, modelo MIC 101, Del Mar, California, USA). A câmara foi lavada durante 15 minutos com uma mistura gasosa contendo 2% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e balanceada com Nitrogênio (N<sub>2</sub>) (White-Martins, Campinas, SP, Brasil). Em seguida, as mangueiras de entrada e saída de gás foram fechadas e a câmara contendo as placas de cultura foi mantida em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> atmosférico. Para aferir o grau de hipóxia dentro da câmara utilizou-se o analisador de gás com uma solução absorvente de oxigênio (Fyrite – Bacharach Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA). A concentração de O<sub>2</sub> em nossos experimentos foi de 6%. A tensão de oxigênio no meio de cultura foi de 37 mmHg para a condição de hipóxia e de 150 mmHg para normóxia conforme analisado em nosso laboratório (O<sub>2</sub> Analyzer YSI/53, Yellow Springs Instruments Inc., Yellow Springs, Ohio, USA) e descrito por Colhone *et al.* (2004). O pH do meio de cultura foi de 7,4 e não apresentou alterações significativas durante o curso dos experimentos. Assim, as células expostas à condição de 6% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>, balanceado com N<sub>2</sub> foi referida como hipóxia e a exposição a 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, balanceado com N<sub>2</sub> referida como normóxia.

Culturas controles de macrófagos foram mantidas em ambiente normóxico (estufa incubadora a 37°C, 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) durante todo o decorrer dos experimentos.

### **3.10 Avaliação *in vitro* dos efeitos de fármacos leishmanicidas e imunostimuladores em macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. amazonensis* e mantidos sob as condições de hipóxia e normóxia.**

Para a avaliação da porcentagem de infecção e do número de amastigotas por célula, lamínulas com macrófagos infectados aderidos foram lavadas em salina morna, secas, fixadas em metanol (10 min), coradas com Giemsa (10 min) e lavadas em água destilada (Sigma) (GIORGIO & BARÃO, 1998; AYRES *et al.*, 2007) e avaliadas em microscópio óptico (Nikon Biological Microscope - Eclipse E200, Nikon Inc., Melville, New York, USA).

Os resultados dos tratamentos com Glucantime e Anfotericina B foram avaliados através da média de experimentos da autora do presente trabalho e da estudante de Iniciação Científica Letícia Alvez Pinto.

Através da porcentagem de células infectadas, o valor correspondente a IC<sub>50</sub> (concentração de fármaco que diminuiu o índice de infecção em 50%) de cada fármaco pôde ser calculado. Os dados sob ambas as condições, normóxia e hipóxia, foram submetidos à análise de regressão utilizando-se o programa SigmaPlot 2001 para Windows (Systat Software, Inc. 2001, San Jose, Califórnia, USA) para se estabelecer o valor da IC<sub>50</sub>.

### **3.11 Padronização da infecção no dorso de camundongos BALB/c com formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis***

Para a padronização da infecção *in vivo* com formas amastigotas ou promastigotas de *L. amazonensis* foram utilizados camundongos BALB/c. Um dia antes da infecção, o pelo da região do dorso foi retirado com auxílio de uma tesoura e lâmina

de barbear (McELRATH, *et al.*, 1987). O dorso foi inoculado com seringa descartável de 1 mL com agulha 13 x 0,45 pela via subcutânea com 20  $\mu$ L de amastigotas ( $1 \times 10^5$ ) ou de promastigotas ( $1 \times 10^7$ ) suspensos em salina.

### **3.12 Câmara hiperbárica**

Os camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* foram expostos ao ambiente de uma câmara hiperbárica modular (Research Chamber, model HB 1300B, Sechrist Inc., Inaheim, CA – USA) que encontra-se em nosso laboratório. A câmara foi pressurizada com 100% de O<sub>2</sub> medicinal (White Martins – Campinas) durante 5 minutos, até a pressão de 2,5 ATA ser atingida. Essa pressão foi mantida 1h/ dia (ARRAIS-SILVA, 2005a; ARRAIS-SILVA *et al.*, 2006). Após uma hora de tratamento a câmara foi despressurizada durante cinco minutos, até ser retomada a pressão de 1 ATA. As temperaturas interna e externa da câmara foram medidas para confirmarmos que eram iguais (cerca de 22°C). Para isso utilizou-se o termômetro analógico TB0261 (Instrucamp, Brasil).

### **3.13 Protocolo de pré tratamento com extrato etanolico de própolis brasileira em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis***

Camundongos BALB/c ingeriram 50mg/Kg de própolis (10 $\mu$ L de solução de extrato de própolis 5% diluído em etanol) pela via intragástrica com o auxílio de uma seringa de gavagem uma vez ao dia durante 5 dias. Foram utilizados quatro camundongos para cada grupo. Como controle foram utilizados camundongos da mesma idade ingerindo 10 $\mu$ L de etanol.

### 3.14 Protocolos de tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* com diferentes compostos

Camundongos BALB/c previamente infectados na região dorsal com *L. amazonensis* foram tratados com Glucantime, *P. acnes* ou gel de amostras de própolis brasileira *in loco*.

Foram utilizados quatro a seis camundongos para cada grupo, sendo:

- Experimento Glucantime *in vivo* - grupo **controle** (inoculação de 20µL de salina intra-peritoneal uma vez ao dia durante 20 dias – os camundongos foram mantidos em normóxia durante 20 dias), grupo **controle HBO** (inoculação de 20µL de salina intra-peritoneal e tratamento em HBO 1 hora/dia/20 dias), grupo **Glucantime** (inoculação intra-peritoneal de 100mg/Kg de Glucantime por animal uma vez ao dia durante 20 dias), grupo **Glucantime HBO** (inoculação intra-peritoneal de 100mg/Kg de Glucantime por animal uma vez ao dia durante 20 dias e tratamento em HBO 1 hora/dia/20 dias) (adaptado de ARRAIS-SILVA *et al.*, 2006).
- Experimento *P. acnes in vivo* - grupo **controle** (inoculação de 20µL de salina subcutânea uma vez por semana durante três semanas), grupo **controle HBO** (inoculação de 20µL de salina subcutânea uma vez por semana durante três semanas e tratamento em HBO 1 hora/dia/20 dias), grupo ***P. acnes*** (inoculação subcutânea de 350µg de *P. acnes* por animal uma vez por semana durante três semanas), grupo ***P. acnes HBO*** (inoculação subcutânea de 350µg de *P. acnes* por animal

uma vez por semana durante três semanas e tratamento em HBO 1 hora/dia/20 dias) (adaptado de BRAGA *et al.*, 2003).

- Experimento Própolis (Propaína) *in vivo* - grupo **controle** (não tratado), grupo **controle HBO** (os camundongos foram mantidos em HBO 1 hora/dia/40 dias), grupo **papaína** (aplicação *in loco* de gel de papaína - base usada para a fabricação do gel de própolis - três vezes por dia durante 40 dias), grupo **papaína HBO** (aplicação *in loco* de gel de papaína três vezes por dia durante 40 dias e tratamento em HBO 1 hora/dia/40 dias), grupo **Propaína** (aplicação *in loco* de gel de própolis e papaína (Propaína) três vezes por dia durante 20 ou 40 dias, conforme o experimento), grupo **Propaína HBO** (aplicação *in loco* de gel de Propaína três vezes por dia durante 40 dias e tratamento em HBO 1 hora/dia/40 dias), grupo **Propaína e Glucantime** (aplicação *in loco* de gel de Propaína duas vezes por dia durante 20 dias e inoculação intra-peritoneal de 100mg/Kg de Glucantime por animal uma vez ao dia durante 20 dias).

### 3.15 Avaliação macroscópica das lesões

O paquímetro foi utilizado como instrumento para medida das lesões por *L. amazonensis*. Desta maneira adotou-se medir o comprimento e a largura da lesão (McELRATH, *et al.*, 1987).

### 3.16 Histopatologia

Para as análises histológicas das lesões dos animais infectados e tratados, camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. As seções do dorso foram fixadas por imersão em paraformaldeído 4% em PBS (0,1 M) por 6 horas. Os tecidos foram processados em parafina, cortados em 5  $\mu\text{m}$  de espessura e corados pelo método de Hematoxilina e Eosina (ARRAIS-SILVA *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos foram comparados ao grupo controle (tratado com salina) mantido em normóxia ou HBO e ao grupo tratado não submetido a HBO.

No caso dos experimentos com gel de própolis (gel de própolis misturado com papaína - Propaína) o controle utilizado foi o gel de papaína sem adição de própolis, além do grupo não tratado.

### 3.17 Dosagens de IFN- $\gamma$ e IL-4

O sangue foi colhido da veia braquial de camundongos BALB/c e o soro de cada grupo experimental foi analisado em triplicata. Linfonodos inguinais foram retirados dos animais e foram feitas culturas de células em meio RPMI (Nutricell) contendo 10% de soro fetal bovino e antibiótico (Gentamicina). As células ( $4 \times 10^6/\text{mL}$ ) foram colocadas em triplicata em placas de 24 “wells” e estimuladas com 2,5  $\mu\text{g}$  de Concanavalina A (Con A) (Sigma Aldrich, USA). Em seguida foram incubadas em estufa úmida a 5%  $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$  atmosférico a 37°C (PINTO *et al.*, 2003; ARRAIS-SILVA *et al.*, 2006). Os níveis de interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina 4 (IL-4) foram determinados com os “kits” para ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) Mouse IFN- $\gamma$  ELISA MAX™ Deluxe e Mouse IL-4 ELISA MAX™ Deluxe (BioLegend, San Diego, Califórnia, USA), respectivamente, conforme descrição do fabricante. A

densidade óptica foi medida em 450 nm no leitor de microplacas de ELISA Synergy HT Multi-Detector Microplate Reader (Bio-Tek, Winooski, Vermont, USA). Os valores de absorvância foram convertidos em pg/mL através do programa KC4 (Bio-Tek). As amostras foram analisadas em triplicata.

### **3.18 Análise estatística**

Os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata e repetidos no mínimo duas vezes para garantir a reprodutibilidade. As médias e desvios padrão foram comparados pelo teste *t*-Student para duas amostras independentes utilizando o programa Microcal Origin 6,0 para Windows (1999, Massachusetts, USA). Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando  $p < 0,01$ .

Os experimentos *in vivo* foram realizados com  $n \geq 4$  e repetidos no mínimo duas vezes para garantir a reprodutibilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SAS - Statistical Analysis System (SAS Institute Incorporation, Release 9.1.3, 2002-2003, Cary, North Caroline, USA) (SAS Inc., 1996). Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

# **RESULTADOS**

#### **4.1- Avaliação dos efeitos de agentes leishmanicidas e imunostimuladores em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e mantidos sob as condições de hipóxia ou normóxia.**

Alguns trabalhos experimentais mostram que baixas tensões de O<sub>2</sub> podem afetar a eficácia de fármacos antitumorais e antifúngicas (KOCH *et al.*, 2003; YUN *et al.*, 2004; SOKOL-ANDERSON *et al.* 1986). Avaliamos, então, o efeito dos fármacos Anfotericina B, Glucantime (antimoniato de meglumina) e Miltefosina e dos imunostimuladores *P. acnes* e Poly IC em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais sob condições de normóxia ou hipóxia. Os resultados obtidos são apresentados como porcentagem (%) do controle de macrófagos infectados (subitem 3.9 de Materiais e Métodos). Baseado nos gráficos de dose-resposta dos fármacos, a IC<sub>50</sub> de cada composto pôde ser determinada pela análise de regressão através do programa SigmaPlot 2001 (subitem 3.9 de Materiais e Métodos). Os resultados são expressos em microgramas por mililitro ou em micromolar da média de 2 ou mais experimentos (Tabela 1). O tratamento de culturas de macrófagos infectadas com *L. amazonensis* durante 48 horas com os diferentes fármacos e durante 24 horas com imunostimuladores em ambiente normóxico resultou em um efeito leishmanicida dose-dependente (Fig. 3 e 4). A sensibilidade aos agentes foi baseada na diminuição da porcentagem de células infectadas em relação ao controle.

As doses escolhidas para nossos experimentos foram baseadas em trabalhos de Santa-Rita *et al.* (2004), Escobar *et al.* (2002) e Callahan *et al.* (1997).

Para o estudo do efeito de baixas tensões de oxigênio na eficácia de agentes como Anfotericina B, Glucantime, miltefosina, *P. acnes* e Poly IC nós avaliamos culturas de células não tratadas ou tratadas com os fármacos e imunostimuladores e mantidas

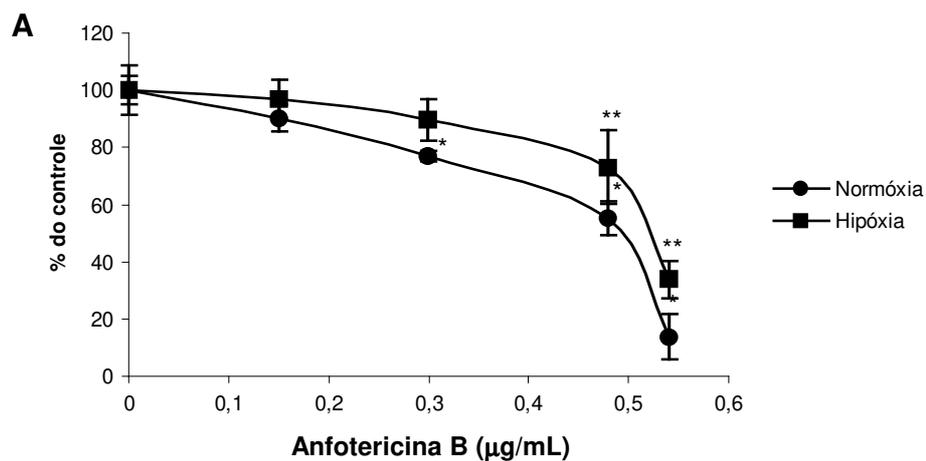
em condições hipóxicas. Os resultados apresentados nas figuras 3 e 4 e Tabela 1 mostram a IC<sub>50</sub> de Anfotericina B, Glucantime, Miltefosina e *P. acnes* em condições de normóxia e hipóxia.

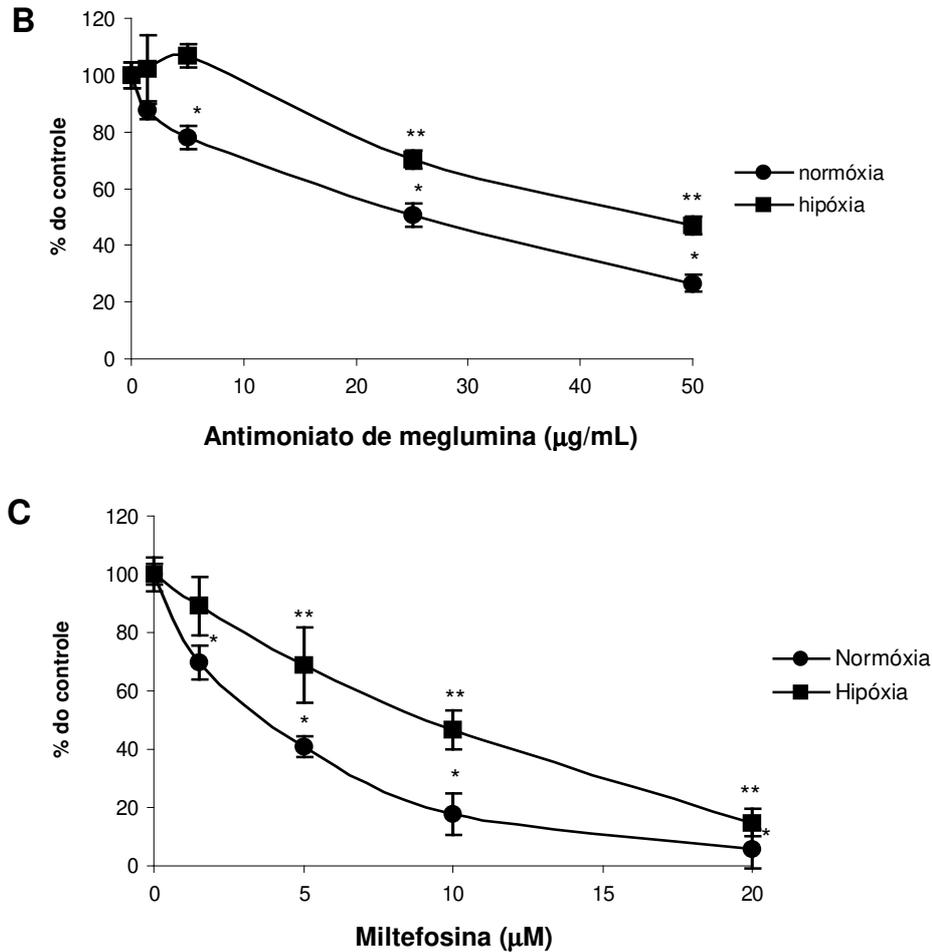
O efeito leishmanicida da Anfotericina B em condições de normóxia foi obtido com concentrações variando de 0,3 a 0,54 µg/mL. Concentrações menores que 0,3 µg/mL não apresentaram efeito leishmanicida. A Anfotericina B foi efetiva em reduzir a porcentagem de células infectadas com amastigotas de *L. amazonensis* em relação ao controle nas concentrações acima de 0,3 µg/mL em normóxia e acima de 0,48 µg/mL em hipóxia (Figura 3A), sendo capaz de reduzir cerca de 90% da infecção com a maior dose utilizada (0,54 µg/mL) em normóxia e cerca de 70% em hipóxia utilizando a mesma dose. A IC<sub>50</sub> de Anfotericina B foi de 0,5 µg/mL em condição de normóxia e 0,52 µg/mL condição de hipóxia (Tabela 1).

O tratamento de macrófagos peritoneais com Glucantime também resultou em um efeito dose dependente nas doses 1,5 µg/mL, 5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL. Em hipóxia somente concentrações maiores ou iguais a 25 µg/mL apresentaram ação leishmanicida (Fig. 3B). A maior dose de Glucantime utilizada (50 µg/mL) foi capaz de reduzir a porcentagem de células infectadas em cerca de 75% em condições normóxicas e em 55% em condições hipóxicas. A IC<sub>50</sub> calculada para Glucantime em macrófagos mantidos em hipóxia foi cerca de duas vezes maior que a IC<sub>50</sub> calculada para a cultura em normóxia, sendo 40,0 µg/mL para hipóxia e 24,6 µg/mL para normóxia (Tabela 1).

A eficácia da Miltefosina foi observada em concentrações de 1,5 a 20 µM em normóxia, apresentando efeito leishmanicida em todas as concentrações testadas nesta

condição e nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$  quando mantida em hipóxia (Fig. 3C). Desta forma, notamos que a Miltefosina foi menos ativa contra *L. amazonensis* em hipóxia do que normóxia, apresentando uma redução em cerca de 95% das células infectadas em normóxia em relação a 85% em hipóxia com a dose de 20  $\mu\text{M}$ . A  $\text{IC}_{50}$  de culturas tratadas com Miltefosina e mantidas em hipóxia, assim como ocorreu com Glucantime, apresentou um aumento de duas a três vezes quando comparado a normóxia, aumentando para 9,7  $\mu\text{M}$  quando comparada ao valor obtido em normóxia (3,47  $\mu\text{M}$ ).





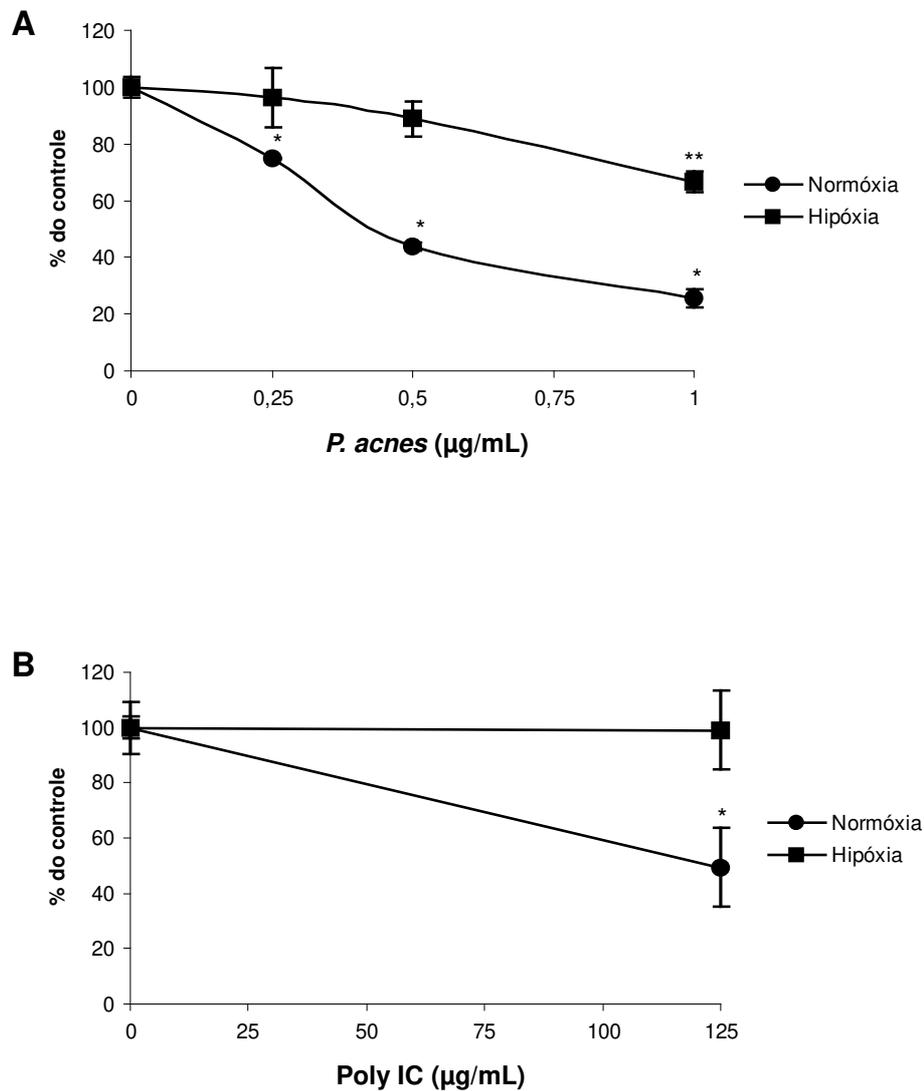
**Figura 3. Efeito leishmanicida de fármacos em macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* e mantidos sob as condições de hipóxia e normóxia.** Os macrófagos ( $0,5 \times 10^6$ /mL) foram infectados com amastigotas na proporção 3:1 (parasita: célula) por 1 hora. Após este período as culturas foram lavadas e submetidas a hipóxia ou normóxia durante 48 horas na presença de Anfotericina B (A), Glucantime (B), Miltefosina (C) ou apenas meio de cultura (concentração zero). A média dos resultados de dois experimentos representativos está representada. Comparação entre tratado vs não tratado em normóxia (\*) e hipóxia (\*\*) ( $p < 0,01$ ).

O imunoestimulador *P. acnes* também apresentou uma ação dose dependente, como observado com os outros fármacos, quando utilizado nas doses 0,25; 0,5 e 1 µg/mL em macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. amazonensis*

(redução em cerca de 15%, 55% e 75 %, respectivamente) (Fig. 4A). A hipóxia diminuiu a ação de *P. acnes* em relação a normóxia, não sendo capaz de diminuir a porcentagem de células infectadas o suficiente para que pudéssemos calcular a sua IC<sub>50</sub>.

Poly IC foi utilizado apenas na dose 125 µg/mL pelo período de 24 horas, apresentando potente ação leishmanicida (redução de cerca de 50% na porcentagem de células infectadas). Em condição de hipóxia, Poly IC não apresentou efeito leishmanicida na concentração testada (Fig. 4B). Não foi possível calcularmos a IC<sub>50</sub> para Poly IC, uma vez que só trabalhamos com uma dose do imunoestimulador (125 µg/mL).

O número de amastigotas intracelulares também diminuiu de maneira dose-dependente em normóxia, porém de forma menos intensa que a porcentagem de células infectadas. Sob condições hipóxicas, todos os fármacos e imunoestimuladores testados foram menos efetivos na redução de células infectadas e número de amastigotas por célula.



**Figura 4. Efeito leishmanicida de imunoestimuladores em macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* e mantidos sob as condições de hipóxia e normóxia.** Os macrófagos ( $0,5 \times 10^6$ /mL) foram infectados com amastigotas na proporção 3:1 (parasita: célula) por 1 hora. Após este período as culturas foram lavadas e submetidas a hipóxia ou normóxia durante 24 horas na presença de *P. acnes* (A), Poly IC (B) ou apenas meio de cultura (concentração zero). A média dos resultados de dois experimentos representativos está representada. Comparação entre tratado vs não tratado em normóxia (\*) e hipóxia (\*\*) ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 1. Sensibilidade de amastigotas de *L. amazonensis* internalizados por macrófagos peritoneais murinos aos agentes leishmanicidas em normóxia e em hipóxia.** Estão apresentados os valores de uma análise representativa das IC<sub>50</sub> dos fármacos após 48 ou 24 horas em cultura de macrófagos infectados.

	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	
	Normóxia	Hipóxia
Anfotericina B (µg/mL) <sup>b</sup>	0,5 (±0,01)	0,52 (±0,003)
Glucantime <sup>c</sup> (µg/mL) <sup>b</sup>	24,6 (±0,86)	40,0 (± 7,3)
Miltefosina (µM) <sup>b</sup>	3,47 (±0,59)	9,17 (±1)
<i>P. acnes</i> (µg/mL) <sup>d</sup>	0,42 (± 0,01)	— <sup>e</sup>

<sup>a</sup> ensaio descrito no subitem 3.9 de Materiais e Métodos.

<sup>b</sup> Cultura de macrófagos infectada com *L. amazonensis* mantida durante 48 horas.

<sup>c</sup> valores de antimoniato de meglumina.

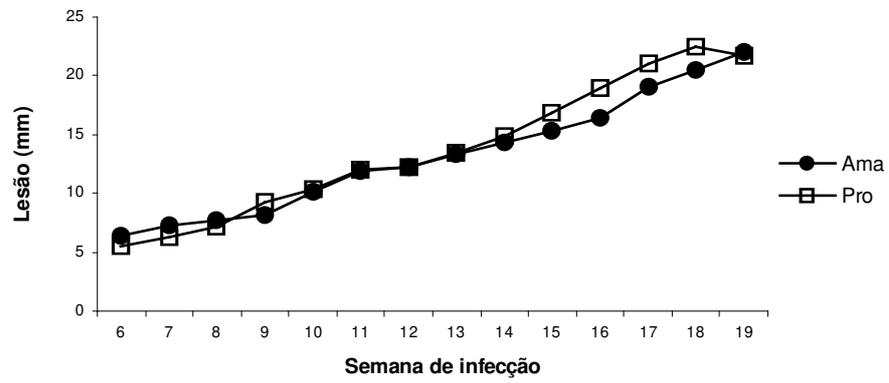
<sup>d</sup> Cultura de macrófagos infectada com *L. amazonensis* mantida durante 24 horas.

<sup>e</sup> não foi possível calcular a IC<sub>50</sub> de *P. acnes* em hipóxia.

Todos os resultados são diferentes estatisticamente (p<0,01).

#### **4.2 Padronização da lesão induzida por *L. amazonensis* no dorso de camundongos BALB/c**

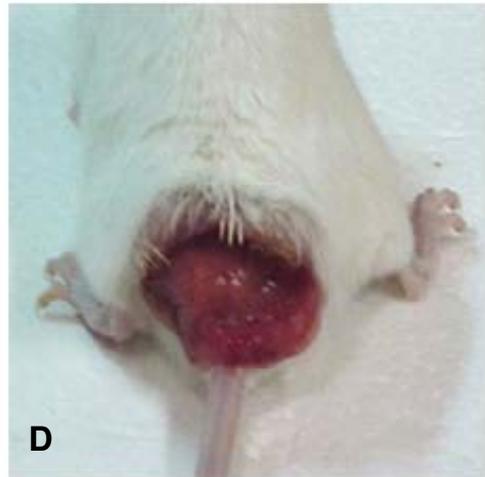
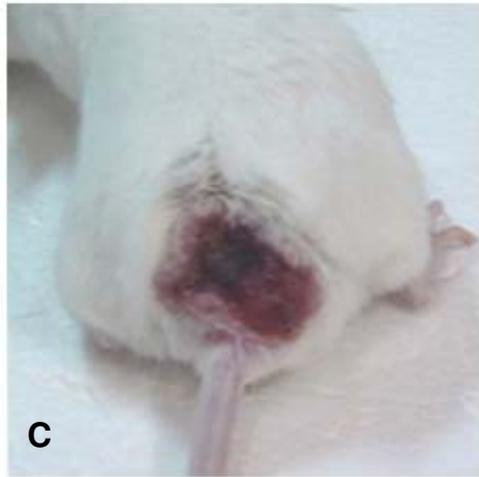
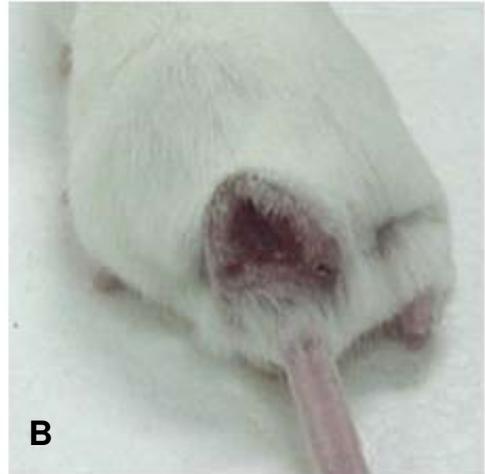
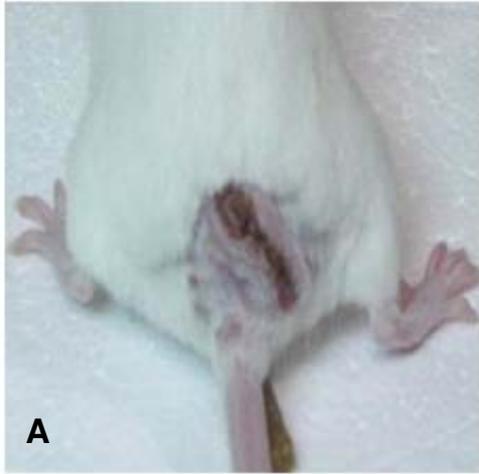
Com o objetivo de se estabelecer um protocolo de infecção no dorso de camundongos em nosso laboratório, analisamos a progressão da lesão de camundongos BALB/c infectados com  $1 \times 10^5$  amastigotas ou  $1 \times 10^7$  promastigotas de *L. amazonensis*. O dorso começou a ser medido a partir da data em que a lesão começou a aparecer (sexta semana após a infecção). Observamos que houve um aumento da lesão em ambos os grupos analisados, não havendo diferença significativa na progressão das lesões induzidas por amastigotas ou promastigotas (Fig. 5 e 6). A partir da 14<sup>a</sup> semana de infecção começou a ser observado um maior desenvolvimento em lesões causadas por promastigotas (Fig. 6 C, D), porém na 18<sup>a</sup> semana a lesão entrou em fase estacionária. Na 19<sup>a</sup> semana de infecção as lesões causadas por amastigotas atingiram e se igualaram ao tamanho das lesões causadas por promastigotas. Na 17<sup>a</sup> semana de infecção a parasitose começou a se disseminar para todo o corpo do camundongo, deixando de ser estritamente cutânea e começando a atingir outras regiões do corpo e mucosas (Fig 6 E). Todos os camundongos morreram na 20<sup>a</sup> semana de infecção.



**Figura 5.** Progressão da lesão de camundongos BALB/c infectados com  $1 \times 10^5$  amastigotas (ama) ou  $1 \times 10^7$  promastigotas (pro) de *L. amazonensis*. A lesão foi medida até a morte dos camundongos.

Quando um grupo de camundongos foi tratado com gel de própolis (Propaína) juntamente com Glucantime a produção de INF- $\gamma$  foi para cerca de 0,03 ng/mL; uma produção significativamente menor que o grupo controle.

Em culturas de linfonodo e soro de camundongos BALB/c sadios ou infectados com *L. amazonensis* e tratados com Glucantime, HBO, Glucantime e HBO, Propaína ou Propaína e Glucantime não foi detectada a produção de IL-4.



**Figura 6. Camundongo BALB/c infectado *L. amazonensis*.** (A) Infectado com  $1 \times 10^5$  amastigotas - 10ª semana de infecção, (B) infectado com  $1 \times 10^7$  promastigotas - 10ª semana de infecção, (C) infectado com  $1 \times 10^5$  amastigotas - 16ª semana de infecção, (D) infectado com  $1 \times 10^7$  promastigotas - 16ª semana de infecção, (E) 18ª semana de infecção - lesão cutânea evoluiu para uma lesão mucocutânea e difusa.

#### **4.3 Avaliação do pré-tratamento de camundongos BALB/c com extrato etanólico de própolis brasileira tipificada**

Utilizando o modelo de infecção com amastigotas de *L. amazonensis* no dorso de camundongos BALB/c, inicialmente testamos o pré-tratamento destes com extrato etanólico da própolis brasileira tipificada BRV (coletada em Alagoas), extrato com o qual obtivemos o melhor resultado dentre quatro testados no modelo *in vitro*, onde observamos uma diminuição de 100% das células infectadas, sem alterar sua viabilidade (AYRES *et al.*, 2007). Desta forma, nosso objetivo foi observar se a ingestão de própolis tipificada (opoterápico barato e de fácil acesso em todas as regiões do Brasil) poderia inibir ou amenizar uma futura infecção por *L. amazonensis*.

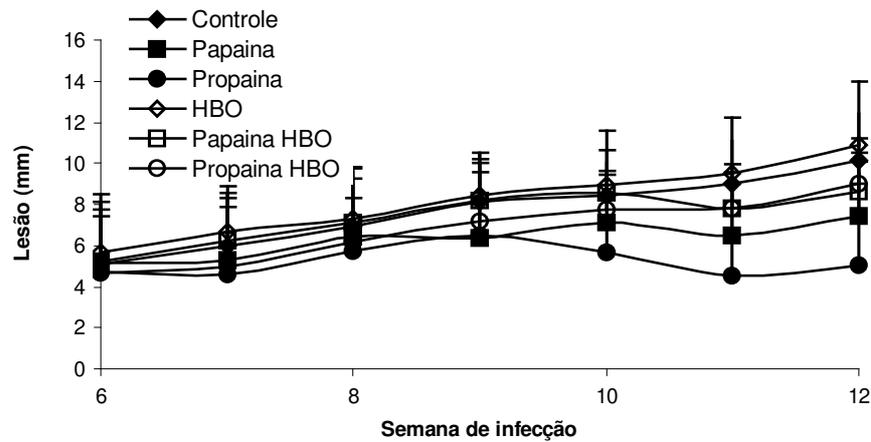
Como mostrado na figura 7, foi observada a sobrevivência dos camundongos a partir do segundo dia de tratamento com extrato etanólico de própolis BRV. Camundongos do grupo controle ingeriram 10µL de etanol/dia. O experimento foi interrompido no quinto dia, devido à mortalidade de 50% do grupo tratado.

constatada uma diminuição das lesões no coxim plantar de uma das patas traseiras quando os animais foram submetidos a um tratamento semelhante com HBO (1h/dia/20dias).

Camundongos dos grupos tratados com gel de papaína ou gel de papaína e HBO não apresentaram melhora significativa no período observado quando comparado ao grupo controle (Fig. 8).

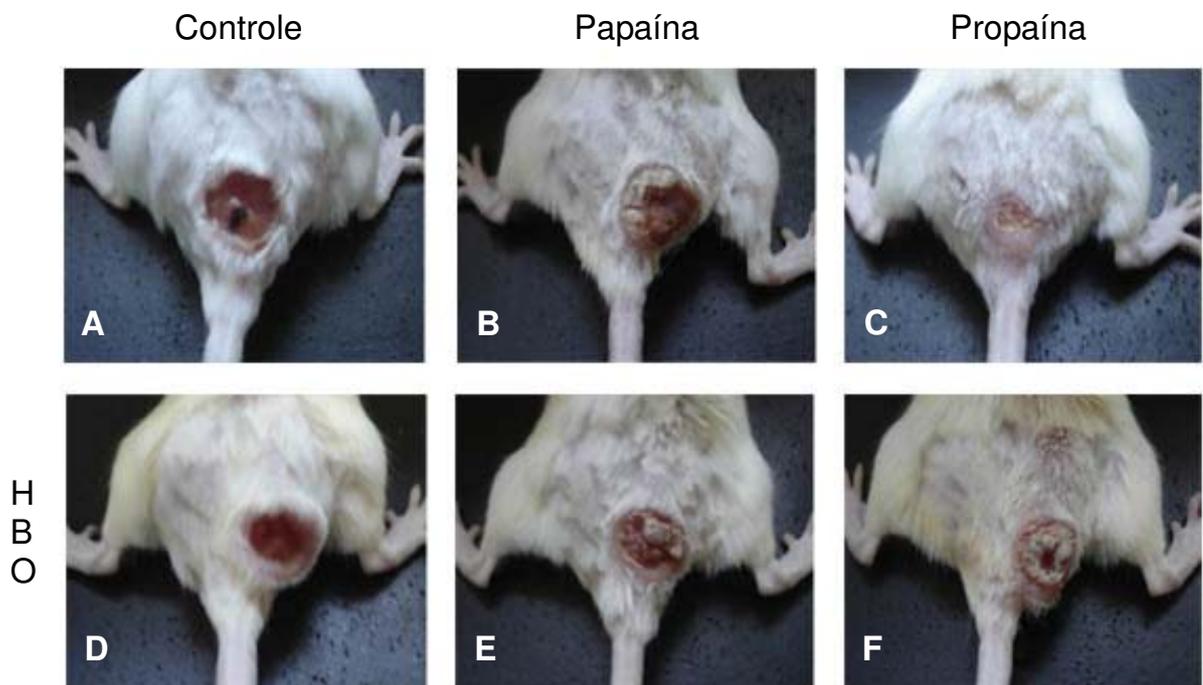
Camundongos tratados com gel de Propaína começaram a apresentar uma melhora da lesão em relação ao grupo controle apenas na quinta semana de tratamento, porém, quando analisado o tamanho das lesões, essa melhora não pode ser considerada significativa (Fig. 8). Apesar deste fato, é muito importante notar que as lesões dos grupos tratados com Propaína estavam menos exudativas (mais secas) (Fig. 9) do que as lesões dos grupos controle não tratado e tratado com papaína, desde a segunda semana de tratamento.

No grupo de camundongos tratados com Propaína e submetidos à HBO (1h/dia/40dias) não foi observado efeito de melhora (Fig. 8).

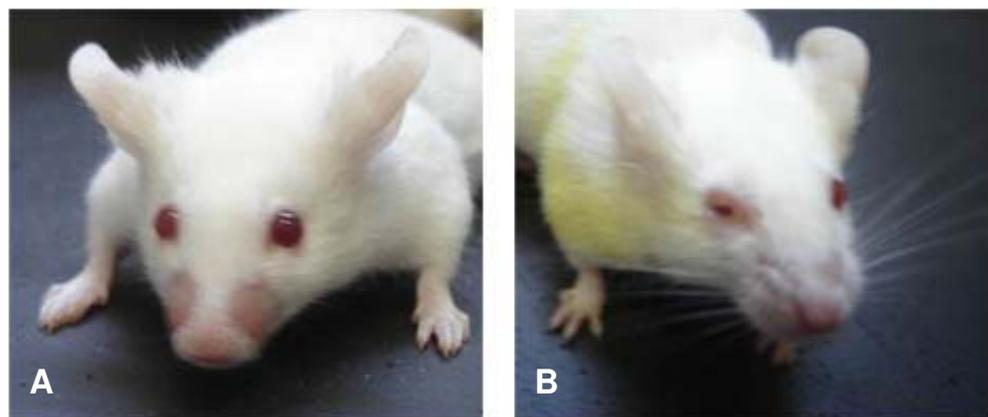


**Figura 8. Efeito do tratamento de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *L. amazonensis*.** Camundongos BALB/c (5 animais por grupo) foram infectados com  $1 \times 10^5$  amastigotas na região do dorso e foram tratados com gel de própolis e papaína (Propaína), gel de papaína e HBO. Camundongos foram tratados durante 40 dias após o aparecimento das lesões. Sexta semana = início do tratamento. Estatística:  $p < 0,05$ . Os valores representam a média do tamanho da lesão de cada grupo  $\pm$  desvio padrão.

Os camundongos dos grupos controle, HBO, tratados com papaína e propaína e HBO começaram a apresentar metástases a partir da 10ª semana de infecção. Isso foi observado pela queda de pêlos da região do focinho dos animais controle, como observado na figura 10A e pela presença de lesão ocular (Fig. 10B). Os animais do grupo de camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com Propaína não apresentaram metástases.



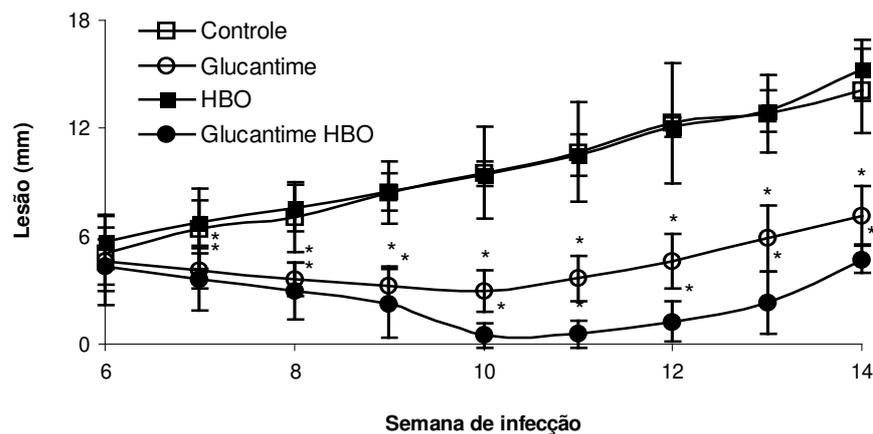
**Figura 9. Camundongos BALB/c infectados com  $1 \times 10^5$  amastigotas de *L.amazonensis*.** Camundongos controle (A), tratado com gel de papaína (B), tratado com gel de Propaína (C), tratado com HBO (D), tratado com gel de papaína e HBO (E), tratado com gel de Propaína e HBO (F).



**Figura 10. Camundongos BALB/c infectados com  $1 \times 10^5$  amastigotas de *L.amazonensis*.** Camundongos controle (A), tratado com gel de papaína (B). Camundongos desenvolveram metástases a partir da 10ª semana de infecção.

#### 4.5 Tratamento com Glucantime e HBO

O objetivo destes experimentos foi avaliar o efeito do tratamento com Glucantime e HBO no modelo de infecção no dorso de camundongos susceptíveis BALB/c com *L. amazonensis*. Os camundongos foram infectados com  $1 \times 10^5$  amastigotas na região dorsal (conforme item 3.11) e deixados em isolador por aproximadamente seis semanas até o aparecimento das lesões. Após este período, os camundongos foram tratados conforme descrito no item 3.14. Após o período de tratamento (100 mg/Kg de Glucantime via intra peritoneal durante 20 dias), observamos que houve uma diminuição das lesões em cerca de 28% quando comparada à porcentagem de crescimento das lesões de camundongos controle - tratados com salina (aumento da lesão em cerca de 68%). Houve assim, uma redução no tamanho das lesões quando os camundongos foram tratados com Glucantime por 20 dias (Fig. 11 e 12A e C).



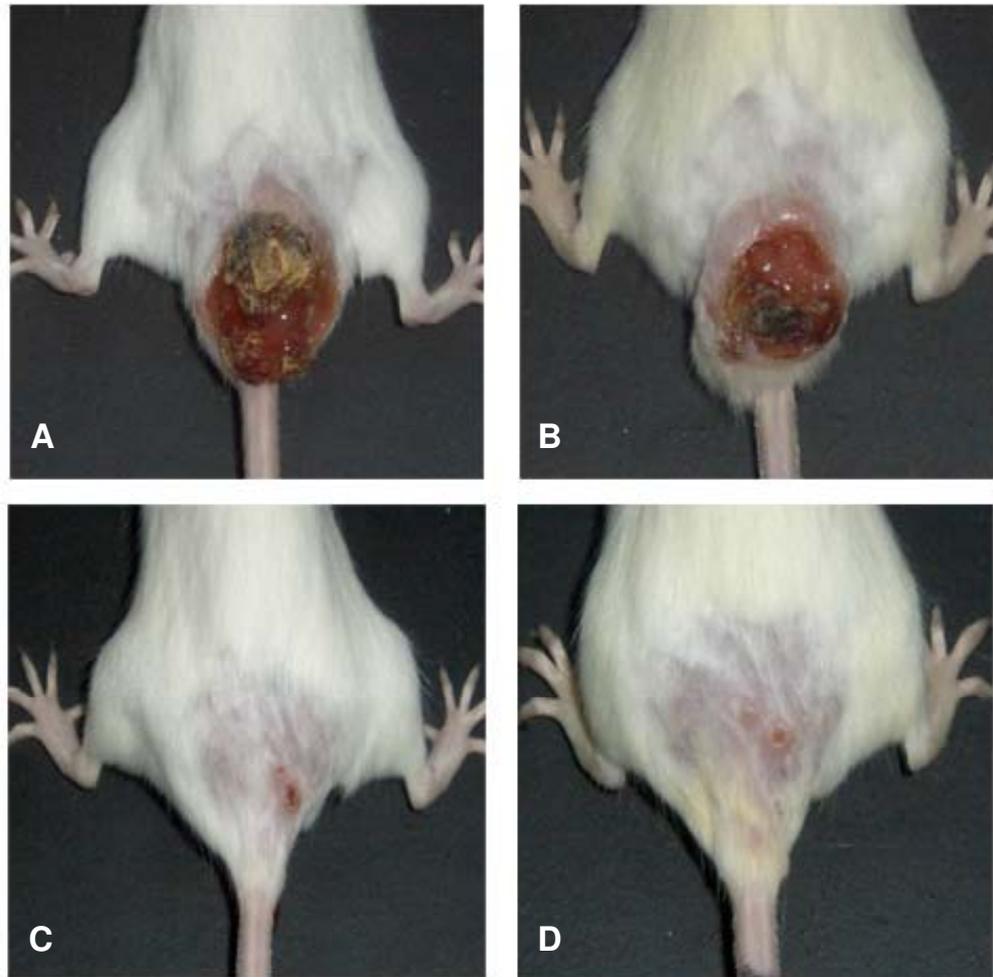
**Figura 11. Efeito dos tratamentos de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *L. amazonensis*.** Camundongos BALB/c (6 animais por grupo) foram infectados com  $1 \times 10^5$  amastigotas na região do dorso e foram tratados com Glucantime (100 mg/Kg/dia), HBO e Glucantime + HBO. Camundongos foram tratados durante 20 dias após o aparecimento das lesões. Sexta semana = início do tratamento.

Estatística:  $p < 0,05$ . Os valores representam a média do tamanho da lesão de cada grupo  $\pm$  desvio padrão em dois experimentos significativos.

Como já observado, a evolução das lesões do grupo submetido apenas à HBO se mantém igual às do grupo controle durante todo o experimento (Fig. 11).

Camundongos tratados com Glucantime (100 mg/Kg/dia) juntamente com o tratamento hiperbárico apresentaram uma redução no tamanho da lesão em cerca de 48% após o término do tratamento (9<sup>o</sup> semana de infecção), como observado na figura 11. Esse resultado é significativamente diferente dos grupos controle e HBO, porém, não foi considerado diferente quando comparado ao grupo tratado apenas com Glucantime pelo programa SAS (item 3.18).

Três semanas após o término dos tratamentos observamos que as lesões dos grupos tratados com Glucantime ou tratados com Glucantime e submetidos à HBO voltaram a apresentar crescimento (Fig. 11). A reemergência dos sintomas após o tratamento também foi observada por médicos no tratamento de pessoas apresentando leishmaniose, como relatado por Colomba *et al.* (2004).



**Figura 12. Camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.** Camundongos com 14 semanas de infecção, não tratados - controle (A), submetidos a HBO (B), tratados com Glucantime (C) e Tratados com Glucantime e submetidos a HBO (D).

#### 4.6 Tratamento com Glucantime e Propaína

Com o intuito de avaliar se Glucantime e o gel de Propaína apresentam efeito adjuvante, foram feitos experimentos utilizando os dois tratamentos simultaneamente. Isso devido ao fato de, em experimentos anteriores, termos observado a ação leishmanicida do tratamento intraperitoneal com Glucantime (100mg/Kg/dia), em que as lesões causadas por *L. amazonensis* na região do dorso tenderam a cura (Fig. 11 e 12).

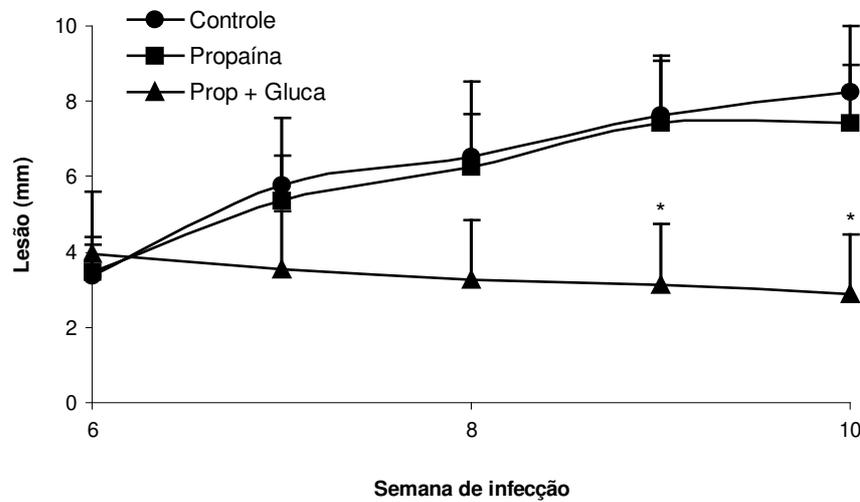
Além disso, observamos que o tratamento prolongado com gel de Propaína, apesar de não curar a lesão, parece deixá-las menos exudativas, mais secas que o grupo controle (Fig. 9C). Dessa forma, camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *L. amazonensis* na região do dorso foram tratados a partir do aparecimento das lesões (sexta semana) com apenas gel de Propaína ou gel de Propaína e Glucantime, como descrito no item 3.14.

Assim como foi observado nos experimentos anteriores (Fig. 8), camundongos tratados com gel de Propaína durante 20 dias não apresentaram diferença no desenvolvimento da lesão em relação ao grupo sem tratamento (Fig.8 e 13).

Camundongos tratados com gel de Propaína (*in loco*) juntamente com Glucantime (100 mg/Kg/dia) pelo período de 20 dias apresentaram uma melhora significativa das lesões em relação aos grupos controle (não tratado) e tratado apenas com Propaína, como podemos observar na tabela 2 e figura 13. Entretanto, quando comparamos este grupo (tratado com Propaína e Glucantime) ao grupo tratado apenas com Glucantime (item 4.5), notamos que, em relação ao parâmetro analisado (tamanho da lesão), não há diferença significativa entre esses grupos (Glucantime - redução 28%, Fig. 11; Propaína e Glucantime - redução de 26,5% no tamanho da lesão) após 20 dias de tratamento.

**Tabela 2. Efeito do tratamento de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *L. amazonensis*.** Camundongos BALB/c (4 animais por grupo) foram infectados com  $1 \times 10^5$  amastigotas na região do dorso e foram tratados com Propaína (2 vezes ao dia) e Propaína (2 vezes ao dia) + Glucantime (100 mg/Kg/dia). Camundongos foram tratados durante 20 dias após o aparecimento das lesões. Sexta semana = início do tratamento. Os valores representam medidas individuais (mm) das lesões dos camundongos de cada grupo.

	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana
Controle 1	2,3	5,25	4,95	5,55
Controle 2	2,7	5,3	6,45	7,55
Controle 3	4,15	5,55	7,05	7,9
Controle 4	4,35	6,95	7,6	9,45
Propaína 1	2,5	3,4	4,14	5,2
Propaína 2	3,5	3,9	4,7	7,45
Propaína 3	3,9	6	7,2	7,85
Propaína 4	4,05	8,2	9	9,2
Propaína + Glucantime 1	2,2	1,75	1,7	1,7
Propaína + Glucantime 2	3	2,9	2,35	2
Propaína + Glucantime 3	4,85	4,05	3,8	3,65
Propaína + Glucantime 4	5,75	5,4	5,25	5,2



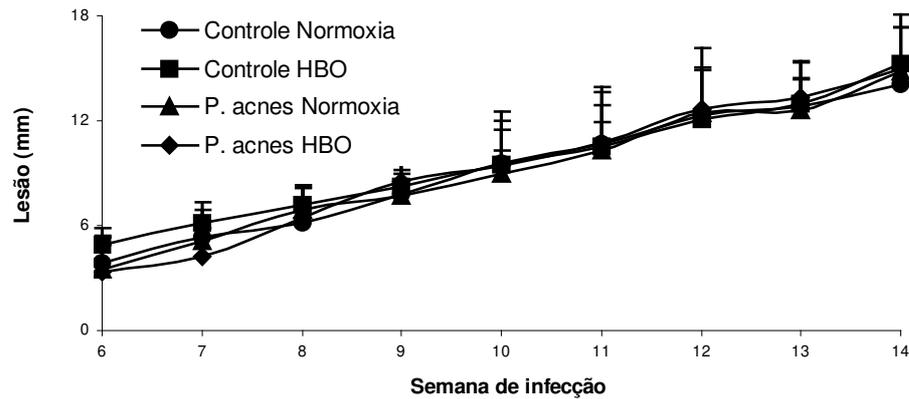
**Figura 13. Efeito do tratamento de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *L. amazonensis*.** Camundongos BALB/c (4 animais por grupo) foram infectados com  $1 \times 10^5$  amastigotas na região do dorso e foram tratados com Propaína (2 vezes dia) e Propaína (2 vezes dia) + Glucantime (100 mg/Kg/dia). Sexta semana = início do tratamento. Camundongos foram tratados durante 20 dias após o aparecimento das lesões (nona semana = final do tratamento). Estatística:  $p < 0,05$ . Os valores representam a média do tamanho da lesão de cada grupo  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.7 Tratamento com *P. acnes* e HBO

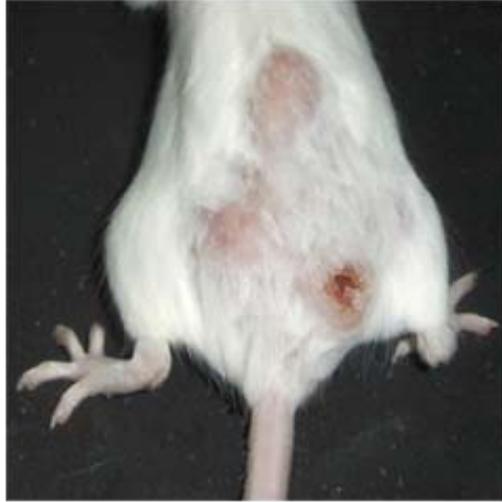
Camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *L. amazonensis* na região do dorso e tratados com *P. acnes* (350 $\mu$ g/animal/semana) conforme descrito no item 3.14 não apresentaram redução no tamanho da lesão quando comparados aos camundongos tratados com salina. Além disso, quando submetidos ao tratamento com *P. acnes*, os animais apresentaram nódulos inflamatórios por até três semanas nos locais de inoculação (Fig 15).

Como mostrado nas figuras 14 e 16, camundongos BALB/c não apresentaram melhora no quadro clínico da doença quando tratados com *P. acnes* ou *P. acnes* juntamente com HBO.

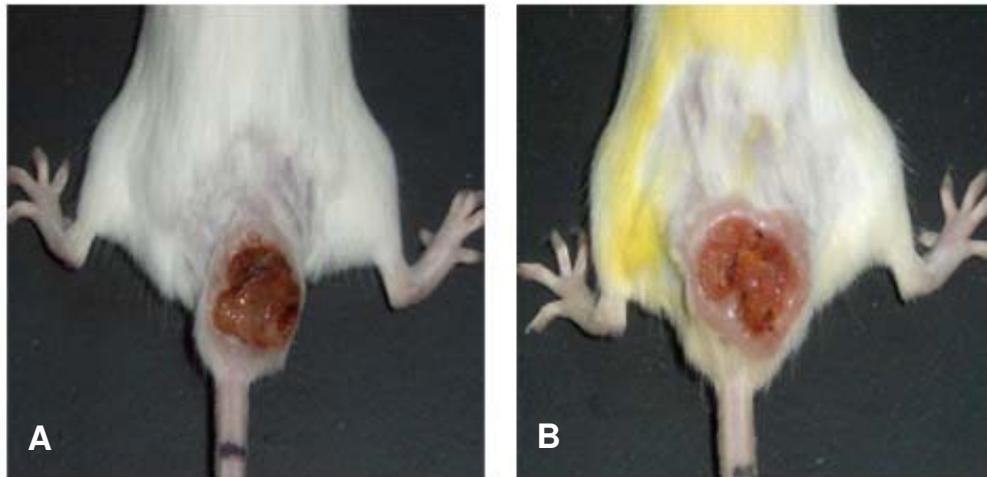
Assim como foi mostrado nos itens anteriores, a progressão da lesão dos grupos controle e submetido à HBO (1h/dia/20dias) foi semelhante, mostrando não haver melhora da lesão quando os camundongos são submetidos à HBO neste modelo (Fig. 14).



**Figura 14. Efeito do tratamento de camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *L. amazonensis*.** Camundongos BALB/c (6 animais por grupo) foram infectados com  $1 \times 10^5$  amastigotas na região do dorso e foram tratados com *P. acnes* (350  $\mu$ g/animal/semana) e HBO. Camundongos foram tratados durante três semanas após o aparecimento das lesões. Sexta semana - início do tratamento. Estatística:  $p < 0,05$ . Os valores representam a média do tamanho da lesão de cada grupo  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 15. Camundongo Balb/c infectado com *L. amazonensis* e tratado com *P. acnes*.** Camundongos apresentaram nódulos inflamatórios após tratamento com *P. acnes*. 9<sup>a</sup> semana de infecção.

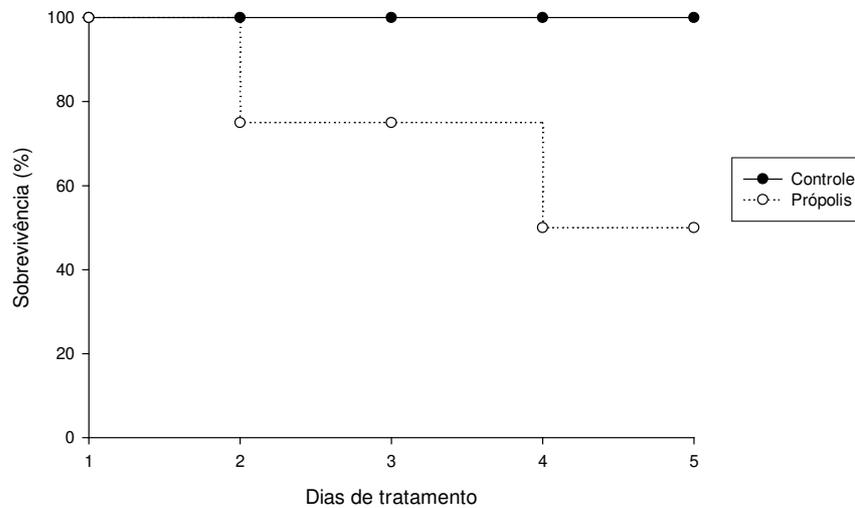


**Figura 16. Camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis*.** Camundongos com 14 semanas de infecção, não tratados - controle (A), tratados com *P. acnes* (B).

#### 4.8 Análise histopatológica

Com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento com diferentes agentes leishmanicidas no tecido do dorso de camundongos susceptíveis BALB/c com *L. amazonensis*, as seções do dorso foram retiradas e fixadas por imersão em paraformaldeído. Os tecidos foram processados em parafina, cortados e corados pelo método de Hematoxilina e Eosina.

Lesões de camundongos BALB/c infectados por nove semanas na região do dorso com amastigotas de *L. amazonensis* apresentam tecido epitelial apenas na região das bordas. Nesta região, observamos a presença de um epitélio organizado, apoiado na lâmina basal e a uma camada de tecido conjuntivo (Fig. 17A). Porém, o tecido conjuntivo, aparentemente normal, apresentou uma grande quantidade de macrófagos com grandes vacúolos parasitóforos contendo amastigotas (Fig. 17C - detalhe), além da presença de infiltrado inflamatório. Da mesma forma como descrito por McElrath *et al.* (1987), foi observada a presença de alguns eosinófilos junto a macrófagos infectados. Nestas lesões, também observamos adipócitos e tecido muscular na região subcutânea (Fig. 17 B). Na figura 17E, observamos uma região entre a borda e o centro da úlcera, onde se pode notar a desorganização do epitélio e tecido conjuntivo, com perda da lâmina basal. Como observado nas figuras 17B, D e F, no centro da úlcera, onde há ausência do tecido epitelial, encontramos áreas de necrose tecidual, seguida por um tecido conjuntivo não vascularizado e apresentando muitos macrófagos infectados com amastigotas (Fig. 17D - detalhe).

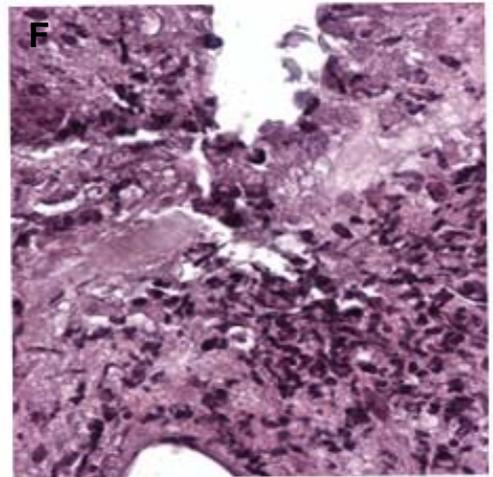
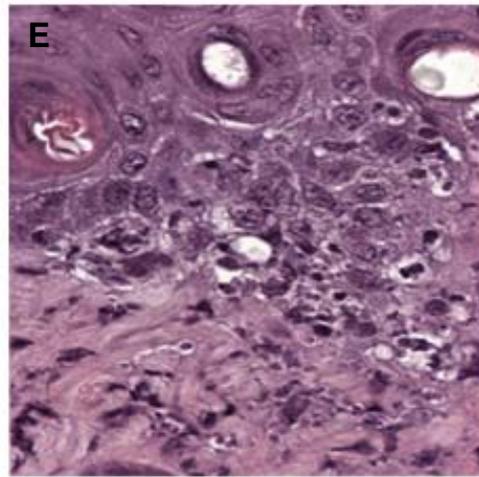
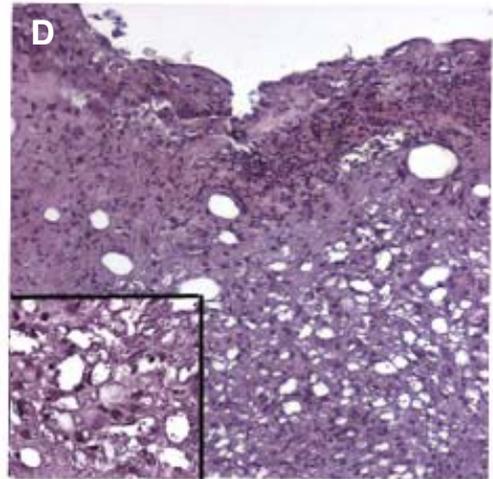
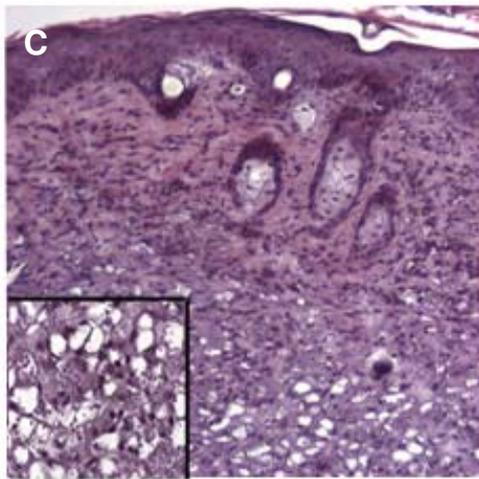
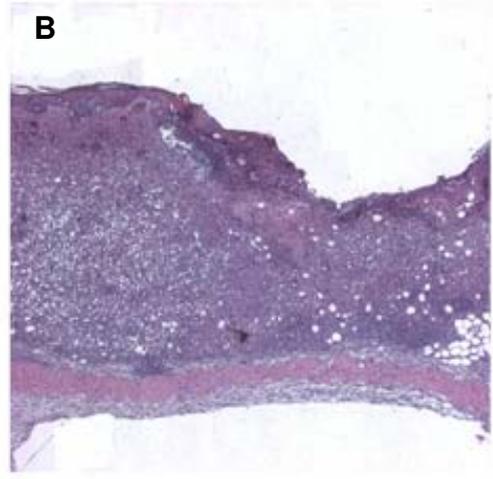
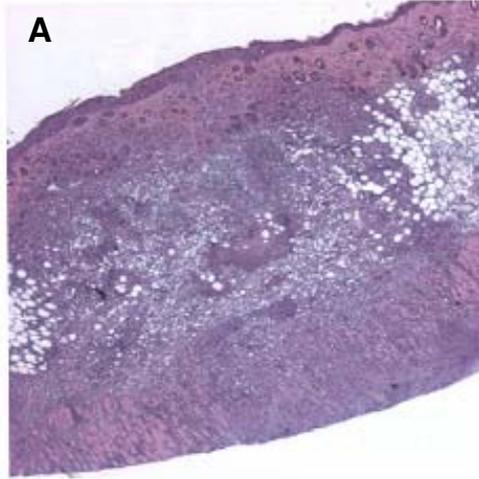


**Figura 7. Sobrevivência de camundongos BALB/c após ingestão de extrato etanólico de própolis tipificada.** Camundongos BALB/c foram pré-tratados com 50 mg/Kg/dia de extrato de própolis tipificada pela via intragástrica.

#### 4.4 Tratamento com Propaína e HBO

Nesta etapa, avaliamos o tratamento de camundongos BALB/c infectados na região do dorso com  $1 \times 10^5$  amastigotas com gel feito com própolis vermelha tipificada coletada na região de Alagoas (BRV) e papaína, o qual foi denominado Propaína. Foi utilizado também um gel de papaína como controle. Após o aparecimento das lesões, os grupos foram tratados com os géis *in loco* por seis semanas consecutivas, três vezes ao dia (como descrito no item 3.14). Alguns grupos foram submetidos à HBO pelo mesmo período para observarmos se havia efeito adjuvante da HBO com algum tratamento.

Em relação aos camundongos submetidos à HBO (1h/dia/40dias), observamos na figura 8, dados que indicam uma progressão igual ao grupo controle não submetido à HBO. Esse resultado é contrário ao que foi observado em nosso grupo de pesquisa por Arrais-Silva *et al.* (2006) no modelo de infecção na pata, em que foi



**Figura 17. Fotomicrografia de lesão no dorso de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.** Corte histológico da região do dorso de camundongos BALB/c tricotomizados e infectados na região do dorso com  $1 \times 10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* corados com Hematoxilina e Eosina. Camundongos com nove semanas de infecção. Região da borda da lesão, aumento de 20x (A), aumento de 100X (C) com detalhe de macrófagos apresentando amastigotas no vacúolo parasitóforo (400x) e aumento de 400x (E). Região de intersecção entre borda da lesão e região ulcerada, aumento de 20x (B), aumento de 100x (D) com detalhe de macrófagos apresentando amastigotas no vacúolo parasitóforo (400x) e aumento de 400x (F).

Na análise histológica de lesões de camundongos que foram submetidos à HBO podemos notar um tecido muito semelhante ao grupo controle (camundongos infectados com *L. amazonensis* e não submetidos a nenhum tratamento) (Fig. 17A e 18A). Apesar de não observarmos a cura da lesão (macroscopicamente) (Fig. 8) ou a reconstituição do tecido (microscopicamente) (Fig. 18), podemos notar o início de revascularização quando os camundongos são submetidos a este tratamento (Fig. 18B - detalhe). Além disso, há um aumento no número de eosinófilos presentes junto a macrófagos infectados, conforme descrito por McElrath *et. al.* (1987), além de outras regiões do tecido conjuntivo onde não encontramos macrófagos (Fig. 18D).

Quando avaliado o material histológico das lesões do grupo de camundongos tratados com Glucantime, observamos tecido mais organizado, com reestruturação do epitélio, presença de linfócitos no epitélio e tecido conjuntivo, formação de novas glândulas e poucos macrófagos (apresentando vacúolos menores que o grupo não tratado) no tecido conjuntivo, sendo que estes se encontram pouco infectados (Fig. 19C). A análise histológica desta região evidencia a cicatrização da área anteriormente ulcerada, com a presença de epitélio mais fino (início de reestruturação) alternando com áreas em que ele aparece mais espesso, indicando uma cicatrização anterior (Fig. 19B).

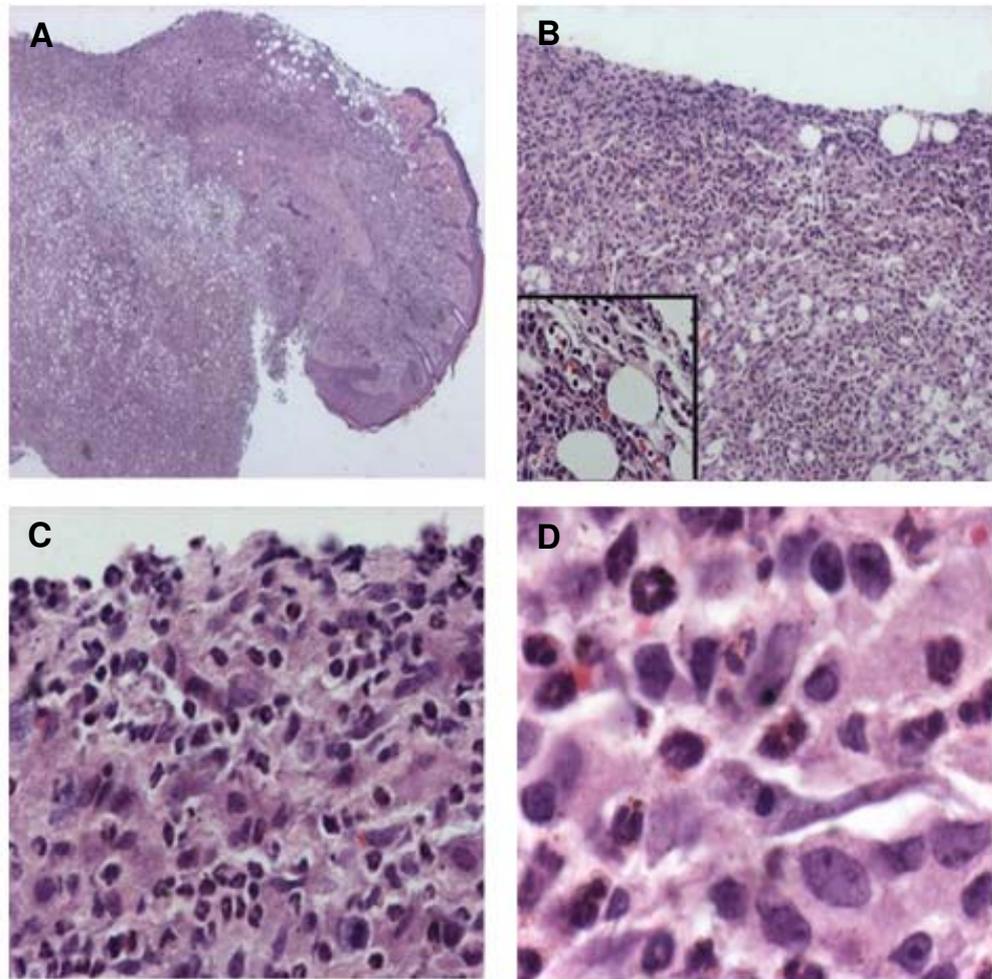
No grupo de camundongos tratados com *P. acnes*, a região do dorso onde se encontra a lesão aparece mais vascularizada (Fig. 19F) que o grupo não tratado, porém, não foi observada melhora da lesão (Fig. 14, 19E e F).

Assim como em camundongos submetidos à HBO, o dorso de camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com gel de papaína, apesar de não apresentarem uma melhora aparente nas lesões durante o tempo avaliado, demonstraram uma revascularização na região do tecido conjuntivo quando avaliado por microscopia óptica (Fig. 20B).

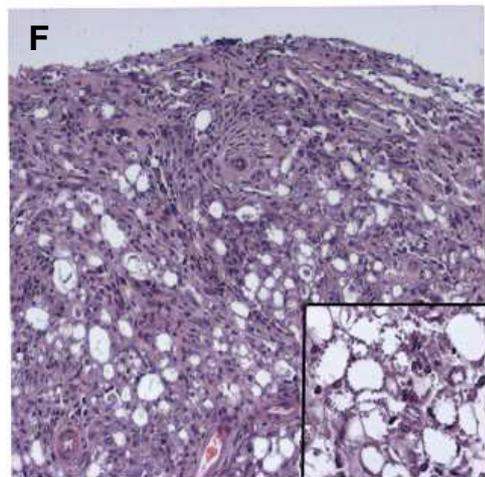
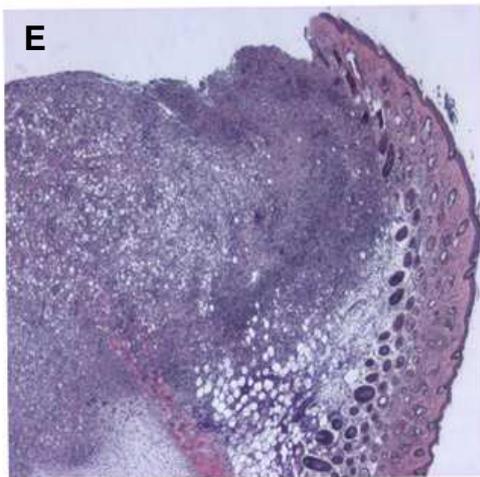
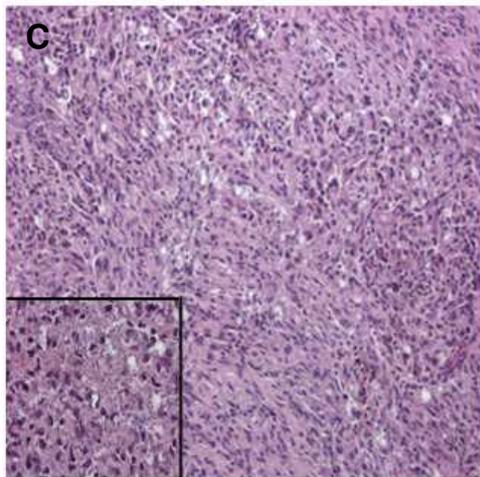
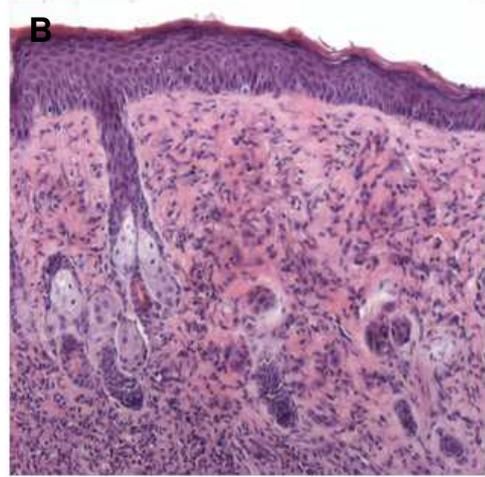
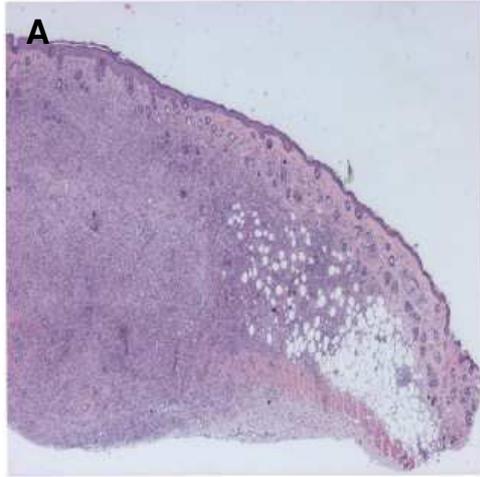
Quando analisadas as lesões do grupo tratado com Propaína (gel de própolis e papaína), assim como foi observado no tratamento com papaína, *P. acnes* ou HBO, não foi observado sinal de revascularização, porém, não houve aparente cicatrização da área ulcerada (Fig. 20C e D).

Em camundongos tratados com Glucantime juntamente com gel de Propaína, pudemos observar tecido mais organizado, com reorganização do epitélio (epitélio regularmente fino, com duas ou três camadas celulares), indicando uma cicatrização recente, poucos macrófagos no tecido conjuntivo. Alguns animais do grupo não apresentaram macrófagos infectados, como observado nas figuras 20E e F. Esses dados são um forte indicativo do efeito adjuvante do tratamento de Glucantime e Propaína, já que não foram encontrados macrófagos infectados em alguns animais do grupo, ao contrário do que foi observado anteriormente com o tratamento apenas com Glucantime (Fig. 19C - detalhe) ou com Propaína (Fig. 20C - detalhe), em que todos os animais apresentaram macrófagos infectados.

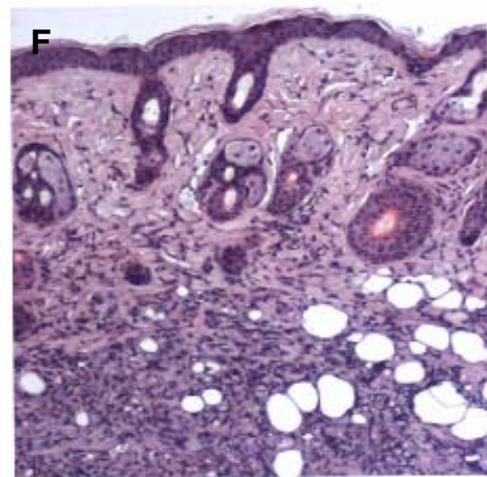
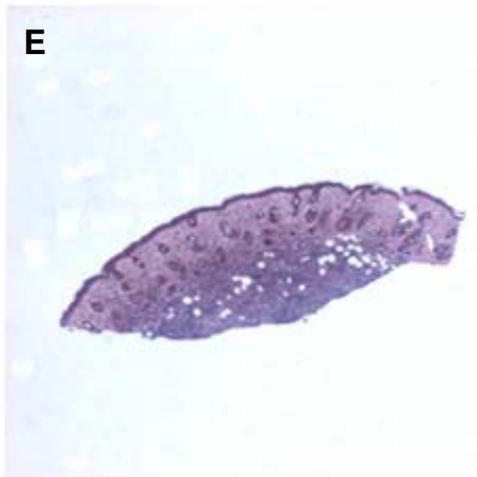
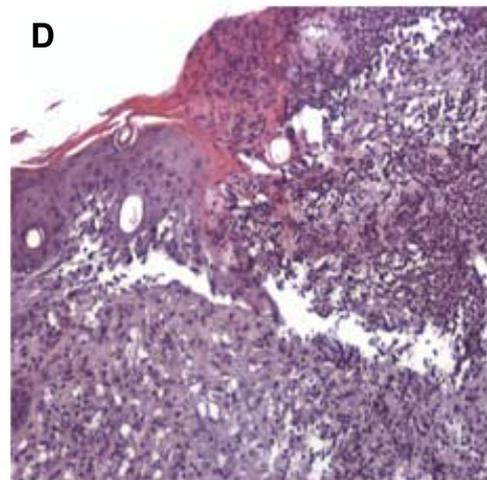
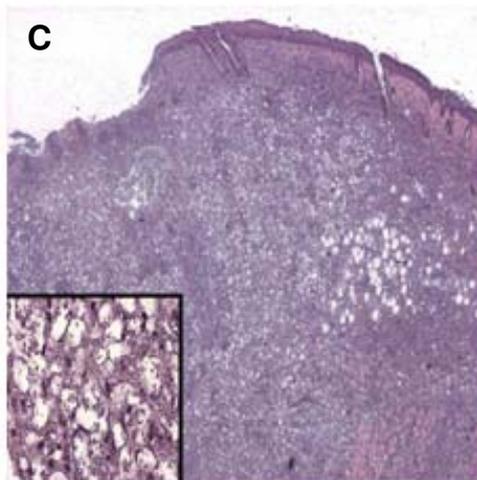
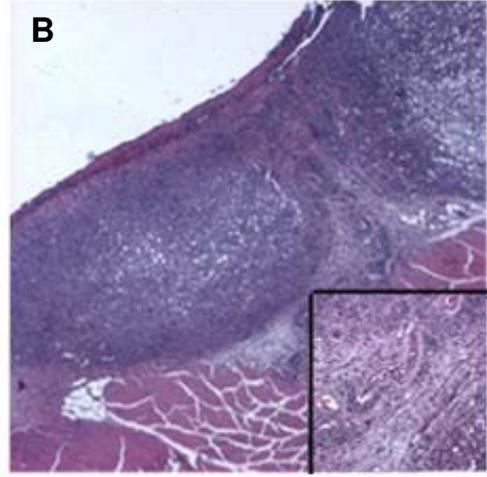
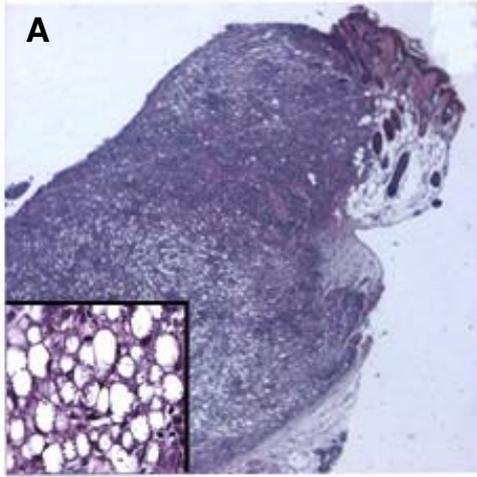
Quando os grupos tratados com Glucantime, *P. acnes*, Papaína ou Propaína foram submetidos à HBO não foi observada ação adjuvante da oxigenação hiperbárica.



**Figura 18. Fotomicrografia de lesão no dorso de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.** Corte histológico da região do dorso de camundongos BALB/c tricotomizados e infectados na região do dorso com  $1 \times 10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* e submetidos ao tratamento com HBO (1h/dia/20 dias) corados com Hematoxilina e Eosina. Camundongos com nove semanas de infecção. Região de intersecção entre borda e região ulcerada da lesão, aumento de 20x (A), região ulcerada da lesão, aumento de 100X (B) com detalhe de macrófagos apresentando amastigotas no vacúolo parasitóforo (400x), região ulcerada com grande quantidade de granulócitos, aumento de 400x (C) e aumento de 1000x mostrando a presença de eosinófilos (D).



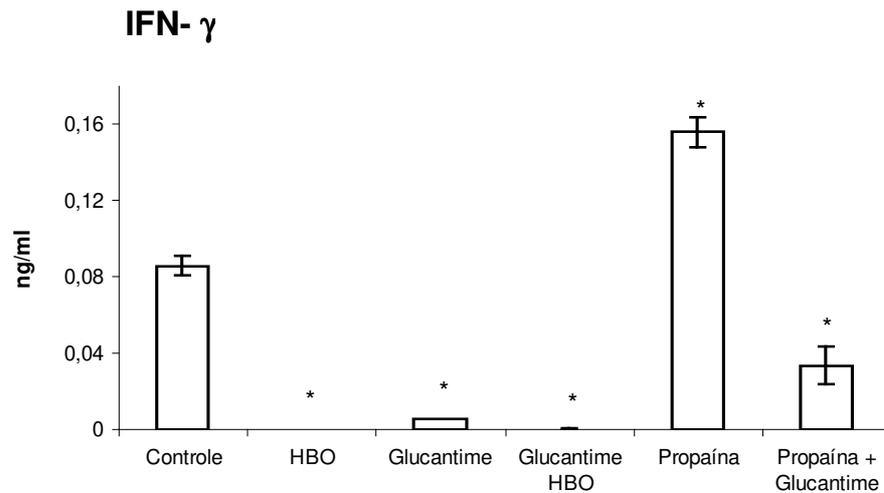
**Figura 19. Fotomicrografia de lesão no dorso de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.** Corte histológico da região do dorso de camundongos BALB/c tricotomizados e infectados na região do dorso com  $1 \times 10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* corados com Hematoxilina e Eosina. Camundongos com nove semanas de infecção. Região onde apresentava lesão em camundongos tratados com Glucantime, aumento de 20x **(A)**, aumento de 100x mostrando diferença de espessura do epitélio em algumas regiões cicatrizadas e a formação recente de glândulas **(B)**, região central da lesão, aumento de 100x **(C)** com detalhe de macrófagos apresentando amastigotas no vacúolo parasitóforo (400x) e aumento de 400x mostrando a presença de linfócitos no epitélio **(D)**. Região de intersecção entra a borda da lesão e o centro da úlcera de camundongos tratados com *P. acnes*, aumento de 20x **(E)**, aumento de 100x da região ulcerada **(F)**, com detalhe de macrófagos apresentando amastigotas no vacúolo parasitóforo (400x).



**Figura 20. Fotomicrografia de lesão no dorso de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.** Corte histológico da região do dorso de camundongos BALB/c tricotomizados e infectados na região do dorso com  $1 \times 10^5$  amastigotas de *L. amazonensis* corados com Hematoxilina e Eosina. Camundongos com nove semanas de infecção. Região de intersecção da borda da lesão com a região ulcerada de camundongos tratados com propaína, aumento de 20x **(A)**, aumento de 100X apresentando lobos na lesão **(B)** com detalhe de intersecção dos lobos contendo vasos sanguíneos. Camundongos tratados com Propaína, região de intersecção da borda da lesão com a região ulcerada, aumento de 100x **(C)**, com detalhe de macrófagos apresentando amastigotas no vacúolo parasitóforo (400x) e **(D)** região de necrose na superfície da úlcera (100x). Camundongos tratados com Glucantime juntamente com Propaína, região onde estava presente a lesão, aumento de 20x **(E)** e epitélio reconstruído, com formação de novas glândulas e folículo piloso (100x) **(F)**.

#### 4.9 Dosagem de IFN- $\gamma$ e IL-4

Outro parâmetro avaliado nos animais infectados com *L. amazonensis* e tratados com Glucantime, HBO, Glucantime e HBO e Propaína foi a produção de citocinas. Arrais-Silva *et al.* (2006) avaliaram a produção das citocinas INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 no modelo de infecção de camundongos BALB/c no coxim plantar de uma das patas traseiras. Neste trabalho foi observado que camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e não tratados apresentam cerca de 0,1 ng/mL INF- $\gamma$ . Da mesma forma, podemos notar uma produção de INF- $\gamma$  semelhante em nossos resultados. Além disso, quando Arrais-Silva *et al.* (2006) submeteram os camundongos infectados à HBO sua produção de INF- $\gamma$  dobrava. No modelo de infecção utilizado em nosso trabalho (infecção na região do dorso) observamos que não houve produção de INF- $\gamma$  por animais submetidos à HBO (Fig. 20).



**Figura 21. Produção de citocina por camundongos BALB/c infectados com *L. Amazonensis*.** Sobrenadantes de células de linfonodos inguinais de animais com nove semanas de infecção não tratados (controle), tratados com HBO, Glucantime, Glucantime + HBO, Propaína ou Propaína + Glucantime foram coletados para a análise da produção de IFN- $\gamma$  por ELISA. A média dos resultados de dois experimentos representativos  $\pm$  desvio padrão está representada. ( $p < 0,01$ ).

Na figura 21 podemos notar que apesar da lesão tender à cura (Fig. 11) quando os camundongos tratados com Glucantime, a produção de IFN- $\gamma$  por estes animais é bastante reduzida, quando comparado aos animais que não receberam tratamento (controle). Quando animais tratados com Glucantime são submetidos à HBO, não detectamos produção de IFN- $\gamma$ .

A própolis, uma resina produzida por abelhas, tem comprovada ação estimuladora do sistema imunológico (DOS SANTOS *et al.*, 2003). Quando administrada através de um gel *in loco* estimulou a produção de IFN- $\gamma$  em animais infectados com *L. amazonensis*, fazendo com que esta aumentasse de cerca de 0,09 ng/mL (grupo não tratado) para aproximadamente 0,15 ng/mL.

## **DISCUSSÃO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de fármacos utilizados na clínica (Glucantime, Anfotericina B e Miltefosine), imunoestimuladores e própolis nos modelos *in vitro* e *in vivo* da leishmaniose sob diferentes condições de oxigênio.

Nossos resultados mostraram que os fármacos e imunoestimuladores testados têm efeito semelhante sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, isto é, os tratamentos das culturas infectadas por 48 ou 24 horas, respectivamente, a 21% de O<sub>2</sub> (normóxia) na presença dos fármacos ou imunoestimuladores resultou num efeito leishmanicida dose-dependente (Fig. 3 e 4). Com base nos gráficos dose-resposta dos fármacos (Fig. 3) e imunoestimuladores (Fig. 4), a sensibilidade dos amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* foi determinada através da IC<sub>50</sub> (Tabela 1). De acordo com a FDA (*Food and Drug Administration*) a IC<sub>50</sub> representa a concentração de um agente que é requerido para se observar 50% de inibição em ensaios *in vitro*. Segundo a Tabela 1, a IC<sub>50</sub> de Anfotericina B, Glucantime, Miltefosina e *P. acnes* neste modelo foi de 0,5 µg/mL, 24,6 µg/mL, 3,47 µM, e 0,42 µg/mL respectivamente, em normóxia. Callahan *et al.* (1997) utilizando macrófagos J774 e *L. mexicana* encontrou uma IC<sub>50</sub> de 0,25 µg/mL e 29 µg/mL para Anfotericina B e Glucantime, respectivamente durante 72 horas de tratamento. Escobar *et al.* (2002), determinaram a ED<sub>50</sub> para Miltefosina, 6,83 µM, 10,63 µM e 5,82 µM para *L. mexicana*, *L. panamensis* e *L. tropica*, respectivamente em macrófagos peritoneais durante 72 horas. Já Azzouz *et al.* (2005) determinaram uma ED<sub>50</sub> de 17 µM para Miltefosina durante 72 horas de tratamento no modelo macrófago J774 e *L. donovani*. Santa-Rita *et al.* (2004) encontrou IC<sub>50</sub> de 9 µM para Miltefosina em 3 dias de tratamento de culturas de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*. Como visto, a concentração ou dose de cada fármaco onde se

observa 50% de inibição da proliferação do parasita varia bastante e depende principalmente da espécie de *Leishmania* em questão, do modelo celular de estudo utilizado e do tempo de tratamento.

Colhone *et al.* (2004) e Degrossoli *et al.* (2004) observaram uma diminuição significativa na porcentagem de células infectadas quando submetidas a hipóxia, comparado ao controle mantido em condições de normóxia. Sabe-se também que a hipóxia pode afetar a ação de quimioterápicos como a cisplatina e mitomicina C, favorecendo a sobrevivência de tumores (KOCH *et al.*, 2003). Sokol-Anderson *et al.* (1986) mostraram que a lise de protoplastos de *Candida albicans* pela Anfotericina B foi marcadamente reduzida em baixas concentrações de oxigênio. Assim, investigamos *in vitro* a eficácia de fármacos leishmanicidas atualmente empregadas no tratamento da leishmaniose além de alguns imunoestimuladores sob condições de hipóxia e normóxia, isto é, se há um impacto da hipóxia na eficácia destes agentes. Como vimos nas figuras 3 e 4, a hipóxia diminuiu a eficácia de todos os agentes testados. Este fato foi confirmado pelas IC<sub>50</sub> encontradas sob condições de hipóxia. *P. acnes* não apresentou IC<sub>50</sub> em hipóxia, já que não foi capaz de reduzir a porcentagem de células infectadas a menos de 50%. No caso da Poly IC não observamos efeito leishmanicida em hipóxia na concentração testada.

Nosso estudo sugere que a hipóxia local, ou seja, no ambiente lesional, estaria diminuindo a eficácia de Anfotericina B, Glucantime, Miltefosina, *P.acnes* e Poly IC. Os dados apresentados (Fig. 3 e 4) demonstram que substâncias diferentes com modos de ação não relacionados apresentam o mesmo comportamento sob hipóxia. A Anfotericina B, por exemplo, pode ser incorporada em lipossomas carregadores sendo absorvida pelo sistema retículo endotelial onde o parasita reside, e é assim pouco

absorvida pelos rins, o maior órgão alvo de toxicidade da Anfotericina (RATH *et al.*, 2003). Sugere-se que o antimônio pentavalente (Glucantime) possa ser uma pró-droga, sendo convertido à forma letal trivalente dentro do amastigota intracelular, interferindo no processo de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando à depleção dos níveis de ATP intracelular (RATH *et al.*, 2003). A Miltefosina tem meia vida longa o que pode levar ao surgimento de cepas resistentes como foi já observado por Seifert *et al.* (2003) investigando a *L. donovani*. O mecanismo específico de ação da Miltefosina dentro da *Leishmania* permanece incerto (PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2006). Nossos resultados *in vivo*, levam-nos a sugerir que devem existir mecanismos que conferem resistência aos parasitas sob condição de hipóxia. Nossos dados também podem ser analisados em relação aos de Koch *et al.* (2003), que observaram uma diminuição na eficácia da quimioterapia utilizada (mitonicina C, cisplatina, oxaliplatina, carboplatina, entre outras) em diversas células tumorais sob condições hipóxicas. Os autores sugerem que enzimas detoxificadoras dos fármacos estão alteradas em células em hipóxia, o que resulta em mecanismos de resistência aos fármacos sob condições de hipóxia. Além disso, Kinoshita *et al.* (2001) descrevem que células cancerígenas podem obter resistência a apoptose uma vez submetidas a hipóxia. Outras pesquisas sugerem que células tumorais adquirem características antiapoptóticas e são selecionadas pela hipóxia (KIM *et al.*, 1997). No caso de Anfotericina B, Glucantime, Miltefosina, *P. acnes* e Poly IC, podemos sugerir também que alterações na entrada dos fármacos nos macrófagos ou no metabolismo do parasita ou do macrófago estão envolvidos na menor atividade leishmanicida observada em hipóxia.

O objetivo seguinte deste trabalho foi padronizar a infecção no dorso de camundongos BALB/c com *L. amazonensis* com o intuito de avaliar o pré-tratamento ou tratamento destes camundongos com extrato etanólico de própolis brasileira tipificada, HBO, Glucantime, *P. acnes*, gel de Propaína e papaína.

Camundongos BALB/c são usualmente utilizados para o estudo da leishmaniose *in vivo*. Estes animais são susceptíveis à doença, apresentando uma resposta imune predominante do tipo Th2 (AWASTHI *et al.*, 2004; JI *et al.*, 2003). Os modelos empregados para o estudo da doença *in vivo* são a infecção na pata, infecção na orelha e no dorso, sendo a primeira a mais observada, provavelmente pela facilidade de infecção e manuseio do animal (ARRAIS-SILVA *et al.*, 2006). Ao avaliarmos a progressão da lesão causada por amastigotas ( $1 \times 10^5$ ) ou promastigotas ( $1 \times 10^7$ ) de *L. amazonensis* observamos o mesmo padrão de desenvolvimento. Apesar das lesões caudadas por promastigotas terem progredido um pouco mais rapidamente, decidimos utilizar a infecção com  $1 \times 10^5$  amastigotas como padrão para os nossos experimentos *in vivo*, uma vez que desta forma não é necessário fazer o cultivo de promastigotas.

Os resultados descritos neste trabalho sugerem que o modelo de infecção no dorso é mais parecido ao humano do que a infecção na pata. A lesão observada é ulcerada, assim como em humanos e a resposta ao tratamento com Glucantime, fármaco usualmente utilizado na clínica, também é semelhante.

Como primeira etapa para o teste de tratamentos alternativos para a leishmaniose, utilizamos o extrato etanólico de própolis vermelha tipificada (Alagoas), o qual demonstrou 100% de ação leishmanicida em doses iguais ou maiores que 12  $\mu\text{g/mL}$  em nossos estudos no modelo de infecção *in vitro* (AYRES *et al.*, 2007). A

própolis é considerada um produto de fácil acesso em diversas regiões do Brasil e de baixo ou nenhum custo, o que possibilita o uso por pessoas de todas as classes sociais. Além disso, a própolis já vem sendo utilizada há décadas, principalmente por pessoas que vivem em áreas rurais, regiões estas que são muitas vezes endêmicas de leishmaniose. O pré-tratamento com extrato etanólico de própolis permitiria que pessoas que vivem em regiões endêmicas de leishmaniose se tornassem imunologicamente resistentes a esta doença.

Nossos resultados, no entanto, mostraram que o extrato etanólico da própolis vermelha (Alagoas) apresentou efeito tóxico quando ingerida (50 mg/Kg/dia) por camundongos BALB/c saudáveis, levando alguns animais a óbito. Este resultado fez com que nossos estudos utilizando este protocolo fossem interrompidos. Não se sabe a razão da morte dos animais, porém, nossos estudos anteriores indicaram a toxicidade de alguns extratos etanólicos de própolis em culturas de macrófagos peritoneais infectadas com *L. amazonensis* (AYRES *et al.* 2007).

Devido à impossibilidade do uso oral do extrato de própolis, utilizamos um gel feito de própolis vermelha com base de papaína, o qual foi denominado Propaína (FEDELE, 2005), no local da lesão. Apesar do gel de Propaína utilizado em nossos experimentos não reduzir as lesões no dorso, mesmo após um tratamento prolongado (40 dias), quando comparado com o tratamento por 20 dias, porém, as lesões se tornaram menos exudativas, sugerindo que o gel contribuiu para sua cicatrização. A papaína, componente do gel de Propaína e que foi utilizada como um dos controles, apresenta ações debridante, antiinflamatória e bacteriostática, e aceleradora e modeladora do tecido de granulação e dos processos de cicatrização tecidual, reduzindo a formação de quelóides (MONETTA, 1990; MONETTA, 1998). Apesar das

ações da papaína, mostradas por Monetta (1990; 1998), não foi observada diferença entre as lesões dos grupos controle e tratado com gel de papaína quando observado macroscopicamente.

O fato de que o tratamento com gel de Propaína durante 40 dias resultou em lesões menos exudativas, apesar de não cura-las é um indicativo de que um tratamento mais prolongado poderia apresentar uma ação leishmanicida, este tratamento mais longo poderia eliminar os parasitas assim como observamos em nosso trabalho no modelo *in vitro*, em que o tratamento com o extrato etanólico da própolis tipificada BRV foi capaz de eliminar os amastigotas de *L. amazonensis* presentes nas culturas de macrófagos peritoneais (AYRES *et al.*, 2007).

A terapia HBO é clinicamente aplicada em pacientes com infecções cutâneas, fascite necrosante, gangrena gasosa, osteoradionecrose e enxerto de pele comprometido (LEACH *et al.*, 1998; CLARK & MONN, 1999). Em um trabalho anterior, demonstramos que HBO é tóxica para promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* em experimentos *in vitro* (ARRAIS-SILVA *et al.*, 2005a) e ARRAIS-SILVA *et al.* (2006) demonstraram que HBO apresenta efeito benéfico em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* no coxim plantar de uma das patas traseiras, diminuindo assim a lesão. Baseado nestes fatos, um dos objetivos deste trabalho foi investigar como o tratamento com HBO juntamente com Glucantime, *P. acnes*, gel de Propaína ou gel de papaína influenciam o desenvolvimento clínico da leishmaniose causada por *L. amazonensis* em camundongos susceptíveis BALB/c infectados na região do dorso (adaptado de BARRAL-NETTO *et al.*, 1987). Não há relatos, até o momento, de qualquer trabalho que avalie os efeitos da terapia com HBO aliada a fármacos,

imunoestimuladores e fitoterápicos no modelo de camundongos infectados na região do dorso com *L. amazonensis*.

Arrais-Silva *et al.* (2006) observaram que no modelo de infecção de camundongos BALB/c com *L. amazonensis* na pata, o tratamento hiperbárico apresentou uma melhora similar ao efeito do tratamento com Glucantime neste modelo. No entanto, nossos resultados mostraram que no modelo de infecção no dorso, a terapia HBO (1h/dia/20 dias) não apresentou resultado de melhora, sendo observada a progressão da lesão de forma semelhante ao controle não submetido à HBO.

Quando tratados com Glucantime pela via intra-peritoneal, camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* apresentaram uma melhora significativa. Serrano-Martín *et al.* (2006), observaram a progressão da lesão na pata de camundongos BALB/c infectados com diferentes cepas de *Leishmania*. Segundo seus dados, quando os camundongos são tratados com Glucantime (100 mg/kg/dia), a lesão progride mais lentamente que o grupo controle, porém, sua curva de progressão segue paralela, apresentando a mesma tendência de desenvolvimento (SERRANO-MARTÍN *et al.* 2006), assim como observado por Arrais-Silva *et al.* (2006). Esses dados sugerem que no modelo de lesão no dorso de camundongos, há uma resposta mais efetiva ao tratamento com Glucantime do que na lesão da pata, chegando a controlar a doença, como ocorre em humanos. Porém, assim como Colomba *et al.* (2004) relataram em humanos, observamos a reemergência dos sintomas algum tempo após o término do tratamento.

Assim como Arrais-Silva *et al.* (2006), nossos resultados mostraram que a combinação da terapia com HBO e Glucantime não apresentou efeito adjuvante no curso da infecção, quando comparado com o grupo de animais tratados apenas com

Glucantime. Camundongos tratados com Glucantime ou Glucantime e HBO mostraram uma diminuição semelhante no desenvolvimento da lesão, com cicatrização da área ulcerada.

A análise de nossos resultados *in vivo* através do parâmetro tamanho da lesão indica que apenas os grupos tratados com Glucantime, Glucantime e HBO ou Glucantime com Propaína apresentaram melhora da lesão. Os grupos tratados com HBO, *P. acnes*, papaína, *P. acnes* e HBO, papaína e HBO e Propaína e HBO não apresentaram melhora durante o período observado. O grupo tratado com Propaína, assim como os outros grupos citados anteriormente, não apresentou melhora quando avaliado o tamanho da lesão. Entretanto, as lesões dos camundongos do grupo Propaína pareceram menos exudativas e em alguns casos pareceram estar cicatrizando.

O processo de cicatrização tecidual é um fenômeno complexo, que envolve várias etapas, inicialmente caracterizado por processos de inflamação, seguida de estágio de fibroplasia, com a formação do tecido de granulação e por fim pela remodelagem tecidual e formação de cicatriz tecidual, que é caracterizada pela substituição do tecido lesionado por tecido conjuntivo denso vascularizado e reepitelização da área lesada (GONÇALVES & PARIZOTTO, 1998; STEVENS, 2000; ROBBINS *et al.*, 1991).

Segundo Robbins (1991), quando há uma grande perda de células e tecido, como ocorre na ulceração inflamatória, o processo de reparo é complicado. Isso porque, um tecido tissular deve ser preenchido. A regeneração das células parenquimais não consegue reconstituir completamente a arquitetura original e um

tecido de granulação abundante cresce a partir da margem para completar a cicatrização (ROBBINS, 1991).

A adequação de suprimento sangüíneo numa área de lesão é obviamente, uma influência muito importante para que ocorra a cicatrização. A vascularização do foco é um fator-chave, tanto na inflamação quanto no reparo. Uma doença que, assim como as lesões leishmanióticas, limite o fluxo de sangue e anormalidades venosas que retardem a drenagem são distúrbios que perturbam a cicatrização de feridas (adaptado de ROBBINS, 1991).

Cortes histológicos do dorso de camundongos tratados com Glucantime ou Glucantime e HBO mostraram a reestruturação do epitélio, com áreas indicando a cicatrização, presença de lâmina basal, revascularização e macrófagos menos vacuolizados no tecido conjuntivo, porém, estes permaneciam infectados (Fig. 19 C).

Grupos de animais submetidos à HBO ou tratados com *P. acnes*, papaína ou Propaína mostraram uma revascularização da região de lesão, porém, estes quatro grupos não apresentam melhora significativa nos tempos observados.

O fato de observarmos a revascularização das lesões, mesmo quando não foi observada a cura da doença, como ocorre nos grupos citados anteriormente, pode ser um indicativo de que um tratamento mais prolongado estaria contribuindo para a cicatrização da lesão, além de ajudar no transporte do fármaco para o local.

Nossos resultados com *P. acnes* estão de acordo com Colmenares *et al.* (2003), que mostraram não haver melhora da lesão por *L. amazonensis* em camundongos resistentes C57BL/6 quando infectados na pata e imunizados com *P. acnes* pela via intra-peritoneal.

O mecanismo protetor da infecção por *Leishmania* envolve a resposta do tipo Th1, com a produção de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , potentes indutores da função leishmanicida de macrófagos (SCOTT *et al.*, 2004). A susceptibilidade à infecção reflete na expansão da resposta Th2, com a produção de IL-4 e IL-10, potentes inibidores da função macrófaga (SCOTT *et al.*, 2004).

Nossos testes mostraram que camundongos BALB/ não infectados ou infectados com *L. amazonensis* não apresentam produção de IL-4, citocina envolvida na resposta do tipo Th2, indicando que talvez outra citocina envolvida nesta resposta esteja sendo produzida. Segundo Ji *et al.* (2003), a citocina que estaria mais relacionada à susceptibilidade à *L. amazonensis* é a IL-10 e não a IL-4, apesar de ambas apresentarem mínimo efeito na susceptibilidade de camundongos BALB/c infectados com este parasita (JONES *et al.*, 2000; JONES *et al.*, 2002).

INF- $\gamma$  é uma citocina sintetizada predominantemente por células “natural killer” e linfócitos T. Esta molécula participa na imunidade, na resposta inflamatória e cura de lesões. Neutrófilos, linfócitos, macrófagos e fibroblastos possuem receptores para INF- $\gamma$ . Os efeitos da HBO na produção de INF- $\gamma$  ainda não estão bem caracterizados (GRANOWITZ *et al.*, 2002). Camundongos submetidos à HBO que foram tratados ou não, não apresentaram produção de INF- $\gamma$  (Fig. 21). Granowitz *et al.* (2002) observaram a supressão da secreção de INF- $\gamma$  em humanos submetidos à HBO. A produção de INF- $\gamma$  foi observada em pequena quantidade em camundongos tratados com Glucantime. Grupos de camundongos infectados que foram tratados com gel de Propaína apresentaram uma produção de INF- $\gamma$  cerca de duas vezes maior do que o grupo controle, indicando uma ação imunoestimuladora da resposta do tipo Th1. O fato

de observarmos um grande infiltrado eosinofílico nos cortes histológicos destes animais, pode indicar um aumento de IL-5, o que sugere uma resposta do tipo Th2.

O fato dos grupos tratados com Glucantime ou Glucantime e Propaína apresentarem menor produção de INF- $\gamma$  que os grupos controle ou Propaína, respectivamente, pode ser decorrente da presença de menor quantidade de parasitas na lesão.

Baseado em nossos dados relacionados à ação do Glucantime e da Propaína separadamente que apresentam melhora em relação à lesão, quando analisada a ação conjunta dos dois agentes, esperávamos observar uma cura mais rápida da lesão. No entanto foi observada uma ação semelhante àquela com Glucantime. Além disso, como observado na figura 21, a produção de INF- $\gamma$  por esses camundongos foi significativamente menor que a produção dos camundongos tratados apenas com Propaína ou não tratados (controle) e maior do que a produção de INF- $\gamma$  por camundongos tratados apenas com Glucantime. A análise histológica, no entanto, mostrou que houve uma ação adjuvante dos dois agentes, fazendo com que além de cicatrizar a lesão, como ocorreu em camundongos tratados apenas com Glucantime, não fossem observados mais amastigotas livres ou no interior de macrófagos em alguns animais deste grupo. Para comprovar a ausência de parasitas nestes animais, uma análise por PCR, por exemplo, seria muito importante. A ausência de parasitas na região onde havia a lesão em alguns animais é um forte indicativo de que ao prolongarmos o tratamento a leishmaniose poderá ser curada e não apenas controlada, como ocorre com os tratamentos usualmente utilizados.

Nossos resultados com Anfotericina B, Glucantime e Miltefosina, *P. acnes* e Poly IC aplicados a culturas de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* e submetidos a hipóxia e de Glucantime, *P. acnes*, Propaína, papaína e HBO aplicados ao modelo de infecção da leishmaniose no dorso de camundongos são inéditos e contribuem para estudos sobre interação fármaco/parasita tanto *in vitro* como *in vivo* e para o desenvolvimento de terapias alternativas mais potentes para a leishmaniose.

## **CONCLUSÕES**

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- Sob condições normóxicas em macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, os compostos Anfotericina B, Glucantime, Miltefosina e *P. acnes* apresentam ação leishmanicida dose-dependente. A exposição das culturas de macrófagos infectados e tratados à hipóxia anulou o efeito dose-dependente de algumas doses de Anfotericina B, Glucantime, Miltefosina, *P. acnes*, além de anular o efeito de Poly IC;
- HBO não apresenta efeito leishmanicida no modelo de infecção de camundongos susceptíveis BALB/c com *L. amazonensis* na região do dorso. A análise histológica do material do dorso de camundongos infectados com *L. amazonensis* e submetidos à HBO mostrou uma organização semelhante ao tecido do grupo controle, porém, apresentando uma quantidade muito superior de vasos sanguíneos e polimorfonucleares, principalmente de eosinófilos, o que pode ser um indicativo da presença de IL-5, citocina presente na resposta imune do tipo Th2. A HBO suprimiu a produção de INF- $\gamma$  no modelo de infecção por *L. amazonensis* no dorso em relação aos grupos não submetidos a esta condição;
- O tratamento dos camundongos infectados na região do dorso com *P. acnes*, resultou na formação de nódulos inflamatórios nos locais de inoculação do imunoestimulador, além de não melhorar a lesão;
- Os tratamentos com papaína ou Propaína sozinhos ou juntamente com HBO não resultaram em redução no tamanho das lesões. Nos grupos de animais tratados com HBO, *P. acnes*, papaína e Propaína foi observada uma revascularização da região da

lesão através da análise histológica. A Propaína induz a uma menor exsudação da lesão;

- O único grupo de camundongos a apresentar uma produção de INF- $\gamma$  maior que o grupo controle foi o grupo tratado com Propaína;

- Camundongos tratados com Glucantime, Glucantime e HBO ou Glucantime e Propaína apresentam uma redução da lesão similar e significativa quando comparadas ao grupo de camundongos controle (não tratado); O único grupo de camundongos a apresentar uma produção de INF- $\gamma$  maior que o grupo controle foi o grupo tratado com Propaína;

- Camundongos tratados com Glucantime ou Glucantime e HBO apresentaram a lesão cicatrizada, porém, os macrófagos permaneceram infectados; Camundongos tratados com Glucantime apresentam menor produção de INF- $\gamma$  que controle - talvez, por haver menor número de parasitas no hospedeiro, a resposta imune do tipo Th1 diminua;

- Quando analisados histologicamente, camundongos tratados com Glucantime e Propaína, apresentaram lesões cicatrizadas e sem macrófagos infectados;

- Camundongos tratados com Glucantime e Propaína, assim como o grupo tratado apenas com Glucantime apresentaram produção de INF- $\gamma$  menor que o grupo controle;

- Ao analisarmos a produção de IL-4, esta citocina não foi observada em nenhum grupo analisado.

## **REFERÊNCIAS**

AKENDENGUE B., NGOU-MILAMA E., LAURENS A., HOCQUEMILLER R. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. **Parasite**, v. 6, p. 3-8, 1999.

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

ANANIAS R. Z., RODRIGUES E. G., BRAGA E. G., SQUAIELLA C. C., MUSSALEM J. S., LONGHINI A. L. F., TRAVASSOS L. R., LONGO-MAUGÉRI I. M. Modulatory effect of killed propionibacterium acnes and its purified soluble polysaccharide on peritoneal exudate cells from C57BL/6 mice: major nkt cell recruitment and increased cytotoxicity. **Scand. J. Immunol.**, v. 65, n. 6, p.538-48, 2007.

ARMIJOS, R.X.; WEIGEL, M.M.; CALVOPINA, M.; HIDALGO, A.; CAVALLOS, W.; CORREA, J. Safety, immunogenicity, and efficacy of na autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against new world cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 22, p. 1320-1326, 2004.

ARRAIS-SILVA, W. W.; COLHONE, M. C.; AYRES, D. C.; SOUTO, P. C. S.; GIORGIO, S. Effects of hyperbaric oxygen on *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. **Parasitol. Int.**, v. 54, p. 1-7, 2005a.

ARRAIS-SILVA, W. W.; PAFFARO, V. A. Jr; YAMADA, A. T.; GIORGIO, S. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the cutaneous lesions of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 78, n. 1, p. 49-54, 2005b.

ARRAIS-SILVA W. W., PINTO E. F., ROSSI-BERGMANN B., GIORGIO S. Hyperbaric oxygen therapy reduces the size of *Leishmania amazonensis*-induced soft tissue lesions in mice. **Acta Trop.**, v. 98, n. 2, p. 130-136, 2006.

ASHUTOSH; SUNDAR S.; GOYAL N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, n. 2, p. 143-53, 2007.

AUGUSTO, O.; LINARES, E.; GIORGIO, S. Possibles roles of nitric oxide and peroxynitrite in murine leishmaniasis. **Bras. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 853-862, 1996.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J. Med. Res.**, v. 119, n. 6, p. 238-258, 2004.

AYRES D. C., MARCUCCI M. C., GIORGIO S. Treatment methods of leishmaniasis with Brazilian propolis. Requested patent. **Brazilian National Institute for Intellectual Property**, INPI n. PI 018060007317, 01/27/2006.

AYRES D. C., MARCUCCI M. C., GIORGIO S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 2, p. 215-220, 2007.

AZZOUZ, S.; MAACHE, M.; GARCIA, R. G.; ASUNA, A. Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 96, n. 1, p. 60-65, 2005.

BAILEY M. S. & LOCKWOOD D. N.J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatol.**, v. 25, p. 203–211, 2007.

BARBIERI, C. L.; GIORGIO, S.; MERJAN, A. J.; FIGUEIREDO, E. N. Glycosphingolipid antigens of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes identified by use of a monoclonal antibody. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 5, p. 2131-2137, 1993.

BHAKUNI, V.; KULKARNI, S.; ALI, V.; SINGH, U. K.; LEVY, H. B.; MAHESHWARI, R. K. Immunochemotherapy for *Leishmania donovani* infection in golden hamsters: combinatorial action of poly ICLC plus L-arginine and sodium stibogluconate (Stibanate). **J. Interf. Cytokine Res.**, v. 19, n. 10, p. 1103-1106, 1999.

BANKOVA V. S., DE CASTRO S. L., MARCUCCI M. C. Propolis: recent advances in search on chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.

BARRAL, A.; CARVALHO, E. M.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M. Suppression of lymphocyte proliferative responses by sera from patients with American visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 35, n. 4, p. 735-742, 1986.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; McMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.

BARRAL-NETTO, M., CARDOSO, S.A., BARRAL, A. Different patterns of disease in two inbred mouse strains infected with a clone of *Leishmania mexicana amazonensis*. **Acta Trop.**, v. 44, p. 5–11, 1987.

BENEDETTI S., LAMORGESE A., PIERSANTELLI M., PAGLIARANI S., BENVENUTI F., CANESTRARI F. Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. **Clin. Biochem.**, v. 37, p. 312– 317, 2004.

BIEL, W. J.; MEINARDUS-HAGER, G.; NEUGEBAUER, D. C. & SORG, C. Differences in the onset of inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **J. Leuko. Biol.**, v. 52, p. 135-142, 1992.

BOITZ J. M. & ULLMAN B. Functional characterization of nucleoside transporter gene replacements in *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 150, n. 2, p. 300-307, 2006.

BRAGA E. G., ANANIAS R. Z., MUSSALEM J. S., SQUAIELLA C. C., LONGHINI A. L. F., MARIANO M., TRAVASSOS L. R., LONGO-MAUGÉRI I. M. Treatment with

Propionibacterium acnes modulates the late phase reaction of immediate hypersensitivity in mice. **Immunol. Let.**, v. 88, p.163-169, 2003.

BURAS J. A., HOLT D, ORLOW D, BELIKOFF B, PAVLIDES S, REENSTRA WR. Hyperbaric oxygen protects from sepsis mortality via an interleukin-10-dependent mechanism. **Crit. Care Med.**, v. 34, n. 10, p. 2624-2629, 2006.

CALLAHAN, H. L.; PORTAL, A. C.; DEVEREAUX, R.; GROGL, M. An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 4, p. 818-822, 1997.

CAMPBELL, KIMBERLY; DIAO, HONG; JI, JIAXIANG; SOONG, LYANN. DNA immunization with the gene encoding P4 nuclease of *Leishmania amazonensis* protects mice against cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, p. 6270-6278, 2003.

CANTOS, G.; BARBIERI, C. L.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A.; TRAVASSOS, L. R. Synthesis of antimony complexes of yeast mannan and mannan derivatives and their effect on *Leishmania*-infected macrophages. **Biochem. J.**, v. 289, p. 155–160, 1993.

CHAN M. M. Y., MATTIACCI J. A., HWANG H. S., SHAH A., FONG D. Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. **Biochem. Pharmacol.**, v. 60, p. 1539-1548, 2000.

CLARK, L.; MONN, R. E. hyperbaric oxygen in the treatment of life-threatening soft-tissue infections. **Respir. Care. Clin. N. Am.**, v. 5, p. 203-219, 1999.

COLHONE, M. C.; ARRAIS-SILVA, W. W.; PICOLI, C.; GIORGIO, S. Effect of hypoxia on macrophage infection by *Leishmania amazonensis*. **J. Parasitol.**, v. 90, n. 3, p. 510-515, 2004.

COLMENARES M., KIMA P. E., SAMOFF E., SOONG L., MCMAHON-PRATT D. Perforin and gamma interferon are critical CD8<sup>+</sup>T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 6, p. 3172–3182, 2003.

COLOMBA C, SCARLATA F, SALSA L, FRASCA POLARA V, TITONE L. Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. Report of two cases relapsed after specific therapy. **Infez. Med.**, v. 12, n. 2, p. 139-43, 2004.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.

CUSHNIE T. P., LAMB A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DANTAS-TORRES F. Leishmune<sup>1</sup> vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. **Vet. Parasitol.**, v. 141, p. 1–8, 2006.

DAVID J. R., STAMM L. M., BEZERRA H. S., SOUZA R. N., KILLICK-KENDRICK R., LIMA J. W. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 96, n. 6, p. 839-47, 2001.

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

DE CASTRO S. L. Propolis: Biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. **Ann Rev. Biomed. Sci.** v. 3, p. 49-83, 2001.

DEDHIA, H. V.; MA, J. Y.; VALLYATHAN, V.; DALAL, N. S.; BANKS, D.; FLINK, E. B.; BILLIE, M.; BARGER, M. W.; CASTRANOVA, V. Exposure of rats to hyperoxia: alteration of lavagate parameters and macrophage function. **J. Toxicol. Environ. Health.**, v. 40, n. 1, p. 1-13, 1993.

DEGROSSOLI, A.; COLHONE, M. C.; ARRAIS-SILVA, W. W.; GIORGIO, S. Hypoxia modulates expression of the 70-kD heat shock protein and reduces *Leishmania* infection in macrophages. **J. Biomed. Sci.**, v. 11, p. 847-854, 2004.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DESMARQUEST, P.; CHADELAT, K.; CAZALS, V. CLEMENT, A. Effect of hyperoxia on human macrophage cytokine response. **Respir. Med.**, v. 92, p. 951-960, 1998.

DOS SANTOS C. R., ARCENIO F., CARVALHO E. S., LÚCIO E. M. R. A., ARAÚJO G. L., TEIXEIRA L. A., SHARAPIN N., ROCHA L. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13, p. 71-74, 2003.

EL-ON J., SNEIER R., ELIAS E. *Leishmania major*: bacterial contamination of cutaneous lesions in experimental animals. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 28, n. 12, p. 847-851, 1992.

ESCOBAR, P., S. MATU, C. MARQUES, AND S. L. CROFT. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Trop.**, V. 81, p. 151–157. 2002.

FEDELE T. A. Avaliação da própolis associada à papaína em lesões cutâneas em ratos. Projeto de Iniciação Científica, FAPESP, Processo n. 04/15387-9, 2005.

FELDMEIERS J. J. Hyperbaric oxygen: indications and results; the hyperbaric oxygen therapy committee report. **Undersea and Hyperbaric Med. Soc.**, 2003.

FOURNET A., FERREIRA ME, ROJAS-DE-ARIAS A, TORRES-DE-ORTIZ S, FUENTES S, NAKAYAMA H, SCHININI A, HOCQUEMILLER R. *In vivo* efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 40, p. 2447-2451, 1996.

FOURNET A., MUNOZ V. Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 2, p. 1215-1237, 2002.

FREITAS S. F., SHINOHARA L., SFORCIN J.M., GUIMARÃES S. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomed.**, v. 13, p. 170-175, 2006.

GARNER, W. L.; DOWNS, J. B.; REILLEY, T. E.; FROLICHER, D.; KARGI, A.; FABRI, P. J. The effects of hyperoxia during fulminant sepsis. **Surgery.**, v. 105, n. 6, p. 747-751, 1989.

GHERSETICH, I.; MENCHINI, G.; TEOFOLI, P.; LOTTI, T. Immune response to *Leishmania* infection in human skin. **Clin. Dermatol.**, v. 17, n. 3, p. 333-338, 1999.

GILLIN, F. D.; DIAMOND, L. S. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. **Exp. Parasitol.**, v. 52, p. 9-17, 1981.

GIORGIO S.; BARÃO SC. Intracellular *Leishmania amazonensis* killing induced by the guanine nucleoside 8-bromoguanosine. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v. 40, n. 4, p. 237-240, 1998.

GONÇALVES, G.; PARIZOTTO, N. A. Fisiologia da Reparação Cutânea: Atuação da Fisioterapia. **Rev. Bras. Fisiot.**, Campinas -SP, v. 3, n.1, p.5- 13, 1998.

GONTIJO B.; CARVALHO M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 71-80, 2003.

GRANOWITZ E. V., SKULSKY E. J., BENSON R. M., WRIGHT J., GARB J. L., COHEN E. R., SMITHLINE E. C., BROWN R. B. Exposure to increased pressure or hyperbaric oxygen suppresses interferon- $\gamma$  secretion in whole blood cultures of healthy humans. **Undersea and Hyperbaric Med.**, v. 29, n. 3, p. 216-225, 2002.

GRIMALDI, G. R.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 230–250, 1993.

GRIGORYAN R.; KESHELAVA, N.; ANDERSON, C.; REYNOLDS, C. P. In vitro testing of chemosensitivity in physiological hypoxia. **Methods Mol. Med.**, v. 110, p. 87-100, 2005.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. **Adv. Parasitol.**, v. 44, p. 1-39, 1999.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 2, p. 229-243, 2001.

HERWALDT B. L. Leishmaniasis. **Lancet.**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.

HILL J. O. Modulation of the Pattern of Development of Experimental Disseminated Leishmaniasis by *Corynebacterium pareum*. **J. Leukocyte Biol.**, v. 41, p.165-169, 1987.

IVANOVSKA N. D., DIMOV V. B., PAVLOVA S., BANKOVA V. S., POPOV S. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivative. **J. Ethnopharmacol.**, v. 47, p. 43-135. 1995.

JAIN K. K. **Textbook of hyperbaric medicine**. Part 1. USA' Hogrefe and Huber Publishers, 1996.

JI J., SUN J., SOONG L. Impaired Expression of Inflammatory Cytokines and Chemokines at Early Stages of Infection with *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 8, p. 4278–4288, 2003.

JONES, D. E., M. R. ACKERMANN, U. WILLE, C. A. HUNTER, P. SCOTT. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 2151–2158, 2002.

JONES, D. E., L. U. BUXBAUM, P. SCOTT. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol.**, v. 165, p. 364–372, 2000.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 7, p. 26-31, 2000.

KILLICK-KENDRICK R., KILLICK-KENDRICK M., FOCHEUX C., DEREURE J., PUECH M. P., CADIERGUES M. C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Med. Vet. Entomol.**, v. 11, n. 2, p. 105-111, 1997.

KIM, C. Y.; TSAI, M. H.; OSMANIAN, C.; GRAEBER, T. G.; LEE, J. E.; GIFFARD, R. G.; DiPAOLO, J. A.; PEEHL, D. M.; GIACCIA, A. J. Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen conditions. **Cancer Res.**, v. 57, p. 4200-4204, 1997.

KINDALL E. P., WHELAN H. T. **Hyperbaric Medicine Practice**. Flagstaff, Best Publishing, 1999.

KINOSHITA, M.; JOHNSON, D. L.; SHATNEY, C. H.; LEE, Y. L.; MOCHIZUKI, H. Cancer cells surviving hypoxia obtain hypoxia resistance and maintain anti-apoptotic potential under reoxygenation. **Int. J. Cancer**, v. 91, p. 322-326, 2001.

KOCH, S.; MAYER, F.; HONECKER, F.; SCHITTENHELM, M.; BOKEMEYER, C. Efficacy of cytotoxic agents used in the treatment of testicular germ cell tumours under normoxic and hypoxic conditions *in vitro*. **Br. J. Cancer**, v. 89, n. 11, p. 2133-2139, 2003.

KURODA Y., HARA Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. **Mutat Res.**, v. 436, p. 69-97, 1999.

LA VAN, F.B., HUNT, T.K. Oxygen and wound healing. **Clin. Plastic Surg.**, v. 17, p. 463–472, 1990.

LEACH, R. M., REES, P. J., WILMSHURST, P. Hyperbaric oxygen therapy. **Br. Med. J.**, v. 317, p. 1140–1143, 1998.

LEWIS, J. S.; LEE, J. A.; UNDERWOOD, J. C. E.; HARRIS, A.; LEWIS, C. E. Macrophages response to hypoxia: Relevance to disease mechanisms. **J. Leukocyte Biol.**, v. 66, p. 58-68, 1999.

LINARES, E.; GIORGIO, S.; MORTARA, R. A.; SANTOS, C. X. C.; YAMADA, A. T.; AUGUSTO, O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*

revealed by protein nitration and hydroxylation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 30, n. 11, p. 1234-1242, 2001.

MACHADO G. M. C., LEON L. L., DE CASTRO S. L. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 73-77, 2007.

MARCUCCI M. C. Process to typing natural products. Requested patent. **Brazilian National Institute for Intellectual Property**, INPI n. PI 0105471-6, 12/22/2000.

MARCUCCI, M. C.; CUSTODIO, A. R.; PEREIRA, R. M. S. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola, **Apacame**, n. 90, p. 19-26, 2007.

MAHMOUD N. N.; CAROTHERS A. M.; GRUNBERGER D.; BILINSKI, R. T.; CHURCHILL M. R.; MARTUCCI C., NEWMARK H. L.; BERTAGNOLLI M. M. Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 5, p. 921-927, 2000.

MARTINEZ J., MORENO J. J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. **Biochem. Pharmacol.**, v. 59, p. 865-870, 2000.

McELRATH, M. J.; KAPLAN, G.; NUSRAT, GILLA.; COHN, Z. A. Cutaneous leishmaniasis. The defect in T cell influx in BALB/c mice. **J. Exp. Med.**, v. 165, p. 546-559, 1987.

MEDEIROS, A. C. R.; ROSELINO, A. M. F. Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. **An. Bras. Dermatol.**, v. 74, n. 4, p. 329-336, 1999.

MELBY P. C. Recent developments in leishmaniasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 15, n. 5, p. 485-490, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em < <http://portal.saude.gov.br/portal/saude> >. Acesso em: 20 julho 2007.

MIORIN PL, LEVY JUNIOR NC, CUSTODIO AR, BRETZ WA, MARCUCCI MC. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, p. 913-920, 2003.

MISHRA J., SAXENA A., SINGH S. Chemiotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Current Medic. Chem.**, v. 14, p. 1153-1169, 2007.

MONETTA L. A importância da atuação científica do enfermeiro na execução dos curativos feitos com papaína. **Rev.Bras.Enf.**, v. 9, n.3, p.83 -7, 1990.

MONETTA L. – Análise evolutiva do processo de cicatrização em Úlceras diabéticas, de pressão e venosa com uso da papaína. Dissertação de Mestrado. São Paulo: EEUSP, 1998.

MOON, R. E. & CAMPORESI, E. M. Hyperbaric oxygen therapy: from the nineteenth to the twenty-first century. **Respir. Care. Clin. N. Am.**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 1999.

MORAES, M. A.; SILVEIRA, F. T. Histopathology of the localized form of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 36, n. 5, p. 459-463, 1994.

MURAD J. M., CALVI S. A., SOARES A. M. V. C., BANKOVA V., SFORCIN J. M. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 79, p. 331–334, 2002.

MURRAY, H. W.; DELPH-ETIENNE, S. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 1, p. 288-293, 2000.

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

MUSSALEM J. S., VASCONCELOS J. R. C., SQUAIELLA C. C., ANANIAS R. Z., BRAGA E. G., RODRIGUES M. M., LONGO-MAUGÉRI I. M. Adjuvant effect of

*Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on the immunization with plasmidial DNA containing a *Trypanosoma cruzi* gene. **Microbiol. Immunol.**, v. 50, n. 4, p. 253-263, 2006.

NAGAOKA T., BANSKOTA A. H., TEZUKA Y., SAIKI I., KADOTA S. Selective antiproliferative activity of caffeic acid phenethyl ester analogues on highly liver-metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cell line. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 10, p. 3351-3359, 2002.

NATERA S., MACHUCA C., PADRÓN-NIEVES M., ROMERO A., DÍAZ E., PONTE-SUCRE A. *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. **Inter. J. Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 6, p. 637-42, 2007.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10.ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

NEWMAN D. J., CRAGG G. M., SNADER K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NOMURA M., KAJI A., MA W. Y., MIYAMOTO K. I., DONG Z. Suppression of cell transformation and induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester. **Mol. Carcinog.**, v. 31, p. 83-89, 2001.

ORSI R. O., FUNARI S. R. C., SOARES A. M. V. C., CALVI S. A., OLIVEIRA S. L., SFORCIN J. M., BANKOVA V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 6, p. 205– 219, 2000.

OTER S., KORKMAZ A., TOPAL T., OZCAN O., SADIR S., OZLER M., OGUR R., BILGIC H. Correlation between hyperbaric oxygen exposure pressures and oxidative parameters in rat lung, brain, and erythrocytes. **Clin. Biochem.**, v. 38, p. 706 – 711, 2005.

OVERATH P.; AEBISCHER T. Antigen presentation by macrophages harboring intravesicular pathog: ens. **Parasitol. Tod.**, v. 15, p. 325-332, 1999.

PAPANDREOU, I.; POWELL, A.; LIM, A. L.; DENKO, N. Cellular reaction to hypoxia: sensing and responding to an adverse environment. **Mutat. Res.**, v. 569, p. 87-100, 2005.

PEREZ-VICTORIA, F. J.; SANCHEZ-CANETE, M. P.; SEIFERT, K.; CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. **Drug Resist. Updat.**, v. 9, p. 26-39, 2006.

PESANTI, E. L. *Pneumocystis carinii*: oxygen uptake, antioxidant enzymes, and susceptibility to oxygen-mediated damage. **Infect. Immun.**, v. 44, p. 7-11, 1984.

PEYSSONNAUX, C.; DATTA, V.; CRAMER, T.; DOEDENS, A.; THEODORAKIS, E. A.; GALLO, R. L.; HUTARDO-ZIOLA, N.; NIZET, V.; JOHNSON, R. S. HIF-1 $\alpha$  expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 1806–1815, 2005.

PINTO E.F., DE MELLO CORTEZIA, M., ROSSI-BERGMANN B. Interferon-gamma-inducing oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 21, p. 3534–3541, 2003.

PONTE-SUCRE A., VICIK R., SCHULTHEIS M., SCHIRMEISTER T., MOLL H. Aziridine-2,3-Dicarboxylates, Peptidomimetic Cysteine Protease Inhibitors with Antileishmanial Activity. **Antimicrobial Agents And Chemother.**, v. 50, n. 7 p. 2439–2447, 2006.

PONTE-SUCRE A., FABER J. H., GULDER T., KAJAHN I., PEDERSEN S. E. H., SCHULTHEIS M., BRINGMANN G., MOLL H. Activities of Naphthylisoquinoline Alkaloids and Synthetic Analogs against *Leishmania major*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p.188–194, 2007.

QU, X.; YANG, M. X.; KONG, B. H.; QI, L.; LAM, Q. L.; YAN, S.; LI, P.; ZHANG, M.; LU, L. Hypoxia inhibits the migratory capacity of human monocyte-derived dendritic cells. **Immunol. Cell Biol.**, v. 83, n. 6, p. 668-673, 2005.

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

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

ROBBINS, S. L., KUMAR, V., COTRAN, R. S. **Patologia estrutural e funcional** 4ª Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991.

SAMPAIO, R. N.; MARSDEN, P. D.; LLANOS-CUENTAS, E. A. *Leishmania mexicana amazonensis* isolated from a patient with fatal mucosal leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 18, p. 273-274, 1985.

SANTA-RITA, R. M.; HENRIQUES-PONS, A.; BARBOSA, H. S.; CASTRO, S. L. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 54, n. 4, p. 704-710, 2004.

SAS Institute Incorporation. **SAS users guide: Statistics**. Release 6.12. North Caroline, Cory, 1098p. 1996.

SAWAYA A. C., PALMA A. M., CAETANO F. M., MARCUCCI M. C., DA SILVA CUNHA I. B., ARAUJO C. E., SHIMIZU, M. T. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **Analyst**, v. 129, p. 739-744, 2004.

SCOTT, P., ARTIS, D., UZONNA, J., ZAPH, C. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. **Immunol. Rev.** V. 201, p. 318–338. 2004.

SEIFERT, K., S. MATU, J. PE´REZ-VICTORIA, S. CASTANYS, F. GAMARRO, S. L. CROFT. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 22, p. 380–387, 2003.

SERRANO-MARTÍN X., PAYARES G., MENDOZA-LEÓN A. Glibenclamide, a blocker of K<sup>+</sup> ATP channels, shows antileishmanial activity in experimental murine cutaneous leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemotherapy**, v. 50, n. 12, p. 4214–4216, 2006.

SFORCIN J. M., KANENO R., FUNARI S. R. C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. **J. Venomous Animals and Toxins**, v. 8, p. 19–29, 2002.

SHELLER S., GAZDA G., PIETZ G., GABRYS J., SZUMLAS J., ECKERT L., SHANI J. The ability of ethanol extract of propolis to stimulate plaque formation in immunized mouse spleen cells. **Pharmacol. Res. Commun.**, v. 20, n.4, p. 323-328, 1988.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SINGH, S., & SIVAKUMAR R.. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **J. Infect. Chemother.**, v.10, p. 307–315, 2004.

SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. **J. Infect. Dis.**, v. 154, n. 1, p. 76-83, 1986.

STARZYK J., SCHELLER S., SZAFLARKI J., MOSKWA M., STOJKO A. Biological properties and clinical application of propolis. II. Studies on the antiprotozoan activity of ethanol extract of propolis. **Arzneimittelforschung**, v. 27, p. 1198– 1199, 1977.

STEBUT E. Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. **Exp. Dermatol.**, v. 16, p. 340–346, 2007.

STEVENS, A., LOWE, J. **Patologia**. 2.<sup>o</sup> ed, São Paulo, Manole, 2000.

SUGANUMA M., OKABE S., SUEOKA E., MATSUYAMA S., IMAI K., NAKACHI K., FUJIKI H. Green tea and cancer chemoprevention. **Mutat Res.**, v. 428, p. 339-344, 1999.

SUNDEKOTTER, C.; KUNG, M.; STUNBRINK, K.; MEINARDUS-HANGER, G.; GOEBELER, M.; BILDAU, H. & SORG, K. Resistance in mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages *in vitro* and *in vivo*. **J. immunol.**, v. 151, p. 4891-4901, 1993.

SUNDAR, S., GUPTA, L. B., MAKHARIA, M. K., SINGH, M. K., VOSS, A., ROSENKAIMER, F., ENGEL, J. & MURRAY, H. W. Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 93, p. 589–597, 1999.

TANDARA, A. A., MUSTOE, T. A. Oxygen in wound healing-more than a nutrient. **World J. Surg.**, v. 28, p. 294–300. 2004.

THAKUR, C. P.; KUMAR, A.; MITRA, G.; THAKUR, S.; THAKUR M. Pharmacovigilance in kala-azar patients with severe thrombocytopenia caused by sodium antimony gluconate & miltefosine. **Indian J. Med. Res.**, v. 126, p. 73-75, 2007.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 2, p. 133-146, 2003.

TRUSHEVA B., POPOVA M., BANKOVA V., SIMOVA S., MARCUCCI M. C., MIORIN P. L., PASIN F. R., TSVETKOVA I. Bioactive constituents of brazilian red propolis. **Evid. Based. Complement. Alternat. Med.**, v. 3, p. 249-254, 2006.

VICTORATOS, P.; YANGOU, M.; AVRAMIDIS, N.; HADJIPETROU, L. Regulation of cytokine gene expression by adjuvants in vivo. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 109, n. 3, p. 569-78 1997.

WEBB, J. R.; CAMPOS-NETO, A.; OVENDAAL, P. J.; MARTIN, T. I.; STROMBERG, E. J.; BADARO, R.; REED, S. G. human and murine immune responses to a novel

*Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family.

**Infect. Immun.**, v. 66, p. 3279-3289, 1998.

WEIGLE, K.; SARAVIA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v. 14, n. 5, p. 433-450, 1996.

WENIGER B., ROBLEDO S., ARANGO G. J., DEHARO E., ARAGÓN R., MUNÓZ V., CALLAPA J., LOBSTEIN A., ANTON R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 78, p. 193–200, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em < <http://www.who.int/leishmaniasis/> >  
Acesso em: 20 julho 2007.

YUN, A. J.; BAZAR, K. A.; LEE, P. Y. Tumors may modulate host immunity partly hypoxia-induced sympathetic bias. **Med. Hypotheses**, v. 63, p. 352-356, 2004.

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp

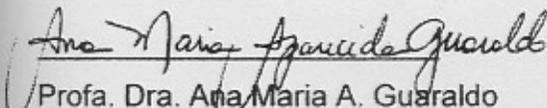
CERTIFICADO

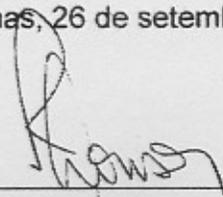
Certificamos que o Protocolo nº 1356-1, sobre "Avaliação da eficácia de diferentes compostos nos modelos *in vitro* e *in vivo* da Leishmaniose sob diferentes condições de oxigênio", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Selma Giorgio / Diana Copi Ayres, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 26 de setembro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1356-1, entitled "Efficacy of different compounds in Leishmaniasis *in vitro* and *in vivo* models under different oxygen tensions", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 26, 2007.

Campinas, 26 de setembro de 2007.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva