

MONICA MENDES KANGUSSU MARCOLINO

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE
HETEROPOLISSACARÍDEOS ÁCIDOS: NÃO SULFATADOS E NATURALMENTE
SULFATADOS**

CURITIBA

2010

MONICA MENDES KANGUSSU MARCOLINO

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE
HETEROPOLISSACARÍDEOS ÁCIDOS: NÃO SULFATADOS E NATURALMENTE
SULFATADOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção de grau de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Guilhermina Rodrigues
Noletto

CURITIBA

2010

DEDICATÓRIA

A meus pais, Claudia e Tadeu, pela educação,
incentivo, amor e doação a mim e meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu lindo, Elio Eduardo Ferrari Marcolino, por estar sempre comigo, me dando carinho, amor e suporte, principalmente emocional, para me manter firme em meus objetivos profissionais e em nossos objetivos como casal. As dificuldades tornam-se diversão com você ao meu lado. Obrigada!

À minha mãe científica, Ana Maria Kelmer Bracht, e aos professores, alunos e técnicos do Laboratório de Metabolismo Hepático (UEM), por me acolher aos meus 17 anos, me incentivar, me aconselhar em diversas decisões e me iniciar no mundo mágico da ciência.

Aos meus irmãos, Tadeu e André, por fazerem parte do meu alicerce e por torcerem sempre por mim, assim como eu torço por eles.

À toda minha família e amigos pelo carinho e momentos de descontração.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Guilhermina Rodrigues Noletto, por me ensinar a dar os primeiros passos no que significa realmente fazer pesquisa.

Aos professores Dr. Miguel Daniel Nosedo e Dr^a. Maria Eugênia Duarte Nosedo pela cessão dos polissacarídeos Go3, Iota-Gy e EHW-I para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Iacomini pela cessão do polissacarídeo ARAGAL para a realização deste trabalho.

À Deise Portarolli, do CEMEPAR, por fornecer o glucantime para realização deste trabalho.

À Prof^a. Silvia Maria S. Correia Cadena pela leitura e contribuição para este trabalho, além do suporte para os experimentos de atividade captadora de ânion superóxido.

À Marianna Maia Taulois do Rosário, ou melhor, Nana, por todos os dias, semanas e meses que passamos juntas tocando o terror no Laboratório de Cultivo Celular! Obrigada por me ensinar tantas coisas sobre experimentos com macrófagos, e por divertir os longos dias de trabalho que tivemos! Você fica no coração!

Ao Alex Evangelista do Amaral, por me acompanhar dia e noite nos experimentos de atividade leishmanicida com toda dedicação que lhe é peculiar e pelas conversas e discussões sobre os temas mais diversos.

À Amanda do Rocio Andrade Pires pelas instruções e protocolo do experimento de atividade captadora de ânion superóxido.

Às amigas queridas Marina de Oliveira Salvalaggio e Vânia Carla S. Pankievicz pelas noites de estudo, horas de almoço, finais de semana, risadas, conversas e pela amizade que nasceu do desespero. Adoro vocês Brows!

À Juliana, Gustavo e Thiago, pelo cantinho da filosofia, por proporcionar visões diferentes do mundo, nos fazendo crescer e vivenciar no diálogo a experiência de cada um. Em especial à Jú, pela parceria ao longo de todo este período.

Aos amigos e demais professores do Laboratório de Oxidações Biológicas pela companhia e auxílio diário.

Aos demais amigos do Mestrado e do Departamento de Bioquímica.

Aos técnicos e bolsistas do Laboratório de Oxidações Biológicas pela valiosa contribuição na realização das tarefas diárias.

Aos funcionários do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, Isellen, Isabel, Ana, Luiz e Cândido, pela dedicação e trabalho prestados.

À Coordenação e do Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica e à Sr^a Marilza Lamour.

Ao Departamento de Bioquímica pela participação como membro discente das reuniões do Colegiado.

À CAPES, CNPq, PRONEX-Carboidratos e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço a Deus por estar viva e por permitir que tudo aconteça.

EPÍGRAFE

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

RESUMO

O tratamento atual para Leishmanioses é feito principalmente com antimoniais pentavalentes há mais de 60 anos. Além de resistência do parasita, estes medicamentos apresentam alta toxicidade. Frente à capacidade de polissacarídeos de ativar macrófagos para executar atividade microbicida, o que inclui a atividade leishmanicida, esta foi avaliada *in vitro* para a arabinogalactana neutra ARAGAL, obtido de *Anandethera columbrina*, e para polissacarídeos sulfatados obtidos de macroalgas marinhas, Go3 (heteroraminana sulfatada), Iota-Gy (galactana kappa-iota-nu-carragenana) e EHW-I (galactana iota-nu-carragenana). Os compostos Go3, Iota-Gy e EHW-I inibiram a produção de ânion superóxido na ausência e presença de PMA 1 $\mu\text{g/mL}$ e apresentaram atividade captadora da mesma espécie reativa de forma dose dependente, chegando, na concentração 10 $\mu\text{g/mL}$ a 33% de captação com o Go3, 44% com o Iota-Gy e 55% com o EHW-I. Apresentaram ainda aumento da produção de óxido nítrico alcançando a 10 $\mu\text{g/mL}$ aproximadamente 110% de ativação em relação ao controle negativo para Go3, 71% para Iota-Gy e 81% para EHW-I. Houve diminuição da atividade fagocítica para Go3 e EHW-I, Iota Gy não exibiu efeito para esta atividade. A morfologia foi bastante alterada por estes compostos. ARAGAL, Go3, Iota-Gy e EHW-I foram então avaliados quanto a atividade leishmanicida em macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. O polissacarídeo ARAGAL apresentou atividade leishmanicida nas concentrações 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, inibindo 88% do crescimento da *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na concentração mais baixa. O polissacarídeo Go3 apresentou atividade a partir da concentração 5 $\mu\text{g/mL}$ chegando a 55% de inibição em 10 $\mu\text{g/mL}$. Iota-Gy iniciou sua atividade já em 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e atingiu 50% de inibição em 10 $\mu\text{g/mL}$. EHW-I exibiu o efeito leishmanicida mais intenso em todas as concentrações, atingindo 98% de inibição em 10 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados obtidos neste trabalho colocam as moléculas testadas em evidência para investigações futuras visando o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra leishmanioses.

Palavras-chave: Polissacarídeos, gomas, macroalgas marinhas, macrófagos, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

ABSTRACT

The current treatment against Leishmaniasis is mainly done using pentavalent antimonials for over 60 years. Beyond parasites resistance, these medications are highly toxic. Faced with the capacity of polysaccharides activating macrophages to stimulate the microbicidal activity, that includes the leishmanicidal activity, it was evaluated *in vitro* to the neutral arabinogalactan ARAGAL, obtained from *Anandethera columbrina*, and to sulfated polysaccharides obtained from seaweeds, Go3 (sulfated heterorhamnan), Iota-Gy (galactan kappa-iota-nu-carrageenan) and EHW-I (galactan iota-nu-carrageenan). The compounds Go3, Iota-Gy and EHW-I inhibited the superoxide anion production in the absence or presence of PMA 1 $\mu\text{g/mL}$ and presented a dose dependent scavenging activity to this reactive oxygen species, reaching 33% of scavenging activity to Go3, 44% to Iota-Gy and 55% to EHW-I at the higher concentration, 10 $\mu\text{g/mL}$. They have also increased production of nitric oxide reaching 110% of activation compared to control to Go3, 71% to Iota-Gy and 71% to EHW-I. There was reduction in phagocytic activity for Go3 and EHW-I, Iota-Gy didn't show any effect in this activity. The morphology was considerably changed to these compounds. ARAGAL, Go3, Iota-Gy and EHW-I were then tested for leishmanicidal activity in murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. ARAGAL showed leishmanicidal activity at concentrations 10, 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$, reaching 88% inhibition of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* growth at the lower concentration. Go3 presented activity at 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$ up to 55% inhibition. Iota-Gy started its activity in 2.5 $\mu\text{g/mL}$ and reached 50% inhibition at 10 $\mu\text{g/mL}$. EHW-I presented the most intense leishmanicidal effect in all concentrations, reaching 98% inhibition at 10 $\mu\text{g/mL}$. The results of this study put the tested molecules in evidence for future investigations in order to develop new therapeutic agents against leishmaniasis.

Key-words: Polysaccharides, gum, seaweeds, macrophages, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	CASOS NOTIFICADOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE NO BRASIL, (SÉRIE HISTÓRICA 1970-2002)	19
Figura 2	DENSIDADE DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA POR MUNICÍPIO, BRASIL - 2007	19
Figura 3	CICLO DE VIDA DA <i>LEISHMANIA</i>	20
Figura 4	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	36
Figura 5	EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS APÓS 2 HORAS DE EXPOSIÇÃO	47
Figura 6	EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS APÓS 48 HORAS DE EXPOSIÇÃO	48
Figura 7	PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I	50
Figura 8	PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I NA PRESENÇA DE PMA	51
Figura 9	ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE ÂNION SUPERÓXIDO DOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I	53
Figura 10	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS APÓS 48 HORAS DE EXPOSIÇÃO AOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I	56
Figura 11	ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CA-	

	MUNDONGOS EXPOSTOS AOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I	58
Figura 12	ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS	59
Figura 13	ANÁLISES MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS NÃO TRATADOS	59
Figura 14	ANÁLISES MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO POLISSACARÍDEO GO3	61
Figura 15	ANÁLISES MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO POLISSACARÍDEO IOTA-GY ...	61
Figura 16	ANÁLISES MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO POLISSACARÍDEO EHW-I	62
Figura 17	ATIVIDADE LEISHMANICIDA EM LAMÍNULA, CONTROLE POSITIVO E NEGATIVO	63
Figura 18	ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS POLISSACARÍDEOS ARAGAL E EHW-I SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> EM LAMÍNULA ...	65
Figura 19	ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS POLISSACARÍDEOS ARAGAL, GO3, IOTA-GY E EHW-I SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> EM MEIO TOBBIE & EVANS	67

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ARAGAL	Arabinogalactana de <i>Anadenanthera colubrina</i>
BRM	Modificadores da resposta biológica
CD	Coeficiente de detecção
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EHW-I	Galactana sulfatada obtida por extração aquosa da alga vermelha <i>Eucheuma denticulatum</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
GMPLY	Galactomana do líquen <i>Ramalina celastri</i>
Go3	Heteroramina sulfatada obtida da alga verde <i>Gayralia oxysperma</i>
gp63	Glicoproteína 63
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HBSS	Solução salina balanceada de Hank
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico
IFN- γ	Interferon gama
IL-12	Interleucina 12
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
Iota-Gy	Galactana do tipo iota-carragenana obtida da alga vermelha <i>Gymnogongrus griffithsiae</i>
LPG	Lipofosfolucana
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MTT	Brometo de 3-metil[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NBT	Nitroblue tetrazólio
NF- $\kappa\beta$	Fator nuclear kappa B
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX	NADPH oxidase
$O_2^{\bullet-}$	Ânion superóxido
HO^{\bullet}	Radical hidroxil
PBS	Solução salina tamponada
PMA	Forbol 12-miristato, 13-acetato
PMS	Fenazina metassulfato
PVAs	Antimoniais pentavalentes
SOD	Superóxido dismutase
TLR	Receptores Toll-like

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	LEISHMANIOSE	18
2.1.1	Tratamento para leishmaniose e pesquisa de novas drogas	21
2.2	MACRÓFAGOS	23
2.2.1	“Burst” Respiratório	25
2.2.2	Produção de Óxido Nítrico	27
2.2.3	Interação <i>Leishmania</i> /macrófago	28
2.3	EFEITOS DE POLISSACARÍDEOS SOBRE FUNÇÕES BIOLÓGICAS	29
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	36
5	MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1	MATERIAL E REAGENTES	37
5.2	SOLUÇÕES E MEIOS	38
5.2.1	Solução salina tamponada (PBS)	38
5.2.2	Solução salina balanceada de Hank (HBSS)	38
5.2.3	Citrato de sódio	38
5.2.4	Formalina	38
5.2.5	Polissacarídeos	39
5.2.6	Soluções de polissacarídeos	39
5.2.6.1	Dosagem de carboidratos totais	40
5.2.7	Meio MEM	40
5.2.8	Meio Tobbie & Evans	40
5.3	CULTIVO CELULAR	41

5.3.1	Células	41
5.3.1.1	Macrófagos peritoneais de camundongo	41
5.3.1.2	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	42
5.3.2	Determinação da viabilidade celular	42
5.3.3	Determinação do efeito dos polissacarídeos na produção de ânion superóxido	42
5.3.4	Determinação da atividade sequestradora de ânion superóxido	43
5.3.5	Determinação do efeito da produção de óxido nítrico	43
5.3.6	Determinação do efeito da atividade fagocítica	44
5.3.7	Análises morfológicas	44
5.3.8	Atividade Leishmanicida	45
5.3.8.1	Avaliação da atividade leishmanicida em amastigota por visualização em lamínula	45
5.3.8.2	Avaliação da atividade leishmanicida sobre amastigota por visualização do crescimento de promastigota em meio Tobbie & Evans	45
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1	EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS	47
6.1.1	Efeitos na viabilidade celular	47
6.1.2	Efeitos na produção de ânion superóxido	49
6.1.3	Efeitos na produção de óxido nítrico	55
6.1.4	Efeitos na atividade fagocítica e morfologia	57
6.2	ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS POLISSACARÍDEOS ARAGAL, GO3, IOTA-GY E EHW-I SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	62
7	CONCLUSÕES	70
	Referências	71
	Anexo A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	80

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública, representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a doença, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano. É considerada pela mesma organização como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção, que indica o número de casos novos registrados no decorrer de um ano, e por sua capacidade de produzir deformidades.

Protozoários do gênero *Leishmania* são membros da família dos Trypanosomatidae, que infectam o homem através da picada do vertebrado fêmea da subfamília *Phlebotominae* (DESJEUX, 1996). O parasita existe em duas formas, a forma promastigota, que vive no intestino do vetor, e a forma amastigota, que vive dentro do macrófago do hospedeiro. A forma promastigota é infectante, capaz de invadir o macrófago. Uma vez dentro da célula, o parasita se converte para a forma amastigota, mais resistente à defesa do hospedeiro, causando as leishmanioses.

Os macrófagos são células do grupo dos fagócitos mononucleares, chamados de monócitos no sangue e macrófagos nos tecidos. Amplamente distribuídos pelo corpo, estas células são responsáveis por numerosos processos homeostáticos, imunológicos e inflamatórios e constituem uma defesa imediata contra elementos estranhos ao organismo (BURKE; LEWIS, 2002). Para conseguir infectar esta célula, *Leishmania* spp. inibe suas funções microbicidas como o “Burst” respiratório e a produção de óxido nítrico.

O tratamento das leishmanioses é baseado em antimoniais pentavalentes (PVAs), cuja ação curativa foi descoberta pelo brasileiro Gaspar Vianna em 1912 (FIOCRUZ, 2010). Destacam-se o glucantime e o pentostan que são administrados por via parenteral. Essas drogas vem sendo utilizadas há mais de seis décadas e apresentam reconhecidos efeitos colaterais (CRUZ *et al.*, 2009). Considerando a gravidade desses efeitos, têm sido desenvolvidos estudos visando encontrar tratamentos alternativos para as leishmanioses humanas.

Polissacarídeos de diferentes origens e com características estruturais varia-

das vêm sendo estudados quanto as suas potenciais aplicações biológicas (BOHN; BEMILLER, 1995). Alguns destes compostos têm sido classificados como modificadores da resposta biológica (BRM) (SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Estas moléculas podem se ligar a receptores de membrana de macrófagos, podendo ativá-los em diversas vias (BADWEY; KARNOVSKY, 1980; BERTON; GORDON, 1983; RAMAMOORTHY; KEMP; TIZARD, 1996; NOLETO *et al.*, 2002, 2004). Em macrófagos infectados por *Leishmania*, esta ativação pode culminar com atividade leishmanicida. Tal atividade já foi encontrada para galactomanana e seu complexo com íon vanadilo (NOLETO *et al.*, 2002) e para Z-100, uma arabinomanose obtido de *Mycobacterium tuberculosis* (BARROSO *et al.*, 2007). Sendo assim, foram escolhidos polissacarídeos possivelmente moduladores de atividades biológicas para testar e caracterizar sua atividade em macrófagos e testar sua atividade leishmanicida sobre a forma amastigota de *Leishmania (L.) amazonensis*. Esta espécie foi escolhida por já ter sido detectada atividade leishmanicida de polissacarídeos para a mesma (CANTOS *et al.*, 1993; NOLETO *et al.*, 2002; BARROSO *et al.*, 2007).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEISHMANIOSE

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários da família dos Tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*. Estas doenças são transmitidas pela picada de insetos fêmeas do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* (DESJEUX, 1996). As leishmanioses ocorrem clinicamente em duas formas principais, a leishmaniose visceral e a leishmaniose cutânea. O aspecto clínico e a evolução da doença dependem do parasita e da imunidade do hospedeiro (WHO, 2007). A espécie utilizada neste trabalho é a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, causadora principalmente da forma cutânea da doença, conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (ASHFORD, 2000).

A LTA é endêmica em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de cerca de 1 - 1,5 milhões de casos. (WHO, 2007). O controle da infecção é complicado pois existem várias espécies de vetores em potencial e cerca de 100 espécies de animais podendo ser hospedeiros/reservatórios (WHO, 1990). Nos dias de hoje, sem dúvida, a leishmaniose tem uma distribuição geográfica mais ampla que antes, e está chegando em áreas consideradas não endêmicas. Em 1950 menos de um terço da população mundial vivia em cidades, atualmente esta proporção aumentou para 50%. Na América do Sul mais de 70% da população é urbanizada. Essa transição trouxe doenças do meio rural para cidades, onde populações concentradas de homens e vetores aumentam a incidência de infecções (WHO, 2002).

No Brasil, a partir da década de 80, verifica-se um aumento expressivo no número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 37.710 (2001) como pode ser observado na figura 1 (COSTA, 2005). Na mesma época a LTA foi assinalada em 19 estados, verificando sua expansão geográfica. Em 2003 sua existência foi confirmada em todos os estados brasileiros. Observa-se ampla distribuição e, em algumas áreas apresenta intensa concentração de casos, enquanto em outras os casos apresentam-se isolados (figura 2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Foi verificado, entre 1985 e 1999, um coeficiente de detecção (CD) variável entre 10,45 e 22,9 por 100.000 habitantes. (COSTA, 2005). Em 2008 o CD encontrado foi de 10,4 por 100.000 habitantes, o que representa 19.746 novos casos em todo território nacional (MINISTÉRIO

DA SAÚDE, 2009).

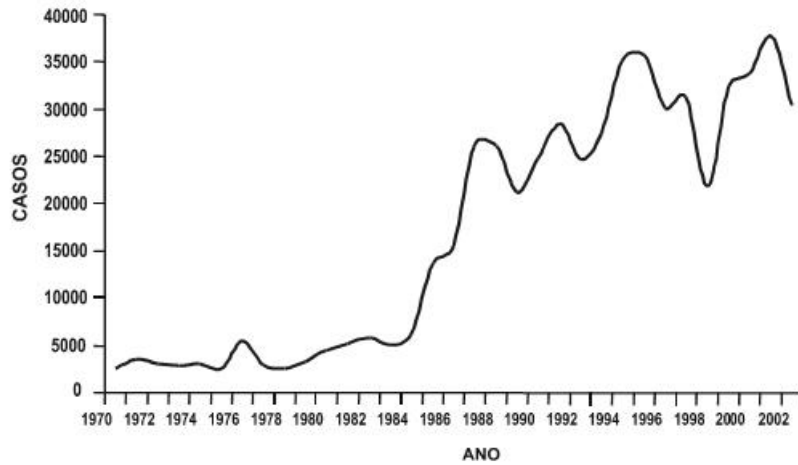


FIGURA 1 – CASOS NOTIFICADOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE NO BRASIL, (SÉRIE HISTÓRICA 1970-2002)

FONTE: Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil, J. Costa (2005)

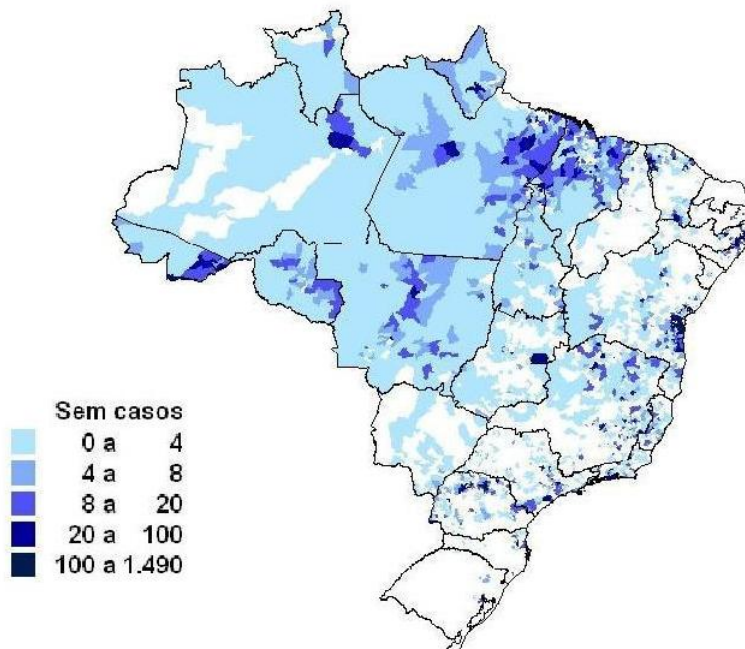


FIGURA 2 – DENSIDADE DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA POR MUNICÍPIO, BRASIL - 2007

FONTE: Sinan SVS/MS

O gênero *Leishmania* compreende parasitas unicelulares caracterizados pela presença de uma organela rica em DNA chamada de cinetoplasto. Tais organismos se alternam entre dois estágios principais de desenvolvimento como mostra a figura 3. No hospedeiro mamífero encontram-se na forma amastigota, que têm formato arredondado ou ovalado, aflagelada e se prolifera no interior de fagolisossomos de macrófago. No vetor, a forma encontrada denomina-se promastigota, que possui flagelo único e longo (DESCOTEAUX; TURCO, 1999; OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005).

A transmissão se dá através da picada de insetos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, que, ao se alimentar do sangue de um mamífero infectado, ingere macrófagos contendo o parasita na forma amastigota. Durante a digestão do sangue, os amastigotas iniciam sua diferenciação para a forma promastigota procíclica, capaz de se dividir e não infectante. Nesta forma, o parasita ataca o epitélio intestinal prendendo-se a ele. Em seguida, passa por um processo chamado metaciclogênese, se convertendo para a forma promastigota metacíclica, incapaz de se dividir e infectante. Os parasitas se destacam das células intestinais e migram para o aparelho bucal do inseto. Na próxima picada, o parasita na forma promastigota metacíclico é inoculado no hospedeiro mamífero e invade as células do sistema de fagócitos mononucleares (DESCOTEAUX; TURCO, 1999).

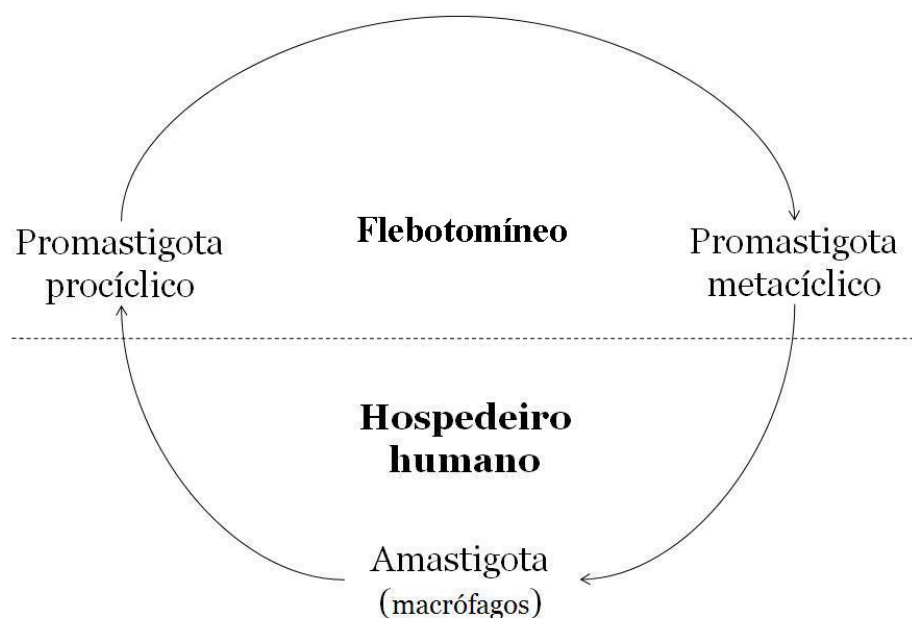


FIGURA 3 – CICLO DE VIDA DA *LEISHMANIA*
FONTE: Adaptado de (DESCOTEAUX; TURCO, 1999)

Após o parasita ser internalizado pelo macrófago, inicia-se a manifestação clínica da doença. Na Leishmaniose Tegumentar Americana o parasita invade os macrófagos da pele, que são conhecidos como células de Langerhans. As lesões típicas são caracterizadas pelo desenvolvimento de nódulos que evoluem para lesões ulcerativas sem dor, cobertas por uma crosta aderente de exudato seco (GONZÁLEZ *et al.*, 2008) Alterações epidermais refletem a resposta imunológica à infecção resultando em hiperplasia e engrossamento epidermal. A maior parte das manifestações se dá por uma lesão limitada e única, porém, esta enfermidade pode apresentar um amplo espectro de severidade e uma série de formas clínicas. São elas: cutânea aguda ou localizada, a mais comum; mucocutânea; cutânea difusa e recidiva (GARNIER; CROFT, 2002). A infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* causa, geralmente, a leishmaniose cutânea aguda ou a leishmaniose cutânea difusa (ASHFORD, 2000). Na primeira, o parasita está confinado à pele e desenvolve a lesão típica com algumas variações de tamanho, formato e tempo de evolução. Na segunda, as lesões são localizadas apenas na pele, mas de forma difundida pelo corpo (GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

2.1.1 Tratamento para leishmaniose e pesquisa de novas drogas

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), assim como os outros tipos de leishmaniose, têm como tratamento de primeira linha dois antimoniais pentavalentes, o estibogluconato de sódio (Pentostam) e o antimoniato de meglumine (Glucantime) há mais de 60 anos (ROBERTS; MCMURRAY; RAINEY, 1998). Apesar de serem utilizados a tanto tempo, alguns detalhes de seu mecanismo de ação não estão claros (MALTEZOU, 2009). É aceito que o antimônio pentavalente é um profármaco, sendo reduzido a antimônio trivalente, que apresenta atividade leishmanicida (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; MALTEZOU, 2009). É proposto que esta redução ocorra no citoplasma do macrófago ou diretamente na membrana do protozoário na forma amastigosta (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004). O estibogluconato de sódio foi descoberto como um potente inibidor da atividade de proteínas tirosina fosfatase (PATHAK; YI, 2001). Foi encontrado ainda que os antimoniais pentavalentes induzem a morte celular programada do parasita por fragmentação do DNA (LEE *et al.*, 2002). Estas, entre outras evidências, sugerem que os antimoniais pentavalentes podem matar a *Leishmania* tanto por mecanismos diretos como indiretos (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004).

Segundo a Organização Mundial da Saúde o grande problema com este trata-

mento é o acesso aos medicamentos, pois além do alto custo, deve ser administrado em hospital por via intravenosa ou intramuscular durante quatro semanas (WHO, 2007). Além disso, drogas antimoniais parenterais estão relacionadas a uma série de efeitos colaterais severos, incluindo náusea, vômito, diarreia, erupções na pele, tontura, arritmia cardíaca, hipotensão, artralgia, mialgia, desconforto abdominal, dor de cabeça, elevação reversível das enzimas hepáticas, ocasional anemia e trombocitopenia frequentemente dose dependente (GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

A droga de segunda escolha e de primeira escolha para gestantes recomendada pelo Ministério da Saúde é a anfotericina B (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Trata-se de um antifúngico sistêmico efetivo também para tripanossomídeos devido a presença de ergosterol em sua membrana (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004). Baseado na síntese diferenciada de lipídeos, foi encontrada sensibilidade dos tripanossomídeos a uma série de antifúngicos (ROBERTS *et al.*, 2003). Outros estudos mostram eficácia para micelânea de drogas como alopurinol, rifampicina, dapsona, cetoconazol e nifurtimox (BERMAN, 1988). Outras drogas como a miltefonisa, pentamidina, paromomicina, azóis, sitamaquina e análogos a nucleosídeos vem sendo testadas, porém, há uma crescente consciência de que o tratamento medicamentoso pode ser complicado pela variação na sensibilidade das espécies de *Leishmania* às drogas, a variação na farmacocinética e a variação na interação fármaco-resposta imune do hospedeiro (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Tratamentos baseados em substâncias de origem vegetal também têm sido investigados (CARVALHO; FERREIRA, 2001; BRAGA *et al.*, 2007).

Na tentativa de controlar a propagação das leishmanioses, diferentes tipos de intervenções tem sido investigados. Como revisado por KEDZIERSKI *et al.*, (2009), vários tipos de vacinas foram propostos, tanto para tratamento quanto para profilaxia da doença. Uma vacina anti-leishmania ideal deve induzir respostas de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ a fim de produzir memória imunológica, e a maior concentração destes estudos estão nas vacinas de subunidades entregues como proteínas recombinantes, DNA, poli-proteína ou células dendríticas contendo antígenos de leishmania além de vacinas de parasitas mortos ou atenuados (KEDZIERSKI *et al.*, 2009).

Além de vacinas, alvos moleculares vêm sendo estudados para posterior identificação de substâncias capazes de modular suas atividades (CRUZ *et al.*, 2009). Um bom alvo de drogas deve ser expresso em um estágio relevante do ciclo de vida do parasita e preencher um ou mais dos seguintes critérios: ser exclusivo do parasita, ser

essencial para sua sobrevivência, ou ser essencial para sua virulência (KEDZIERSKI *et al.*, 2009). É proposto ainda que um tratamento de sucesso para todos os tipos de leishmaniose depende da eliminação efetiva dos parasitas por ativação de macrófagos (KEDZIERSKI *et al.*, 2009).

Polissacarídeos podem ser reconhecidos por macrófagos pelos receptores manose-fucose, pelos receptores para β -glucanas, entre outros (BOHN; BeMILLER, 1995; MARTINEZ-POMARES *et al.*, 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Considerando a capacidade de macrófagos de internalizar ou ser ativados por polissacarídeos, manana de leveduras foi complexada com antimônio com objetivo de aumentar a captação da droga pelo macrófago (CANTOS *et al.*, 1993; ROBERTS *et al.*, 1996). Usando concentrações iguais de antimônio complexado e não complexado, o tratamento com o primeiro teve 60% de atividade leishmanicida em macrófagos peritoniais infectados *in vitro* com *Leishmania (L.) amazonensis*, enquanto que o tratamento com o antimônio complexado com manana apresentou 90% de atividade. No mesmo estudo, manana não complexada não apresentou efeito leishmanicida (CANTOS *et al.*, 1993).

Já a galactomana do líquen *Ramalina celastri* (GMPOLY) e seu complexo com íon vanadilo apresentaram efeito leishmanicida contra forma amastigota de *Leishmania (L.) amazonensis in vitro*. A mesma atividade leishmanicida apresentada para 300 $\mu\text{g/mL}$ de Glucantime foi obtida com 100 $\mu\text{g/mL}$ de galactomana e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ do complexo galactomanana-ion vanadilo (NOLETO *et al.*, 2002). Uma arabinomanose (Z-100) isolada de *Mycobacterium tuberculosis* diminuiu para 44,3% o crescimento de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* intracelular em macrófagos J774.1 após 48 horas de exposição à droga (BARROSO *et al.*, 2007). Assim, investigar possíveis efeitos leishmanicida para diferentes polissacarídeos torna-se uma área de interesse.

2.2 MACRÓFAGOS

Os macrófagos são células do sistema de fagócitos mononucleares, desta forma, sua função primária é a fagocitose. Estas células se originam na medula óssea, circulam pelo sangue como monócitos e, posteriormente são direcionadas para diferentes tecidos. Uma vez estabelecidas nos tecidos, essas células amadurecem e se tornam macrófagos. Estes localizam-se no tecido conjuntivo subepitelial, no interstício dos órgãos parenquimatosos, no revestimento dos sinusóides vasculares do fígado e do baço, e nos seios linfáticos dos linfonodos. Assim essas células fagocíticas estão estrategicamente posicionadas em todos os locais onde microorganismos podem

entrar no hospedeiro (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Os macrófagos desempenham papéis centrais na imunidade inata, reconhecendo, fagocitando e destruindo muitos agentes patológicos, incluindo bactérias, vírus, fungos, helmintos e protozoários (BURKE; LEWIS, 2002). Eles também podem reconhecer células tumorais e algumas células infectadas por vírus, assim como células normais em processo de apoptose. Além de seus papéis na imunidade inata, os macrófagos funcionam como células reguladoras e efetoras na resposta imunológica humoral celular (KAUFMANN; MEDZHITOV; GORDON, 2004).

Guiado por um gradiente de moléculas quimiotáticas, o macrófago move-se em direção à partícula microbiana (BURKE; LEWIS, 2002). Inicia-se então o processo de fagocitose, que é mediado por receptores específicos expressos na superfície destas células. É reconhecido que o receptor para manose está diretamente relacionado com a fagocitose (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Estudos de caracterização estrutural deste receptor revelaram tratar-se de uma lectina que liga-se a resíduos terminais de manose e fucose de glicoproteínas e glicólípidos encontrados em paredes celulares microbianas, que não estão presentes em células de mamíferos (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Dessa forma, o macrófago reconhece açúcares presentes na membrana ou parede celular de microorganismos e não do hospedeiro (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Em resposta à fagocitose ocorre a ativação do macrófago, que pode ser definida como a aquisição induzida por estímulo de uma nova capacidade funcional (BURKE; LEWIS, 2002). Estas células produzem, no fagolisossomo, intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio com o objetivo de eliminar a partícula estranha. Realizam também outras funções efetoras, como a produção de citocinas da imunidade inata, produção de fatores de crescimento de fibroblastos, de fatores angiogênicos e de metaloproteínases para remodelagem tecidual e fazem também a degradação de proteínas e processamento de antígeno para apresentação às moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), para que as células T possam reconhecer as substâncias estranhas ao organismo (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A produção de citocinas se dá em resposta a microorganismos invasores, além de outros estados fisiopatológicos como inflamação, trauma e malignidade e seus efeitos não estão limitados a células do sistema imune (SOUBA, 1994). Uma citocina importante produzida por diversas células do sistema imunológico, em especial por macrófagos ativados é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que tem um papel central na regulação de mediadores, tanto pró quanto anti-inflamatórios. Esta citocina exerce efeitos no metabolismo de lipídeos, coagulação, resistência à insulina

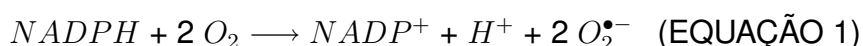
e disfunção endotelial (STENVINKEL *et al.*, 2005). O TNF- α é sintetizado como um precursor de 26 kDa ligado à membrana (pró-TNF) que sofre uma clivagem proteolítica liberando uma proteína madura e solúvel de 17 kDa (JEON; JUE, 1997; MONROY *et al.*, 2009). Macrófagos infectados por *Leishmania* estão inibidos para a produção desta citocina assim como para outras respostas inflamatórias (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005). Camundongos resistentes à infecção por este parasita apresentam uma alta produção de TNF- α (KEDZIERSKI *et al.*, 2009). Além de citocinas, macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em resposta a estímulos externos (BEUTLER, 2004). Estas respostas serão abordadas a seguir.

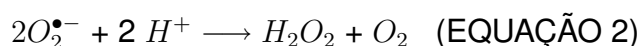
2.2.1 “Burst” Respiratório

O “burst” respiratório é um processo caracterizado por um aumento rápido no consumo de oxigênio onde há produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em resposta a fagocitose além de outros estímulos (BADWEY; KARNOVSKY, 1980). Em 1973 foi sugerido que, nas situações em que o superóxido e o peróxido de hidrogênio são produzidos é provável que eles participem da destruição da bactéria (BABIOR; KIPNES; CURNUTTE, 1973).

O “burst” respiratório em macrófagos pode ter diferentes intensidades, o que depende do seu local de origem e de como foram obtidas estas células. Macrófagos que nunca entraram em contato com nenhum estímulo, chamados residentes, são menos ativos que aqueles obtidos de animais tratados com PMA, os quais produzem três vezes mais oxigênio no “burst” respiratório que células de animais não tratados (COHEN; RYAN; ROOT, 1981). Outros agentes, como o interferon gama (IFN- γ) e o muramil dipeptídeo da parede bacteriana, também são capazes de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio *in vitro*. Estes agentes podem potencializar a resposta destas células ao estímulo do qual originou o “burst” respiratório (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A formação do $O_2^{\bullet-}$ é catalisada pelo complexo NADPH oxidase (NOX) como representado na equação 1 abaixo, sendo, em seguida convertido a H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD) (equação 2) (KLEBANOFF, 1992).

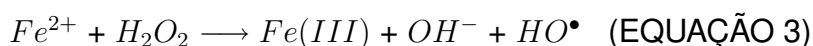




A NOX é um complexo multicomponente de células fagocíticas, dormente em células não ativadas. Sua ativação caracteriza o “burst” respiratório e é acompanhada pela liberação de $O_2^{\bullet-}$ para o meio extracelular (VIGNAIS, 2002). A ativação da NOX na membrana parece ser dependente da presença de fosfatidil inositol fosfatases no local (CROSS; SEGAL, 2004). É necessário ocorrer uma mudança conformacional na flavoproteína b_{558} , que é o sítio catalítico da enzima, para torná-la ativa (VIGNAIS, 2002; CROSS; SEGAL, 2004). Esta mudança conformacional parece ser dependente do contato entre a flavoproteína e as subunidades citosólicas da NOX (CROSS; SEGAL, 2004). A flavoproteína b_{558} foi localizada tanto na membrana quanto no citoplasma de macrófagos (CASBON *et al.*, 2009).

A NOX parece ter atividade compartimentalizada dentro da célula como em complexos lameliopodiais focais, adesões focais, irregularidades de membrana, cavéolas, “lipid rafts”, endossomo e núcleo, facilitando a produção localizada de espécies reativas, permitindo que participem de sinalização celular (USHIO-FUKAI, 2006, 2009). Uma função conhecida das espécies reativas produzidas pela NOX é a fusão de macrófagos para formação de células gigantes. Elas são capazes de induzir fatores de fusão assim como modular fatores de transcrição redox-sensíveis, que são importantes para fusão celular (QUINN; SCHEPETKIN, 2009). A ausência de atividade desta enzima resulta em uma suscetibilidade característica à infecção fúngica e bacteriana recorrente, como observado em pacientes com Doença Granulomatosa Crônica. Esta enfermidade é resultante de uma deficiência genética em um dos quatro genes que codificam subunidades da enzima NOX (GOEBEL; DINAUER, 2003). É necessário que a enzima esteja funcional para que o macrófago consiga reconhecer e engolfar corpos apoptóticos com eficiência (SANMUN *et al.*, 2009).

Os produtos do “burst” respiratório e seus derivados incluem ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, ácidos hipoálicos, radical hidroxil, entre outros (NATHAN, 2006). O ânion superóxido é pouco reativo, quando gerado intracelularmente, ele exerce sua toxicidade inibindo enzimas bacterianas que contém clusters $[Fe - S]$. Simultaneamente é liberado o Fe^{2+} , que pode converter o H_2O_2 em radical hidroxil (HO^{\bullet}) pela Reação de Fenton (equação 3):



Porém, o $O_2^{\bullet-}$ gerado no fagolisossomo parece não atravessar a parede celular das bactérias. É proposto que sua função possa estar relacionada com a criação de ambiente favorável à proteases e não com a toxicidade direta em microorganismos (HALLIWELL, 2006). Já o H_2O_2 gerado no fagolisossomo é capaz de entrar na célula bacteriana e formar HO^\bullet , fatal para o microorganismo. Porém, a presença de lactoferrina no fagolisossomo, uma proteína capaz de se ligar ao ferro livre, impede que este radical seja formado em grande quantidade (SEGAL, 2005; HALLIWELL, 2006).

2.2.2 Produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) produzido por macrófagos, células endoteliais vasculares, neurônios, plaquetas, neutrófilos, células do trato respiratório, hepatócitos e fibroblastos, é um gás altamente permeável a membranas que têm importante atuação na defesa antimicrobiana, inflamação e angiogênese (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997). Este gás apresenta efeitos diversos em todo o organismo, como o efeito vasoprotetor, mediador da angiogênese além de modular a proliferação de células musculares lisas em vasos sanguíneos (NASEEM, 2005). Quando produzidos por macrófagos, sua principal função é microbicida, pode ser tóxico ao microorganismo fagocitado quando combinado ao peróxido de hidrogênio e convertido a peroxinitrito dentro dos fagolisossomos (SONG *et al.*, 2002; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A síntese do óxido nítrico (NO) é catalizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem pelo menos três isoformas da enzima, codificadas por três genes diferentes, a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS), sendo que a última é a forma presente em macrófagos (XIE *et al.*, 1992; NATHAN; XIE, 1994). Estas enzimas são as únicas flavoheme que utilizam tetrahydrobiopterina (H_4O) como fator redox, são também calmodulina dependentes (STUEHR *et al.*, 2004). A enzima possui dois domínios oxigenase e um domínio redutase homólogo ao P450, que podem ser usados como alvo na terapia antitumoral (FITZPATRICK *et al.*, 2008).

Em macrófagos de camundongos e ratos, a expressão de iNOS pode ser induzida por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), citocinas estimulatórias como interferon gama ($IFN-\gamma$), fator de necrose tumoral ($TNF-\alpha$) e outros compostos (MONCADA, 1999; KLEINERT *et al.*, 2004). Os estímulos que determinam sua expressão são célula

e espécie específicos, além de passarem por uma ampla gama de mecanismos regulatórios, como os transcricionais, pós-transcricionais e traducionais. Uma vez expressa, a enzima não parece ter sua atividade regulada (KLEINERT *et al.*, 2004). Um dos mecanismos de regulação da expressão de iNOS humana tem como alvo regiões do mRNA ricas em AU (ARE). O fator 1 de ligação ARE/poli-(U) (AUF1) se liga a essas regiões desestabilizando o mRNA da iNOS, que será direcionado para degradação e não traduzido. A super expressão de AUF1 diminui a expressão de iNOS. Citocinas podem modular a ligação de AUF1 ao mRNA, alterando a expressão de iNOS (PAUTZ *et al.*, 2009).

2.2.3 Interação *Leishmania*/macrófago

Sabendo que o macrófago é uma célula de defesa, responsável por destruir microorganismos invasores e que a *Leishmania*, no hospedeiro mamífero, é um parasita intracelular obrigatório do macrófago, torna-se interessante entender como ocorre a interação entre esta célula e este parasita.

Após ser inoculada em um hospedeiro mamífero pela picada do vetor, a *Leishmania* se mantém na forma promastigota metacíclica por pouco tempo. Nesta forma ela é resistente ao ataque das subunidades C5b-C9 do sistema complemento, cuja função é a lise celular. Assim, a *Leishmania* não sofre lise enquanto é internalizada pelo macrófago (DESCOTEAUX; TURCO, 1999). Isto se dá devido a presença de moléculas de superfície presentes no parasita na forma infectante. Uma delas é a lipofogluçana (LPG), a molécula de superfície mais longa do parasita. A LPG é formada por três domínios conservados, sendo uma ancora lipídica, um corpo glicano e um esqueleto de repetições de dissacarídeo fosfato. Algumas espécies apresentam um “cap” de oligossacarídeos. No estágio promastigota metacíclico o parasita apresenta a região de repetições de dissacarídeos fosfato alongada, impedindo a aproximação das subunidades do sistema complemento (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005).

Outra molécula envolvida nesta defesa é a protease de superfície de promastigota (gp63), uma glicoproteína que promove a conversão de uma proteína do sistema complemento, C3b, em uma forma inativa, C3bi. A proteína C3bi fica na superfície da *Leishmania* após essa reação. A presença dela é um sinal para que o macrófago reconheça o parasita e fagocite por uma via que não ativa o “burst” oxidativo, um dos mecanismos responsáveis pela função microbicida do macrófago (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005). A fagocitose pode ocorrer também por outros

mecanismos. Um deles é via receptor manose-fucose, que reconhece resíduos de manose nas extremidades de LPG. (DESCOTEAUX; TURCO, 1999; OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005). Recentemente verificou-se que *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induz o complexo repressor transcricional p50/p50 NF- κ B, o que inibe a expressão gênica pró-inflamatória levando à progressão da doença (CALEGARI-SILVA *et al.*, 2009).

Uma vez envolta pelo macrófago, a *Leishmania* está confinada ao ambiente do endossomo, onde começa a se diferenciar para a forma amastigota, resistente a degradação no ambiente ácido e hidrolítico do lisossomo (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005). A fim de conseguir completar sua diferenciação, o parasita retarda a maturação do endossomo por um mecanismo dependente de LPG. Na forma amastigota a *Leishmania* é capaz de inibir enzimas hidrolíticas e depletar espécies reativas de nitrogênio e oxigênio mantendo-se protegida e capaz de se multiplicar no fagolisossomo (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005). Neste estágio, a *Leishmania* expressa LIT1, uma proteína de membrana que funciona como transportador de metal com preferência para o Fe^{2+} , nutriente essencial para o metabolismo do parasita. Por outro lado o macrófago recruta a proteína Nramp1 para o fagolisossomo, que bombeia o metal para fora deste. Estudos sugerem que o aumento da expressão de LIT1 parece estar relacionado com a extrusão do Fe^{2+} pela Nramp1 (MARQUIS; GROS, 2007).

Estudos recentes mostram que receptores Toll-like (TLR) estão envolvidos na internalização da *Leishmania* spp. Estes receptores podem reconhecer as moléculas de superfície do parasita. A ativação de TLR4 durante a imunoterapia para leishmaniose está relacionada a aumento da taxa de cura em modelos animais. Tal efeito terapêutico da ativação de TLR está associada a expressão de altos níveis de INF- γ e expressão precoce de IL-12, que atuam via ativação de resposta imunológica do tipo Th1 (TUON *et al.*, 2008).

2.3 EFEITOS DE POLISSACARÍDEOS SOBRE FUNÇÕES BIOLÓGICAS

Alguns polissacarídeos de diversas origens são descritos como capazes de aumentar a resposta imunológica, sendo então denominados como imunomoduladores. Farmacologicamente, essas moléculas tem sido classificadas como modificadores da resposta biológica (BRM) (BOHN; BeMILLER, 1995). Já foram caracterizadas diferentes atividades biológicas para polissacarídeos BRM. Entre estas destacam-se atividade imunomoduladora (STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002; MORETÃO *et al.*, 2003, 2004), antiviral (HASUI *et al.*, 1995; CASSOLATO *et al.*, 2008), anticoagulante (COSTA *et al.*, 2010; MAO *et al.*,

2006), leishmanicida (LUETTIG *et al.*, 1989; NOLETO *et al.*, 2002; BARROSO *et al.*, 2007).

A ativação de macrófagos por polissacarídeos se dá através da interação destas moléculas com receptores presentes na superfície celular, como receptores para β -glucana (BOHN; BeMILLER, 1995). Interações com polissacarídeos de origem vegetal foram descritas para receptores de diversos tipos como receptores Toll-like 4 (TLR4), receptor do complemento 3 (CR3), receptores scavenger, receptores dectina-1 e receptores de manose (SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

Em 1979 foram encontradas evidências de que α -metil-D-manosídeo reduz, de maneira dose dependente, a citotoxicidade em células de linfoma murino (LSTRA) mediada por leucócitos humanos, induzida por concanavalin A. Isso ocorre por que o polissacarídeo é capaz de impedir a ligação da concanavalina A a membrana de células de mamíferos (CLARK; KLEBANOFF, 1979). Alguns anos depois foi caracterizado o receptor manose-fucose (SHEPHERD *et al.*, 1982), presente em macrófagos e não em monócitos circulantes, sendo que glicocorticóides aumentam sua expressão, enquanto que o interferon gama (IFN- γ) diminui (STAHL *et al.*, 1984). O receptor manose-fucose tem três domínios extracelulares, um rico em cisteína (CR), outro semelhante a lectina tipo C (CTLD) e outro semelhante a fibronectina tipo II (FNII) (TAYLOR *et al.*, 1990). O domínio CR reconhece carboidratos sulfatados (FIETE; BERANEK; BAENZIGER, 1998), enquanto o domínio CTDL é capaz de ligar resíduos de N-acetilglucosamina, manose e fucose (TAYLOR; BEZOULKA; DRICKAMER, 1992) e o domínio FNII é conhecido por ser importante para ligação de colágeno (BEHRENDT *et al.*, 2000; MARTINEZ-POMARES *et al.*, 2006).

Zimosana, uma mistura de manana e glucana preparada a partir de leveduras, apresentou efeito ativador de macrófago interferindo no “burst” respiratório e fagocitose, sendo amplamente utilizada como ativador desta via (BADWEY; KARNOVSKY, 1980; BERTON; GORDON, 1983). β -Glucanas ativaram a produção de óxido nítrico e TNF- α de maneira dose dependente, mas não aumentam a produção dos intermediários reativos de oxigênio, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. É proposto que β -glucanas atuam como imunomoduladores e melhoram a atividade anti-tumoral de macrófagos peritoneais de camundongos (AKRAMIENE *et al.*, 2007). α -Glucanas do líquen *Ramalina celastri* apresentou atividade imunomoduladora em macrófagos peritoneais de camundongos (STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002), assim como glucanas solúveis produzidas por *Streptococcus mutans* (CHOI *et al.*, 2005).

DMG, uma mananoglucana de *Microellbosporia* pode estimular a atividade

citotóxica de macrófagos (NAKAJIMA *et al.*, 1984). Uma polidispersão de β -(1 \rightarrow 4) manana extraída de *Aloe vera*, Acemanan aumentam o nível da enzima NO sintase em macrófagos da linhagem RAW 264.7 a nível de transcrição (RAMAMOORTHY; KEMP; TIZARD, 1996). Também foi observado que a manana de *Saccharomyces cerevisiae* e a galactomanana do líquen *Ramalina celastri* aumentaram a produção de óxido nítrico em 55% e 40%, respectivamente, quando comparada com o grupo controle (NOLETO *et al.*, 2002, 2004).

Recentemente, foi caracterizada atividade moduladora das funções de macrófagos para três xiloglucanas (ROSÁRIO *et al.*, 2008). Neste estudo, as xiloglucanas de sementes de *Copaifera langsdorffii* (XGC), *Hymenaea courbaril* (XGJ) e *Mucuna sloanei* (XGM) induziram a migração de macrófagos para a cavidade peritoneal de camundongos. XGC e XGJ ativaram a produção de óxido nítrico *in vitro* de macrófagos isolados do exudato peritoneal de camundongos.

Além de polissacarídeos isolados, seus complexos com proteínas tem sido avaliado quanto a capacidade de modulação de macrófagos (TIZARD *et al.*, 1989; CHEN *et al.*, 2009b). Estudos *in vitro* com macrófagos peritoneais indicam que mananas de *Saccharomyces cerevisiae* e complexos manana-proteína podem estimular a liberação de interferon (TIZARD *et al.*, 1989). Recentemente, foi verificada ativação de macrófagos pelo complexo polissacarídeo-proteína de *Lycium barbarum* (LBP). Tal efeito foi observado pelo aumento da expressão de CD40, CD80, CD86 e moléculas do MHC classe II, além de aumentar a transcrição de NF- κ B e AP-1 e induzir expressão de mRNA de TNF- α , IL-1 β e IL-12 p40 (CHEN *et al.*, 2009b).

Polissacarídeos também já foram estudados quanto a atividade leishmanicida. A fim de aumentar a captação da droga pelo manana de leveduras foi complexada com antimônio (CANTOS *et al.*, 1993; ROBERTS *et al.*, 1996). Usando concentrações iguais de antimônio complexado e não complexado, o tratamento com o primeiro teve 60% de atividade leishmanicida em macrófagos peritonais infectados *in vitro* com *Leishmania (L.) amazonensis*, enquanto que o tratamento com o antimonio complexado com manana apresentou 90% de atividade. No mesmo estudo, manana não complexada não apresentou efeito leishmanicida (CANTOS *et al.*, 1993).

A galactomana do líquen *Ramalina celastri* (GMPOLY) e seu complexo com íon vanadilo apresentaram efeito leishmanicida contra forma amastigota de *Leishmania (L.) amazonensis in vitro*. A mesma atividade leishmanicida apresentada para 300 μ g/mL de Glucantime foi obtida com 100 μ g/mL de galactomana e 0,5 μ g/mL do com-

plexo galactomanana-ion vanadilo (NOLETO *et al.*, 2002). E ainda, uma arabinomanose (Z-100) isolada de *Mycobacterium tuberculosis* diminuiu para 44,3% o crescimento de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* intracelular em macrófagos J774.1 após 48 horas de exposição à droga (BARROSO *et al.*, 2007).

Para polissacarídeos sulfatados foram encontrados diversos efeitos biológicos. Heparina e heparam sulfato melhoram as atividades biológicas de homodímeros e heterodímeros das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (TAKADA *et al.*, 2003). Estes polissacarídeos formam complexos com as BMPs através de cadeias de polissacarídeo de carga negativa e um trecho de aminoácido básico em BMPs (TAKADA *et al.*, 2003). Em outro estudo, foi comprovado que polissacarídeos solúveis em meio aquoso, extraídos da parede celular da microalga vermelha *Porphyridium* sp. tem ação antioxidante e foi sugerido que em condições de estresse oxidativo esta alga aumenta a produção de polissacarídeos sulfatados a fim de intensificar a proteção antioxidante (TANNIN-SPITZ *et al.*, 2005).

Foi encontrada ainda, ação antiviral contra o vírus HIV para o polissacarídeo sulfatado da microalga marinha *Cochlodinium polykrikoides* (HASUI *et al.*, 1995). Recentemente, foram encontrados níveis diferentes de atividade anticoagulante, antioxidante e antiproliferativa para polissacarídeos sulfatados extraídos de 11 espécies diferentes de algas do litoral tropical, coletadas em Natal, RN, Brasil (COSTA *et al.*, 2010).

Polissacarídeos sulfatados de algas verdes têm amplo espectro de atividades biológicas como antioxidante, anticoagulante, imunomoduladora e antiviral (QI *et al.*, 2005; MAO *et al.*, 2006; LEIRO *et al.*, 2007; CASSOLATO *et al.*, 2008). A atividade imunomoduladora, foi encontrada para polissacarídeos sulfatados ácidos extraídos de *Ulva rigida* sobre macrófagos da linhagem RAW 264.7, aumentando a produção de *NO* e a expressão de NOS-2, além de aumentar a quantidade de Prostaglandina E₂ e a expressão da enzima Ciclooxygenase 2 (LEIRO *et al.*, 2007).

Para o presente trabalho foram escolhidos polissacarídeos moduladores ou potencialmente moduladores da resposta biológica. O ARAGAL é uma arabinogalactana proveniente do exudado de *Anandethera columbrina* (Angico branco). É constituído por arabinose, manose, galactose, raminose e ácido hexurônico na razão molar 63:1:20:6:10, e consiste de uma cadeia principal de (1→3)-β-galactopiranosose substituída em O-6 por uma variedade de cadeias laterais (DELGOBO *et al.*, 1998). Estudos prévios mostram que ARAGAL promove ativação de macrófagos peritoneais de camundongos *in vitro*, observado por alterações morfológicas e aumento da atividade

fagocítica (MORETÃO *et al.*, 2003). Foi testada também a atividade *in vivo*, pelo tratamento de sete dias com 100 a 500 mg/Kg do polissacarídeo inoculado na cavidade peritoneal de camundongos. Neste estudo, foram observadas alterações morfológicas e aumento na produção de ânion superóxido, porém não houve ativação na produção de óxido nítrico (MORETÃO *et al.*, 2003).

ARAGAL aumentou a atividade elicitora de macrófagos para a cavidade peritoneal de camundongos (MORETÃO *et al.*, 2004). Neste mesmo estudo os autores avaliaram o efeito do polissacarídeo sobre células tumorais Sarcoma 180 (S-180) *in vitro* e *in vivo*. A atividade *in vitro* foi testada incubando, por 18 horas, células S-180 juntamente com macrófagos pré-tratados com ARAGAL 10 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 horas. Foi constatado que os macrófagos pré-tratados foram ativados e fagocitaram as células tumorais. Após esta observação foram realizados estudos *in vivo*, nos quais células S-180 foram inoculadas por via intraperitoneal ou subcutânea. Para os primeiros foi realizado tratamento com ARAGAL 50 ou 100 mg/Kg ou PBS estéril (controle negativo) por três dias e no quarto dia as células S-180 foram coletadas e testadas para viabilidade celular pelo método azul de tripan. Com este teste foi observado que o polissacarídeo diminuiu a proliferação das células tumorais. Já para os camundongos que receberam o tumor via subcutânea, o tratamento foi realizado em dose única de ARAGAL 100 mg/Kg, ou PBS estéril (controle negativo), 24 horas após a inoculação. Após 21 dias, os camundongos foram sacrificados e foi medido o peso do tumor. Foi observado que ARAGAL inibiu o crescimento do tumor em aproximadamente 38%.

Outra arabinogalactana, obtida do chá de *Phyllanthus niruri*, após tratamento com *HCl in vitro*, aumentou a produção de ânion superóxido em macrófagos peritoneais de camundongo, porém com atividade diminuída quando comparada à do polissacarídeo íntegro (MELLINGER *et al.*, 2008).

Os outros polissacarídeos escolhidos (Go3, Iota-Gy e EHW-I) são sulfatados extraídos de algas. Go3 é uma heteroraminana sulfatada extraída da alga verde *Gayralia oxysperma* constituída por unidades monossacarídicas de raminose, xilose, glucose, galactose, arabinose, manose 67:10:10:6:5:2 mol% respectivamente, composto por 26,1% de sulfato e 17% de ácido urônico (CASSOLATO *et al.*, 2008). O Iota-Gy é uma galactana extraída da alga vermelha *Gymnogongrus griffithsiae*. A fração utilizada apresentou as mesmas características estruturais da fração denominada G3d obtida por FARIA-TISCHER, (2006). A galactana Iota-Gy é constituída por galactose, 3,6 anidro-galactose, 6-O-metilgalactose (57:41:2 mol% respectivamente), altamente

sulfatada (27,6%) apresentando díades de iota-, kappa- e nu-carragenana na proporção de 69:14:17. Em estudos anteriores foi encontrada atividade antiherpética contra HSV-I e HSV-II e não foi encontrada citotoxicidade contra célula Vero para as frações Go3, Go3r e Go4 de *Gayralia oxysperma* (CASSOLATO *et al.*, 2008) e para a kappa-iota-nu-carragenana de *Gymnogongrus griffithsiae* (TALARICO *et al.*, 2004). O EHW-I é uma galactana sulfatada, do tipo iota-nu-carragenana na proporção 77:23, obtida da parede celular da alga vermelha *Eucheuma denticulatum* para a qual estão sendo realizados estudos biológicos (DUCATTI, 2005).

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Considerando (a) a importância epidemiológica das leishmanioses, assim como a falta de opções de tratamento para estas patologias, (b) a capacidade de polissacarídeos de modificar a resposta biológica, em especial de ativar e macrófagos para executar atividade microbicida (BADWEY; KARNOVSKY, 1980; BERTON; GORDON, 1983; RAMAMOORTHY; KEMP; TIZARD, 1996; NOLETO *et al.*, 2004), (c) a atividade leishmanida observada para o polissacarídeo GMPOLY (NOLETO *et al.*, 2002) e, (d) mais recentemente, a atividade leishmanicida observada para uma arabinomanose (Z-100), isolada de *Mycobacterium tuberculosis* (BARROSO *et al.*, 2007), o objetivo geral deste trabalho foi testar e caracterizar a possível atividade leishmanicida *in vitro* dos polissacarídeos ARAGAL, Go3, Iota-Gy e EHW-I.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar efeitos dos polissacarídeos Go3, Iota-Gy e EHW-I sobre macrófagos quanto a:
 - Produção de Ânion Superóxido;
 - Produção de Óxido Nítrico;
 - Atividade Fagocítica;
 - Alterações Morfológicas;
- Avaliar efeitos de todos os polissacarídeos sobre *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em macrófagos infectados.

4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

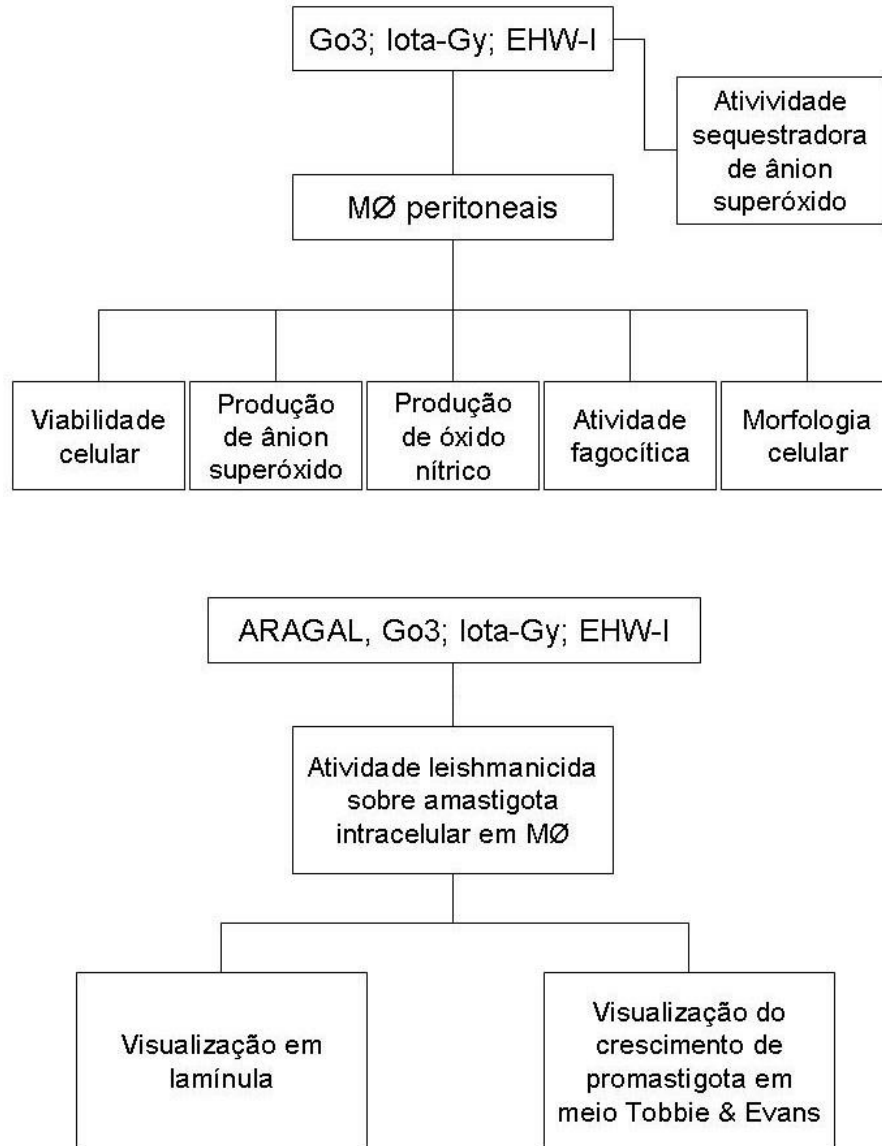


FIGURA 4 – ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

FONTE: O autor (2010)

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL E REAGENTES

Reagentes adquiridos da Merck do Brasil: Glucose, fosfato monobásico de potássio, fosfato monobásico de sódio, fosfato dibásico de potássio, fosfato dibásico de sódio, sulfato de magnésio heptahidratado, cloreto de potássio, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, fenol, dimetil-sulfóxido (DMSO), formaldeído, citrato de sódio, giemsa, entellan, acetona, xilol, tris (hidroximetil) aminometano (TRIS).

Reagentes adquiridos da Sigma Chemical Co (St Louis, MO): Brometo de 3-metil[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT), ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2'-etanossulfônico (HEPES), citocromo c de coração bovino, forbol 12-miristato, 13-acetato (PMA), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), nitroblue tetrazólio (NBT), fenazina metasulfato (PMS), lipopolissacarídeo (LPS), sulfanilamida, N-naftil etilenodiamino, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), actinomicina D, polimixina B, ácido pícrico.

Reagentes adquiridos da Cultilab (Campinas, SP): penicilina, estreptomicina, gentamicina, meio Eagle medium (MEM).

Outros reagentes de marcas diversas: Soro fetal bovino (Gibco®), ágar bacteriológico (Himedia®), peptona bacteriológica (Himedia®), extrato de carne (Himedia®), Glucantime® (Aventys®).

Materiais adquiridos da Millipore®: filtros Millex descartáveis de 0,22 μm de poro, membranas de acetato de celulose de 0,22 μm de poro.

Materiais adquiridos da BD® (Becton Drive): Seringas de plástico esterilizadas, agulhas 25 X 8 esterilizadas e seringas de vidro.

Materiais adquiridos da TPP® (Techno Plastic Products): placas de cultura esterilizadas multipoços, garrafas de cultura esterilizadas.

Os demais reagentes utilizados foram preparações comerciais de pureza analítica adequada. As soluções dos reagentes foram preparadas com água deionizada através de sistema ultrapurificador Gehaka®.

5.2 SOLUÇÕES E MEIOS

5.2.1 Solução salina tamponada (PBS)

A solução salina tamponada (PBS) em pH 7,4 foi preparada como solução estoque cinco vezes concentrada, sendo constituída por: Na_2PO_4 40,5 mM, KH_2PO_4 7,3 mM e $NaCl$ 680 mM. Esta solução concentrada foi esterilizada em autoclave a 120 °C, durante 30 minutos e armazenada em temperatura ambiente. Para o uso, a solução foi diluída em capela de fluxo laminar (VECO) com água ultrapura esterilizada. Todos os procedimentos que necessitaram de ambiente estéril foram realizados nesta capela.

5.2.2 Solução salina balanceada de Hank (HBSS)

A solução salina balanceada de Hank (HBSS) foi preparada através da mistura de duas soluções A e B, as quais foram preparadas na forma de soluções estoque vinte vezes concentradas. A solução A é constituída por $NaCl$ 2,737 M, KCl 104 mM, $CaCl_2$ 19,7 mM e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 16,2 mM e a solução B tem como constituintes Na_2HPO_4 8,4 mM, KH_2PO_4 8,7 mM, glucose 100 mM. As duas soluções foram misturadas e diluídas com água bidestilada ou água ultrapura e seu pH ajustado para 7,4. A solução resultante foi esterilizada por filtração em membrana estéril com poros de 0,22 μm em capela de fluxo laminar.

5.2.3 Citrato de sódio

O citrato de sódio foi solubilizado a 10% em água ultrapura e a solução foi esterilizada em autoclave a 120 °C, durante 30 minutos e armazenada a 4 °C.

5.2.4 Formalina

A solução de formalina foi preparada com 5% de formaldeído em água destilada e acondicionada em frasco de vidro a 4 °C.

5.2.5 Polissacarídeos

ARAGAL: Arabinogalactana de *Anadenanthera colubrina* (ARAGAL) utilizada no presente trabalho foi isolada e caracterizada por DELGOBO *et al.* (1999). Foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Marcelo Iacomini do Laboratório de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Paraná.

Go3: Heteroraminana sulfatada extraída da alga verde *Gayralia oxysperma*, a fração Go3 foi isolada e purificada no Laboratório de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Paraná (CASSOLATO *et al.*, 2008) e gentilmente cedida pelos professores Dr. Miguel Daniel Nosedá e Dr^a. Maria Eugênia Duarte Nosedá e pela Dr^a. Juliana Cassolato.

Iota-Gy: Galactana do tipo iota-kappa-nu-carragenana extraída da parede celular da alga vermelha *Gymnogongrus griffithsiae*. A amostra foi isolada e purificada no Laboratório de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Paraná, e apresentou características estruturais semelhantes a fração G3d (FARIA-TISCHER, 2006). Foi gentilmente cedida pelos professores Dr. Miguel Daniel Nosedá e Dr^a. Maria Eugênia Duarte Nosedá.

EHW-I: Galactana do tipo iota-nu-carragenana extraída da parede celular da alga vermelha *Eucheuma denticulatum*. A fração EHW-I foi isolada e purificada no Laboratório de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Paraná (DUCATTI, 2005) e gentilmente cedida pelos professores Dr. Miguel Daniel Nosedá e Dr^a. Maria Eugênia Duarte Nosedá e pelo Dr. Diogo R. B. Ducatti.

5.2.6 Soluções de polissacarídeos

Todas as soluções de polissacarídeos foram preparadas com água ultrapura na concentração 2 a 3 mg/mL. Antes da esterilização, a solução de ARAGAL foi filtrada em papel de filtro comum. Todas elas foram esterilizadas em filtro de 22 μ m estéreis em capela de fluxo laminar. Após a filtração, uma alíquota foi retirada para dosagem de carboidratos, com a finalidade de corrigir possíveis perdas do material por retenção no filtro. As soluções foram mantidas congeladas e posteriormente diluídas em meio de cultura para realização dos experimentos.

5.2.6.1 Dosagem de carboidratos totais

Para determinar a concentração de carboidratos totais das soluções de polisacarídeos, foi realizada a dosagem pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Esta dosagem baseia-se na formação de derivados furfural e hidroximetilfurfural a partir das pentoses e hexoses, respectivamente na presença dos reagentes obtendo-se complexo de cor alaranjada.

A formação do complexo foi verificada com leitura em espectrofotômetro (SHIMADZU UV2450) a 490 nm. Para realização dos cálculos foi realizada uma curva de calibração para cada dosagem, utilizando-se a solução padrão do monossacarídeo presente em maior quantidade no respectivo polissacarídeo.

5.2.7 Meio MEM

O meio mínimo essencial Eagle (MEM) (EAGLE, 1959) foi reconstituído em água ultrapura, suplementado com HEPES para concentração final de 20 mM e bicarbonato de sódio para concentração final 8 mM. O pH foi ajustado a 7,4. O meio foi então esterilizado por filtração sob pressão em membrana de acetato de celulose estéril com poro de 0,22 μm e mantido em geladeira. Foi adicionado 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina e soro fetal bovino a 5% ou 10%, que foram utilizados em macrófagos e *Leishmania (L.) amazonensis* respectivamente.

5.2.8 Meio Tobbie & Evans

Para o preparo de 100 mL de meio Tobbie & Evans foram pesados 2 g de ágar bacteriológico, 0,3 g de extrato de carne, 0,2 g de peptona bacteriológica e 0,8 g de *NaCl*. Todos os componentes foram transferidos para um erlenmeyer, adicionados de 100 mL de água destilada e a mistura foi fervida até a completa solubilização. Em seguida foram transferidos 2 mL para cada tubo de vidro com tampa de rosca. Os tubos foram autoclavados e, antes que resfriassem completamente, foram adicionados assepticamente de 0,2 mL de sangue estéril de coelho (certificado CEEA nº 389). O sangue foi coletado por punção cardíaca e, em capela de fluxo laminar, dispensado em frasco esterilizado contendo 10% do volume total de sangue em citrato de sódio a 10%.

5.3 CULTIVO CELULAR

5.3.1 Células

Neste projeto foram utilizadas as seguintes células: macrófagos peritoneais de camundongos e protozoários da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

5.3.1.1 Macrófagos peritoniais de camundongo

Para a obtenção dos macrófagos, foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas (*Mus musculus*), com 2 a 3 meses de idade. Os animais foram mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, submetidos a ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, sempre com água e ração Purina®, *ad libitum*. Para os procedimentos descritos a seguir foi obtida aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como pode ser visualizado no ANEXO A.

Os camundongos foram eutanasiados por asfixia com éter etílico. Após assepsia com álcool iodado e exposição do peritônio, aproximadamente 10 mL de PBS resfriado foram injetados na cavidade peritoneal com auxílio de seringa e agulha esterilizadas. Em seguida, foi realizada uma massagem vigorosa na região inoculada, o exsudato peritoneal foi aspirado e transferido para um tubo plástico esterilizado, sendo mantido em banho de gelo até a utilização. Posteriormente, as células foram centrifugadas (HITACHI CR21E) a 2000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” de células ressuspenso em meio MEM.

A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer, e em seguida, as células foram plaqueadas em placa de cultura esterilizada e colocadas para aderir durante uma hora a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 . Após a aderência as células foram lavadas duas vezes com PBS a 37 °C. Por este procedimento acima de 90% do total de células aderidas são macrófagos, não havendo necessidade de purificação (ADAMS, 1979). Após esta etapa, as condições dos experimentos variaram de forma adequada para cada situação experimental. As monocamadas de células foram rotineiramente observadas em microscópio invertido (OLYMPUS MOD. CK2).

5.3.1.2 *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

A cultura de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* foi mantida, logo após o descongelamento, em meio Tobbie & Evans por dois ou três repiques. Depois foi passada para garrafas de cultura contendo meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Em ambos os meios, a cultura foi mantida em estufa (FANEM 502A) de 25-27 °C.

5.3.2 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT, como descrito por REILLY *et al.*, (1998). Neste método, o MTT, brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio, é reduzido em células metabolicamente ativas por desidrogenases mitocondriais. Nesta reação é formado cristal de formazan, um produto de cor roxa solúvel em DMSO (REILLY *et al.*, 1998).

Os macrófagos peritoneais foram plaqueados a 5.10^5 células/poço em placas de 96 poços. Após a adesão, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas uma vez com PBS e foi adicionado o meio de cultura contendo diferentes concentrações dos polissacarídeos. Após os tempos de incubação o sobrenadante foi retirado e adicionado 180 μ L de HBSS e 20 μ L de solução de MTT 5 mg/mL. Após 3 horas de incubação a 37 °C com 5% de CO_2 , o sobrenadante foi removido e o cristal de formazan formado foi dissolvido em DMSO. Foi realizada a leitura em leitor de microplaca (TECAN INFINITE M200) a 550 nm.

5.3.3 Determinação do efeito dos polissacarídeos na produção de ânion superóxido

Para avaliar a produção de ânion superóxido pelos macrófagos foi utilizado o protocolo descrito por SASADA *et al.* (1983). Neste procedimento a presença de ânion superóxido é medida através da redução extracelular do citocromo c. Como controle positivo, macrófagos peritoneais de camundongos foram incubados na presença de PMA (1 μ g/mL) (SASADA; PABST; JOHNSTON, 1983). Essas células foram plaqueadas a 5.10^5 células/poço em placa de 96 poços e deixadas para aderir por 2 horas a 37 °C, 5% de CO_2 . Em seguida foi retirado o meio de cultura e adicionados os polissacarídeos dissolvidos em meio de reação, constituído por citocromo c 80 μ M em HBSS. Após 2 horas de incubação a 37 °C, 5% de CO_2 foi feita a leitura em leitor de

microplaca a 550 nm. A concentração de citocromo c reduzido, que corresponde a concentração de ânion superóxido produzido pelos macrófagos, foi determinada utilizando o Coeficiente de Extinção Molar para a mistura citocromo C oxid.red.de = $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (JOHNSTON; GODZIK; COHN, 1978). Experimentos paralelos foram conduzidos nas mesmas condições com a presença de PMA $1 \mu\text{g/mL}$ concomitante aos tratamentos com os polissacarídeos.

5.3.4 Determinação da atividade sequestradora de ânion superóxido

A capacidade sequestradora do radical superóxido foi avaliada pelo método descrito por Nishimiki e colaboradores (1972), com algumas modificações. Neste ensaio, radicais superóxido gerados em presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e fenazina metassulfato (PMS) reduzem o nitroblue tetrazolium (NBT) (NISHIKIMI; RAO; YAGI, 1972). O sistema de reação foi constituído de tampão TRIS-HCL 10 mM (pH 8,0), NADH $340 \mu\text{M}$, NBT $72 \mu\text{M}$ e PMS $30 \mu\text{M}$. A reação foi acompanhada a 560 nm durante 5 minutos e a capacidade sequestradora do radical superóxido foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Capacidade sequestradora (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}}\right) * 100$$

(Qi *et al.*, 2005)

5.3.5 Determinação do efeito da produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi medida pela dosagem de seus produtos de degradação mais estáveis, nitrito e nitrato, pelo método de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo assim ser analisado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm .

Os macrófagos peritoneais foram plaqueados a $5 \cdot 10^5$ células/poço em placas de 96 poços. Após a aderência foi retirado o meio e adicionado o meio de cultura com diferentes concentrações dos polissacarídeos. Como controle positivo de produção de óxido nítrico foi utilizado LPS na concentração 100 ng/mL , que foi previamente sonificado em banho de ultrassom (UNIQUE) por dois ciclos de 15 minutos antes das

diluições. Passadas 48 horas de incubação a 37 °C e 5% CO_2 , o meio sobrenadante foi misturado na proporção 1:1 com reagente de Griess. Este reagente é constituído pela mistura de duas soluções A e B na proporção 1:1, imediatamente antes do uso. A solução A é constituída por: naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v), e a solução B por sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v). Após reagir por 10 minutos, foi realizada a leitura em leitor de microplaca utilizando filtro de 550 nm.

5.3.6 Determinação do efeito da atividade fagocítica

Para medir a capacidade fagocítica, leveduras obtidas a partir de fermento biológico, foram preparadas por 3 lavagens consecutivas em PBS estéril, pH 7,4 e mantidas a 4 °C até utilização. Macrófagos peritoneais foram plaqueados a $5 \cdot 10^5$ células/poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis. Após a aderência foi retirado o meio e adicionado o meio de cultura com diferentes concentrações dos polissacarídeos. Após 48 horas, o sobrenadante foi descartado e as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas duas vezes com PBS e, em seguida, foram incubadas com leveduras na proporção de 5 leveduras para cada macrófago por uma hora. Elas foram então lavadas três vezes com PBS, para retirada das leveduras que não foram fagocitadas. Em seguida foram executados os procedimentos de preparação para microscopia óptica. As células foram fixadas com Bouin por 5 minutos, lavadas duas vezes com álcool 70% e mais duas vezes com água destilada. As lamínulas foram então coradas com Giemsa por uma hora e montadas com Entellan. Para obter o número de leveduras fagocitadas/macrófagos as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (BEL Photonics).

5.3.7 Análises morfológicas

Macrófagos peritoneais foram plaqueados a $5 \cdot 10^5$ células/poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis. Os macrófagos tratados com os polissacarídeos foram mantidos em meio MEM acrescido de diferentes concentrações destes, enquanto que os macrófagos do grupo controle, apenas em meio MEM completo. Após 48 horas, o sobrenadante foi descartado e as lamínulas contendo as monocamadas de macrófagos foram lavadas duas vezes com PBS. Em seguida foram executados os procedimentos para microscopia óptica como descrito no ítem 5.3.6.

5.3.8 Atividade Leishmanicida

5.3.8.1 Avaliação da atividade leishmanicida em amastigota por visualização em lamínula

Os macrófagos foram e plaqueados a $5 \cdot 10^5$ em placas de 24 poços contendo lamínulas e deixados para aderir *overnight* a 37 °C, 5% de CO_2 . Os parasitas da espécie *Leishmania (L.) amazonensis* foram então centrifugados e adicionados sobre os macrófagos na proporção de 5 parasitas por macrófago. Após 12 horas de incubação a 34 °C em presença de CO_2 , o meio de cultura foi retirado, o poço foi lavado 3 vezes com PBS estéril e foram adicionadas soluções com diferentes concentrações dos polissacarídeos. Após 48 horas de incubação a 37 °C, 5% de CO_2 , o meio foi retirado e cada poço foi novamente lavado 3 vezes com PBS. Em seguida as lamínulas foram preparadas para microscopia óptica, como descrito no item 5.3.6 e analisadas em microscópio óptico (BEL Photonics). Como controle positivo de atividade leishmanicida foi utilizado o antimoniato de meglumina (Glucantime®) na concentração 300 $\mu\text{g/mL}$.

5.3.8.2 Avaliação da atividade leishmanicida sobre amastigota por visualização do crescimento de promastigota em meio Tobbie & Evans

Estes experimentos foram realizados como descrito acima, com a diferença de não haver lamínulas nos poços. Passado o período infecção, o meio com os parasitas que não infectaram foi retirado e foi adicionado o meio de cultura com diferentes concentrações dos polissacarídeos. Após 48 horas de incubação 37 °C com 5% de CO_2 o meio foi retirado e foi adicionado 400 μL de soro fisiológico em cada poço. O conteúdo dos poços foi raspado e transferido a tubos de meio Tobbie & Evans. Os tubos foram mantidos em estufa 25-27 °C por 5 a 10 dias e em seguida foi realizada a contagem em hemocítômetro. Como controle positivo de atividade leishmanicida foi utilizado o antimoniato de meglumina (Glucantime®) na concentração 300 $\mu\text{g/mL}$.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos testes de atividade biológica *in vitro* foram submetidos à análise de variância ANOVA (fator duplo) e teste de Tukey, para comparação das médias. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (média \pm DP)

ou como média \pm erro padrão (média \pm EP). Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

6.1.1 Efeitos na viabilidade celular

Com a finalidade de aprofundar-se nos conhecimentos sobre os efeitos de diferentes polissacarídeos como moduladores da resposta biológica, inicialmente as moléculas em estudo foram avaliadas para estabelecer as concentrações ideais de incubação dos polímeros com as células, sem afetar a viabilidade celular. Para a determinação da citotoxicidade dos polissacarídeos sobre macrófagos peritoneais, estas células foram expostas a diferentes concentrações de Go3, Iota-Gy e EHW-I nos tempos de 2 e 48 horas. Os resultados obtidos estão representados nas figuras 5 e 6.

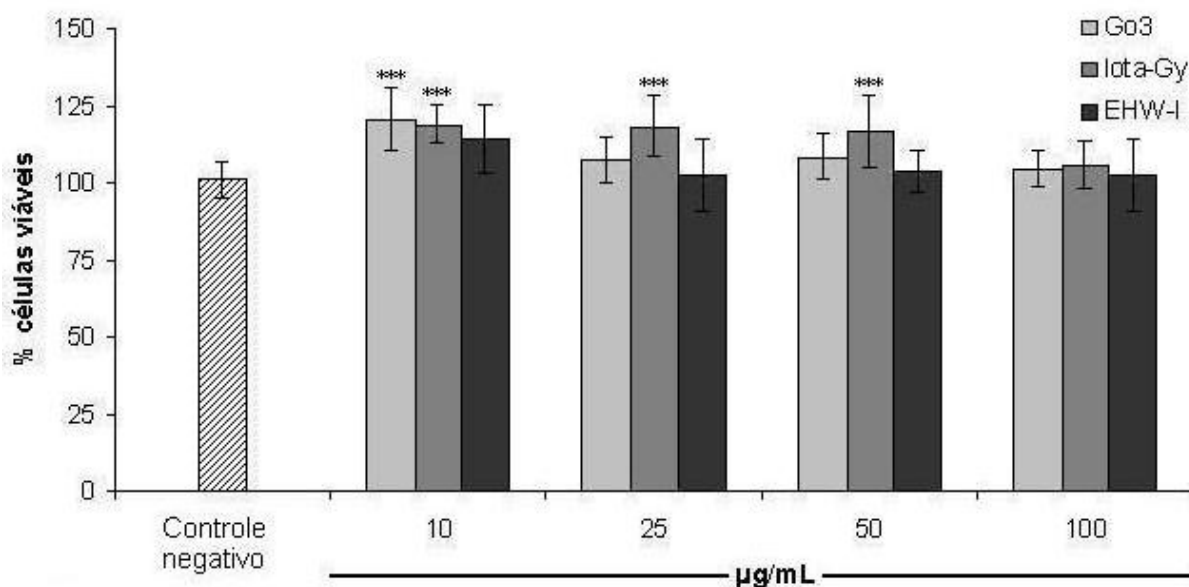


FIGURA 5 – EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS APÓS 2 HORAS DE EXPOSIÇÃO

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Viabilidade celular determinada pelo teste do MTT. Macrófagos peritoneais de camundongos foram expostos por 2 horas aos polissacarídeos Go3, Iota-Gy e EHW-I nas concentrações indicadas. Após 3 horas de incubação com MTT, este foi removido e adicionou-se DMSO. Como controle negativo foi utilizado apenas meio de cultura MEM. A absorbância foi medida em 550 nm. 100% de viabilidade corresponde à viabilidade determinada para o controle negativo. Os resultados estão expressos como média \pm DP ($n = 3$, sendo cada experimento em quadruplicata). *** Diferença significativa do controle negativo: ($p \leq 0,01$).

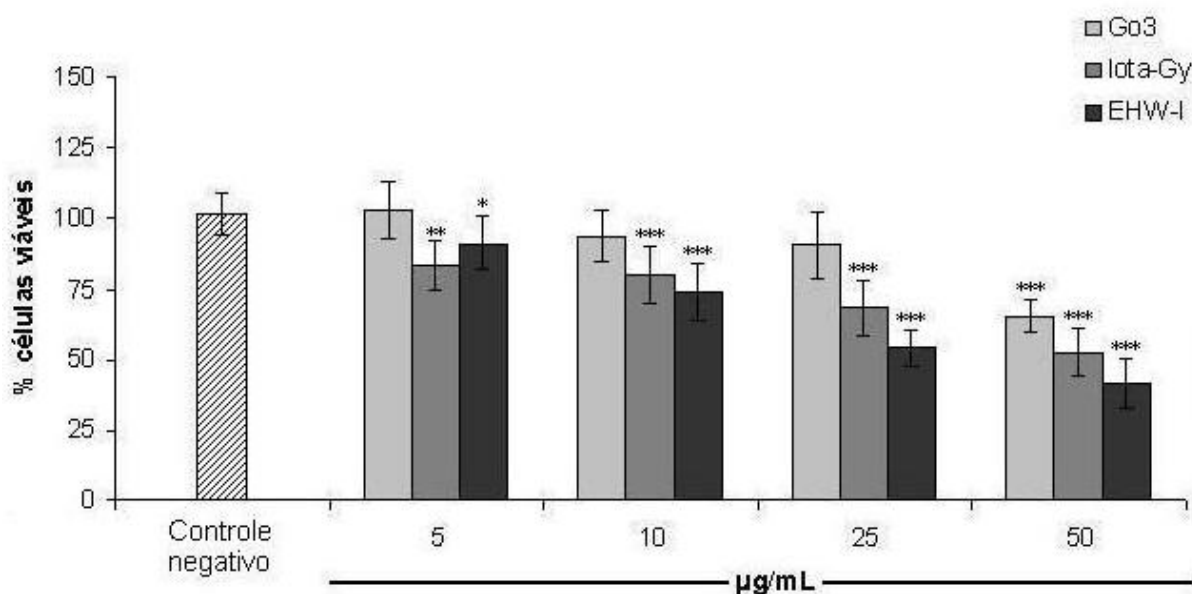


FIGURA 6 – EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS APÓS 48 HORAS DE EXPOSIÇÃO

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Viabilidade celular determinada pelo teste do MTT. Macrófagos peritoneais de camundongos foram expostos por 48 horas aos polissacarídeos Go3, Iota-Gy e EHW-I nas concentrações indicadas. Após 3 horas de incubação com MTT, este foi removido e adicionou-se DMSO. Como controle negativo foi utilizado apenas meio de cultura MEM. A absorbância foi medida em 550 nm. 100% de viabilidade corresponde à viabilidade determinada para o controle negativo. Os resultados estão expressos como média \pm DP ($n = 4$, sendo cada experimento em triplicata). *, **, *** Diferença significativa do controle negativo: ($p \leq 0,05$), ($p \leq 0,02$), ($p \leq 0,01$) respectivamente.

Para o período de 2 horas de exposição (figura 5) pode-se observar que não houve citotoxicidade para nenhum dos polissacarídeos nas concentrações testadas, que variaram de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Para o tempo de exposição de 48 horas foram testadas concentrações de 5 a 50 $\mu\text{g/mL}$, como mostra a figura 6. Go3 diminuiu a viabilidade celular significativamente, para 65%, apenas na última concentração, de 50 $\mu\text{g/mL}$. Para Iota-Gy e EHW-I a diminuição ocorreu a partir da concentração 10 $\mu\text{g/mL}$ sendo que EHW-I apresentou toxicidade ligeiramente maior, apresentando 41% de viabilidade em 50 $\mu\text{g/mL}$ contra 53% na mesma condição para o Iota-Gy.

A heteroraminana sulfatada, Go3, e as galactanas sulfatadas, Iota-Gy e EHW-I, exibiram maior toxicidade para macrófagos peritoneais de camundongos quando comparadas a outros polissacarídeos de diferentes classes. Manana de *Saccharomyces cerevisiae* (MPOLY) e a galactomanana do líquen *Ramalina celastri* (GM-POLY) não afetaram a viabilidade, em concentrações 0,5 a 2 mg/mL durante 2 horas

de incubação (NOLETO, 2002). O autor constatou que nos períodos de 24 e 48 horas, GMPOLY nas concentrações de 2 mg/mL e 0,25 a 0,75 mg/mL, respectivamente afetou a viabilidade destas células em aproximadamente 20% para ambos os tempos de incubação. A arabinogalactana ARAGAL não mostrou ser tóxica em concentrações até 300 $\mu\text{g/mL}$ em até 5 horas de incubação para macrófagos (MORETÃO *et al.*, 2003, 2004). ROSÁRIO *et al.*, (2008) avaliaram os efeitos de xiloglucanas de sementes de *Copaifera langsdorffii* (XGC), *Hymenaea courbaril* (XGJ) e *Mucuna sloanei* (XGM) em macrófagos peritoneais de camundongos. Neste estudo os autores, verificaram que os três polímeros nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ a 500 $\mu\text{g/mL}$ não afetaram a viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos em um período de exposição de 2 horas. Já para o período de 48 horas, apenas XGC e XGJ diminuíram a viabilidade em cerca de 30% para concentrações acima de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Determinadas as concentrações não tóxicas, iniciou-se a avaliação do perfil de atividade dos polímeros Go3, Iota-Gy e EHW-I sobre macrófagos peritoneais de camundongos. O polímero ARAGAL já havia sido avaliado quanto a capacidade de modulação das funções de macrófagos (MORETÃO *et al.*, 2003, 2004).

6.1.2 Efeitos na produção de ânion superóxido

Primeiramente, foi avaliada a capacidade dos polissacarídeos interferirem no “burst” oxidativo, que é um processo caracterizado pelo aumento rápido no consumo de oxigênio onde há produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BADWEY; KARNOVSKY, 1980). Este parâmetro pode ser avaliado através da quantificação de seus produtos, $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . No presente estudo, foi avaliada a produção de $O_2^{\bullet-}$ pelos macrófagos peritoneais de camundongos, incubados com os polissacarídeos durante 2 horas, pelo método de redução extracelular do citocromo c. Pode-se observar na figura 7, que a detecção de $O_2^{\bullet-}$ foi inferior ao controle negativo, incubado apenas com meio de reação. Estes resultados indicam uma diminuição do “burst” oxidativo.

Modificadores da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) vêm sendo descritos desde muito tempo. Em 1987, foi constatado que o DPI (*diphenyleneiodonium*) inibiu em 50% a produção de $O_2^{\bullet-}$ de macrófagos peritoneais intactos estimulados por PMA (HANCOCK; JONES, 1987). Este estudo sugeriu que tal atividade tivesse relação com a NADPH oxidase. A toxina letal de Anthrax foi descoberta como potente ativador do “burst” oxidativo em macrófagos RAW 264.7 (HANNA *et al.*, 1994). No

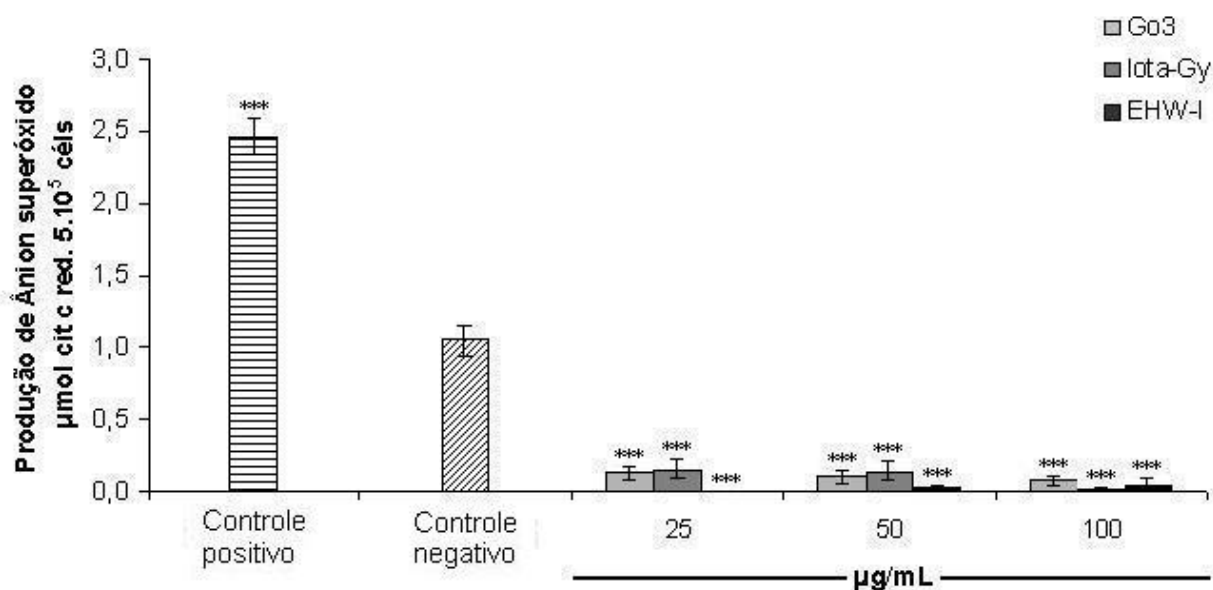


FIGURA 7 – PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Produção de ânion superóxido determinada pela redução extracelular do citocromo c. Macrófagos peritoneais de camundongos foram expostos por 2 horas aos polissacarídeos Go3, Iota-Gy e EHW-I nas concentrações indicadas diluídos em meio de reação, constituído por citocromo c 80 μM em HBSS. Como controle positivo foi usado 1 μg/mL de PMA em meio de reação e apenas este meio como controle negativo. A absorbância foi medida em 550 nm. A concentração de citocromo c reduzido, que corresponde a concentração de ânion superóxido produzido pelos macrófagos, foi determinada utilizando o Coeficiente de Extinção Molar para a mistura citocromo C oxid.red.de = $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados estão expressos como média ± EP (n = 4, sendo cada experimento em quadruplicata). *** Diferença significativa do controle negativo: (p ≤ 0,01).

mesmo estudo, linhagens de macrófagos com deficiência na produção de espécies reativas de oxigênio apresentaram relativa insensibilidade a esta toxina. Mais recentemente, foi descoberto que o monóxido de carbono inibe a citocromo c oxidase, levando a produção de baixos níveis de ROS (ZUCKERBRAUN *et al.*, 2007).

Os principais estudos visando avaliar a interferência de polissacarídeos no “burst” oxidativo foram realizados com zimosana, uma mistura de manana e glucana. Esta preparação é capaz de induzir esta via em macrófagos (BADWEY; KARNOVSKY, 1980; BERTON; GORDON, 1983; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Ativação do “burst” oxidativo foi também observada para a arabinogalactana isolada da planta *Phyllanthus niruri*, sendo este efeito de magnitude três vezes superior (na concentração de 250 μg/mL) quando comparado ao controle, indicando que o polímero em sua forma nativa foi mais eficiente na ativação do “burst” oxidativo (MELLINGER *et al.*, 2005). A mesma

arabinogalactana, a 250 $\mu\text{g/mL}$, após tratamento com *HCL*, apresentou estímulo da produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ duas vezes mais que o controle (MELLINGER *et al.*, 2008). Para as xiloglucanas de sementes de *Copaifera langsdorffii* (XGC), *Hymenaea courbaril* (XGJ) e *Mucuna sloanei* (XGM), apesar de ser observado uma discreta tendência de aumento na produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ com o aumento na concentração destes polissacarídeos, esta não foi estatisticamente significativa (ROSÁRIO *et al.*, 2008).

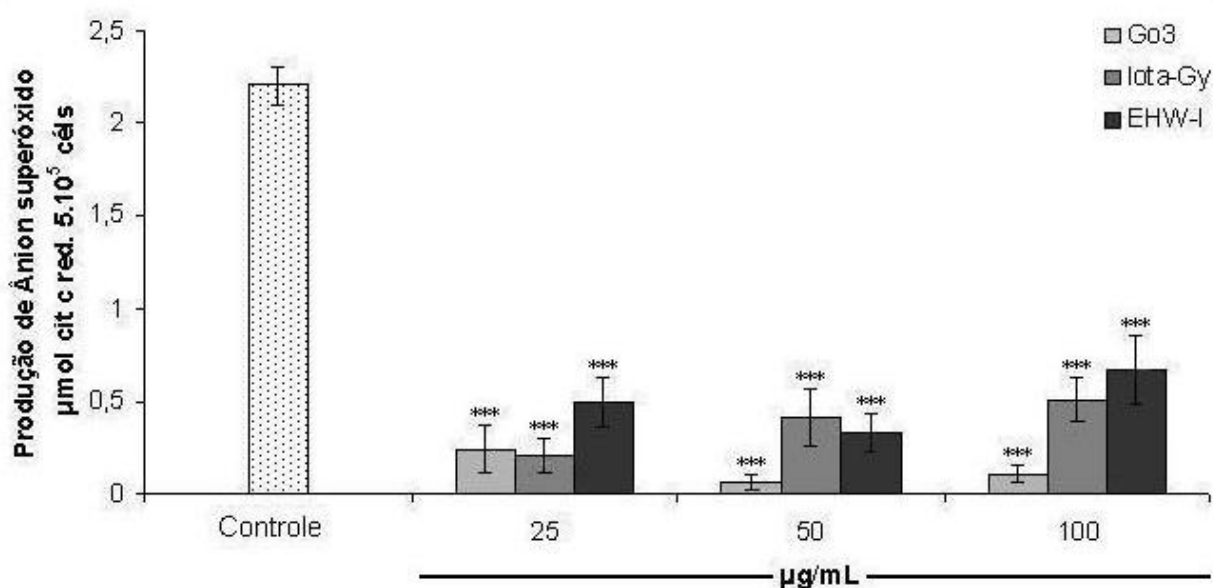


FIGURA 8 – PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I NA PRESENÇA DE PMA

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Produção de ânion superóxido determinada pela redução extracelular do citocromo c. Macrófagos peritoneais de camundongos foram expostos por 2 horas aos polissacarídeos Go3, Iota-Gy e EHW-I nas concentrações indicadas diluídos em meio de reação, constituído por citocromo c 80 μM em HBSS na presença de PMA 1 $\mu\text{g/mL}$. Como controle foi usado 1 $\mu\text{g/mL}$ de PMA em meio de reação. A absorbância foi medida em 550 nm. A concentração de citocromo c reduzido, que corresponde a concentração de ânion superóxido produzido pelos macrófagos, foi determinada utilizando o Coeficiente de Extinção Molar para a mistura citocromo C oxid.red.de = $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados estão expressos como média \pm EP (n = 3, sendo cada experimento em quadruplicata). *** Diferença significativa do controle: ($p \leq 0,01$).

A arabinogalactana ARAGAL, inoculada intraperitonealmente a 200 mg/Kg e após 7 dias os macrófagos peritoneais foram coletados e incubados com citocromo c por 0 a 60 minutos. Para esta condição experimental, foi observada ativação da produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$, chegando a cerca de 70% acima da produção dos macrófagos de camundongos não tratados após de 45 minutos de incubação. Quando esta incubação foi realizada na presença de PMA 1 $\mu\text{g/mL}$, foi observado efeito sinérgico do ARAGAL, chegando a 48% de produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ acima do controle (animais não tratados)

(MORETÃO *et al.*, 2003).

Efeitos semelhantes foram encontrados para os polissacarídeos GMPOLY (galactomanana do líquen *Ramalina celastri*) e MPOLY (manana de *Saccharomyces cerevisiae*), que foram capazes de inibir o “burst” oxidativo na presença de PMA. GMPOLY, na concentração 1 mg/mL foi capaz de inibir a produção de ânion superóxido em 90% (NOLETO *et al.*, 2002), e MPOLY, a 2 mg/mL foi capaz de diminuir a quantidade de ânion superóxido detectável em 80% comparando com o controle (NOLETO *et al.*, 2004). O complexo destes polissacarídeos com íon vanádilo apresentou atividade em concentrações mais baixas, sendo capaz de inibir a produção de ânion superóxido em 50% a 2,5 $\mu\text{g/mL}$ para ambos os compostos. Nestes estudos não foi observado nenhum efeito dos compostos no burst oxidativo na ausência de PMA (NOLETO *et al.*, 2002, 2004).

Para confirmar o efeito inibitório do “burst” oxidativo, foram realizados experimentos paralelos, nos quais os macrófagos foram expostos aos polissacarídeos juntamente com PMA, o controle positivo para produção de ânion superóxido. Na figura 8 observamos que os três compostos foram capazes de diminuir expressivamente a detecção de $O_2^{\bullet-}$ quando as células foram concomitantemente estimuladas pelo PMA. Esta diminuição foi de cerca de 90% para Go3, 80% para Iota-Gy e 70% para EHW-I quando comparados com o controle.

A partir do resultado obtido no presente trabalho, foi considerada a possibilidade dos polissacarídeos estarem atuando como sequestrador de $O_2^{\bullet-}$. Para comprovar esta possível atividade, foram realizados ensaios *in vitro*, livre de células, baseados na capacidade do polissacarídeo inibir a redução de NBT por ânion superóxido gerado no meio de reação (QI *et al.*, 2005; DRÁBIKOVÁ *et al.*, 2009; SCHEPETKIN *et al.*, 2009). A figura 9 mostra os resultados desta avaliação. É possível observar que os três polissacarídeos apresentaram atividade antioxidante, evidenciada pela intensa inibição da redução do NBT pelo ânion superóxido gerado no meio de reação. Esta atividade mostrou-se de forma dose dependente, alcançando, na máxima concentração (10 $\mu\text{g/mL}$) a 33% de captação com o Go3, 44% com o Iota-Gy e 55% com o EHW-I. A partir destes resultados pode-se constatar que os polissacarídeos testados (Go3, Iota-Gy e EHW-I) apresentaram efeito inibidor do “burst” oxidativo com comprovada atividade sequestradora de ânion superóxido.

Esta atividade foi mais intensa que a encontrada em estudos anteriores, nos quais a capacidade sequestradora de $O_2^{\bullet-}$ foi encontrada para polissacarídeos sulfa-

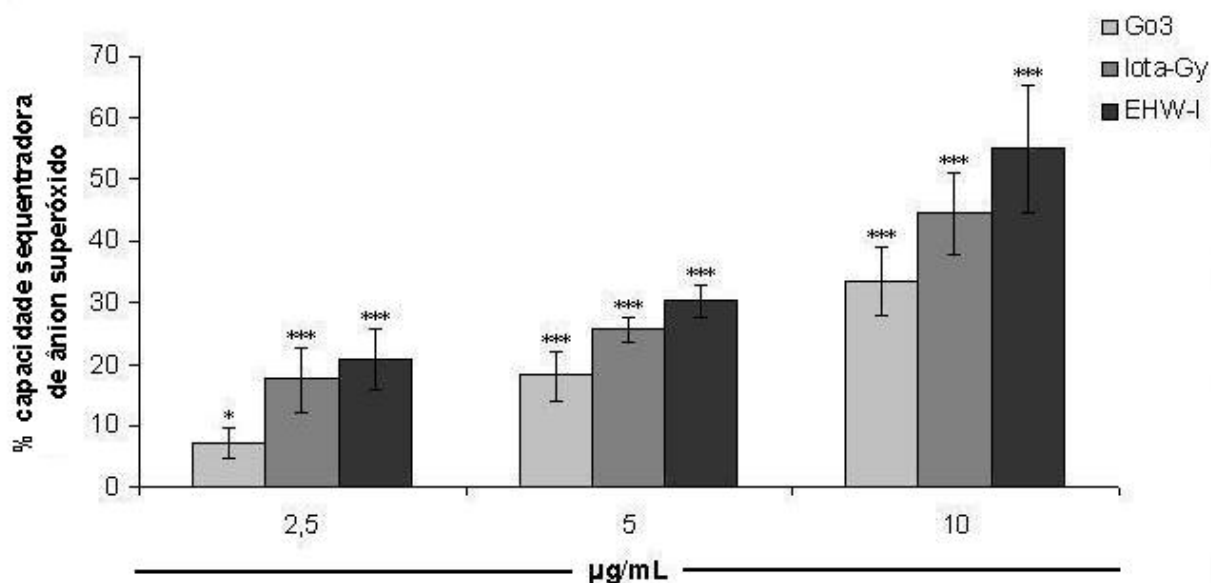


FIGURA 9 – ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE ÂNION SUPERÓXIDO DOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I

FONTES: O autor (2010)

NOTA: Sistema de reação: TRIS-HCl 10 mM, pH 8,0, NADH 340 µM, NBT 72 µM e PMS 30 µM. A reação foi iniciada pela adição de NADH 10 mM na ausência (controle) e na presença dos polissacarídeos Go3, Iota-Gy e EHW-I nas concentrações indicadas. Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 3, sendo cada experimento em triplicata). *, *** Diferença significativa do controle: (p ≤ 0,05), (p ≤ 0,01) respectivamente.

tados. Uma homofucana da alga marrom *Fucus vesiculosus*, duas frações de heterofucanas (F0.5 e F1.1) da alga marrom *Padina gymnospora* e três galactanas, lambda-, kappa- e iota-carragenanas das algas vermelhas *Gigartina acicularis*, *Eucheuma cottonii* e *E. spinosa* respectivamente foram testadas pelo mesmo método utilizado no presente trabalho. A concentração necessária para 50% de atividade sequestradora de $O_2^{\bullet-}$ foi 0,058; 0,243; 0,243; 0,046; 0,332; 0,112 mg/mL respectivamente (SOUZA *et al.*, 2007).

O polissacarídeo sulfatado extraído da microalga vermelha *Rhodella reticulata* apresentou cerca de 40% de atividade sequestradora de $O_2^{\bullet-}$ a 1,6 mg/mL (CHEN *et al.*, 2009a). Já a extração aquosa a quente da alga *Sargassum hemiphyllum* exibiu 50% de atividade sequestradora de $O_2^{\bullet-}$ na concentração 2,41 mg/mL (HWANG *et al.*, 2010).

Além de sequestro de ânion superóxido, já foram encontrados outros tipos de atividade antioxidante para polissacarídeos. TSIAPALI *et al.* (2001) relataram efeitos antioxidantes em diversos polissacarídeos. Pululana, manana, dextrana e glucanofosfato e os monossacarídeos glucose e manose, que compõe esses polímeros, foram

testados para proteção de β -ficoeritina contra oxidação por AAPH. Foi encontrado que os polissacarídeos apresentam maior poder protetor que seus respectivos monossacarídeos. Este estudo sugere que esta diferença de atividade antioxidante se deve a maior facilidade de retirada de próton do carbono anomérico do polímero do que das unidades monossacarídicas livres (TSIAPALI *et al.*, 2001).

O polissacarídeo purificado da semente de *Plantago asiatica* L., que contém ácido urônico em sua composição na concentração 145,8 g/Kg, foi testado para sequestro do radical DPPH, sequestro de $O_2^{\bullet-}$ gerado por autooxidação de 1,2,3-fentriol, sequestro de radical hidroxila e inibição da lipoperoxidação. A concentração necessária para 50% de atividade (IC_{50}) foi 0,44; > 8; 3,46 e 1 mg/mL para as atividades citadas respectivamente (YIN *et al.*, 2010).

Para outros polissacarídeos sulfatados também já foi observada atividade antioxidante. Polissacarídeo extraído da parede celular da microalga vermelha *Porphyridium* sp. apresentou 45% de inibição da autooxidação do ácido linolênico em 2 mg/mL e 87% para 10 mg/mL (TANNIN-SPITZ *et al.*, 2005). O mesmo polissacarídeo protegeu células 3T3 do dano oxidativo causado por $FeSO_4$. Esta atividade foi evidenciada pela conservação da morfologia em microscopia eletrônica destas células tratadas com o polissacarídeo na presença de $FeSO_4$ comparada à morfologia de células tratadas apenas com $FeSO_4$ e células não tratadas (TANNIN-SPITZ *et al.*, 2005).

Outro estudo avaliou a atividade antioxidante de diferentes polissacarídeos sulfatados isolados de 11 espécies de algas, através da redução do Molibidênio VI (Mo (VI)) a Molibidênio V (Mo (V)) (COSTA *et al.*, 2010). Todos os compostos apresentaram atividade antioxidante total, sendo que a mais expressiva foi encontrada para o polissacarídeo extraído da alga vermelha (Rodophyta) *Gracilaria caudata*, com 53,9 mg/g em equivalentes de ácido ascórbico (COSTA *et al.*, 2010). Os mesmos 11 polissacarídeos foram testados para as atividades captadora de radical hidroxil pelo teste de inibição da reação de Fenton, e captadora de ânion superóxido pelo teste de inibição da redução de NBT. No primeiro teste, foi encontrada atividade em 4 polissacarídeos, sendo que o polissacarídeo da alga *Caulerpa sertularioides* apresentou a atividade mais expressiva de captação de radical hidroxila alcançando 1,8% a 0,5 mg/mL. Para o segundo teste foi encontrada atividade para 5 polissacarídeos, sendo que a mais intensa foi de 9,4% de captação de ânion superóxido para o polissacarídeo de *Dictyota cervicornis* a 0,5 mg/mL (COSTA *et al.*, 2010).

6.1.3 Efeitos na produção de óxido nítrico

O passo seguinte no presente estudo foi avaliar a produção de óxido nítrico, outra via de fundamental importância para os macrófagos executarem sua função, como células efetoras nos processos de defesa do organismo. Esta atividade leva mais tempo para se iniciar, em comparação a via de produção de $O_2^{\bullet-}$, devido a necessidade de expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), não expressa em grande quantidade em macrófagos não ativados (KORHONEN *et al.*, 2005). A produção de óxido nítrico permanece por longos períodos de tempo e os macrófagos utilizam esta via para eliminar microorganismos fagocitados e, em especial parasitas, como por exemplo, *Leishmania* (BOGDAN, 2001; KORHONEN *et al.*, 2005). Aumento na produção de *NO* ocorre frente a diferentes estímulos, sendo que os agentes mais eficazes são o interferon- γ e o LPS (STUEHR; MARLETTA, 1985; BEUTLER, 2004), os quais são rotineiramente utilizados como controle positivo de ativação desta via.

Alguns polissacarídeos vêm se destacando como ativadores da produção de *NO*. As β -glucanas, que são polissacarídeos mais estudados quanto a capacidade de modulação da resposta biológica (BOHN; BeMILLER, 1995), são eficazes na ativação da produção de *NO* (AKRAMIENE *et al.*, 2007). Acemannan, uma manana isolada de *Aloe vera*, estimulou a produção de 15 μmol de nitrito/mg proteína na concentração 200 $\mu\text{g/mL}$ na presença de 1 U/mL de INF- γ em macrófagos da linhagem RAW 264.7 (RAMAMOORTHY; KEMP; TIZARD, 1996).

Para a avaliação desta atividade, macrófagos peritoneais de camundongos foram expostos aos polissacarídeos Go3, Iota-Gy e EHW-I por 48 horas. Os resultados de tais experimentos estão apresentados na figura 10. O polissacarídeo Go3 estimulou a produção de *NO* em aproximadamente 123, 116 e 110% nas concentrações de 2,5, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, quando comparado com o controle sem estímulo (somente meio). Estes valores são estatisticamente iguais ao estímulo com LPS 100 ng/mL (controle positivo) (figura 10A). O polímero EHW-I apresentou atividade menos intensa, alcançando aproximadamente 81% com a maior concentração (10 $\mu\text{g/mL}$), em relação ao controle com meio. Na figura 10B observa-se que, para o Iota-Gy a ativação foi de aproximadamente 71% para 10 $\mu\text{g/mL}$, em relação ao respectivo controle negativo (meio).

Os efeitos dos polissacarídeos Go3, Iota-Gy e EHW-I sobre a produção de *NO* foram de maior magnitude quando comparado aos descritos para diferentes classes de polissacarídeos. MPOLY, manana isolada de *S. cerevisiae* estimulou a produção

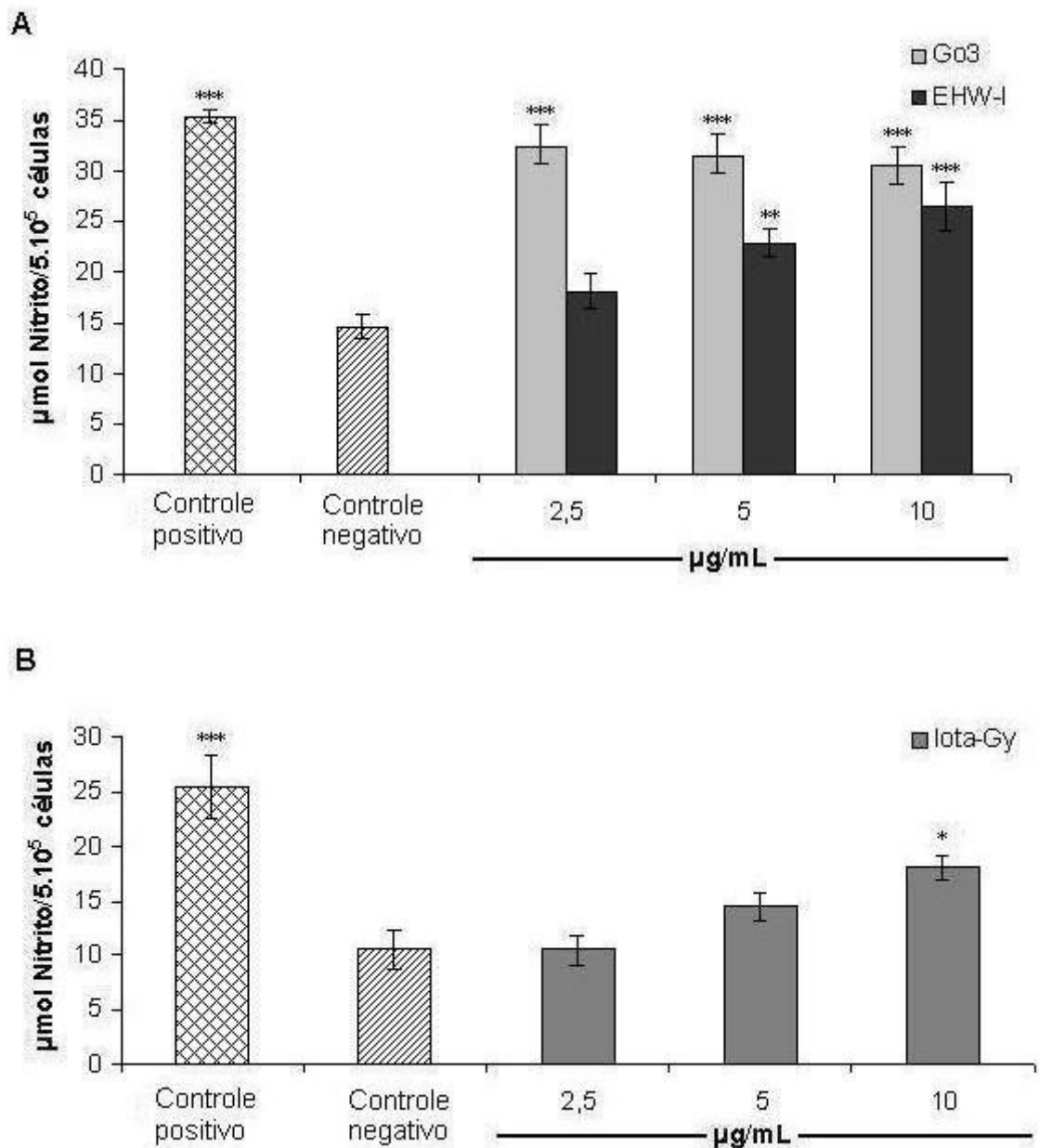


FIGURA 10 – PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS APÓS 48 HORAS DE EXPOSIÇÃO AOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Produção de óxido nítrico determinada pela dosagem de nitritos pelo método de Griess. Macrófagos peritoneais de camundongos foram expostos por 48 horas aos polissacarídeos Go3 e EHW-I (A) e Iota-Gy (B) nas concentrações indicadas. Como controle positivo foi usado de LPS e (100 ng/mL) como controle negativo foi utilizado apenas meio de cultura MEM. A absorbância foi medida em 550 nm. A concentração de nitrito, que corresponde à concentração de óxido nítrico produzido pelos macrófagos, foi determinada utilizando uma curva de calibração com padrão de nitrito realizada no dia da leitura. Os resultados estão expressos como média \pm EP (n = 3, sendo cada experimento em triplicata). *, **, *** Diferença significativa do controle negativo: ($p \leq 0,05$), ($p \leq 0,02$), ($p \leq 0,01$) respectivamente.

de *NO* em aproximadamente 40% nas concentrações de 10 a 1200 $\mu\text{g/mL}$, em relação ao controle negativo (NOLETO *et al.*, 2004). GMPOLY, galactomanana isolada do líquen *Ramalina celastri*, nas concentrações de 10 a 250 $\mu\text{g/mL}$ aumentou em aproximadamente 40% a produção de nitrito de macrófagos peritoneais de camundongos em relação as células não tratadas (NOLETO *et al.*, 2002). Em ambos os estudos não foi observado um perfil de ativação dose dependente para os polissacarídeos MPOLY e GMPOLY. A arabinogalactana ARAGAL não exibiu efeito sobre a produção de *NO* de macrófagos isolados de camundongos tratados *in vivo* com este polímero (MORETÃO *et al.*, 2003).

A intensidade do efeito promovido pelos polissacarídeos estudados no presente trabalho, porém, foi menor que a encontrada para o polissacarídeo ácido isolado de *Phellinus linteus*. Na concentração 10 $\mu\text{g/mL}$, este polímero aumentou a produção de óxido nítrico em macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos de maneira estatisticamente igual ao tratamento com LPS (500 ng/mL) (KIM *et al.*, 2004).

Já as xiloglucanas isoladas de sementes de *Copaifera langsdorffii* (XGC), *Hymenaea courbaril* (XGJ) e *Mucuna sloanei* (XGM), apresentaram diferenças de intensidade de efeito entre si sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos. Foi observado um aumento de aproximadamente 262% a 307% para XGC e de aproximadamente 68% a 92% para XGJ para concentrações de 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao controle somente com meio. XGM não exerceu efeito sobre a produção de óxido nítrico (ROSÁRIO *et al.*, 2008).

6.1.4 Efeitos na atividade fagocítica e morfologia

Dentre as funções de macrófagos que se tornam aumentadas durante o processo de ativação está a capacidade fagocítica. Para avaliar este parâmetro, macrófagos peritoneais de camundongos aderentes em lamínulas de vidro, após serem expostos a diferentes concentrações dos polissacarídeos por 48 horas, foram incubados com leveduras na proporção 5 leveduras para cada macrófago por 1 hora. Os resultados expressos em número de leveduras fagocitadas/macrófago estão apresentados na figura 11. Houve diminuição significativa do número de leveduras fagocitadas por macrófagos de 7,4 para aproximadamente 4, tanto para o tratamento com o polissacarídeo Go3 (5 $\mu\text{g/mL}$) como para o EHW-I (10 $\mu\text{g/mL}$). O Iota-Gy não alterou a capacidade fagocítica em nenhuma das concentrações testadas. Como não houve diferenças visuais na capacidade fagocítica, a figura 12 mostra imagens representati-

vas da atividade fagocítica do controle, na qual é possível observar leveduras dentro de vacúolos no citoplasma dos macrófagos.

Outros polissacarídeos ativadores de resposta biológica foram capazes de aumentar a atividade fagocítica de macrófagos, exibindo perfil diferente do encontrado no presente trabalho. O ARAGAL aumentou o índice endocítico de 4,08 para 6,8 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ após incubação dos macrófagos peritoneais de camundongos com o polissacarídeo por 24 horas (MORETÃO *et al.*, 2003). Macrófagos de animais tratados intraperitonealmente com α -glucana isoladas do líquen *Ramalina celastri* apresentaram atividade fagocítica aumentada em 70% após 7 dias de tratamento com 200 mg/Kg (STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002). AEPB e CWEP, frações alcalina e aquosa de galactomananas extraídas de *Trigonella foenum-graecum* L. apresentaram atividade fagocítica nas faixas de 25-40% e 10-20%, respectivamente nas concentrações de 3 a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em macrófagos peritoneais de camundongos cultivados por 24 horas na presença dos polímeros (RAMESH; YAMAKI; TSUHIDA, 2002).

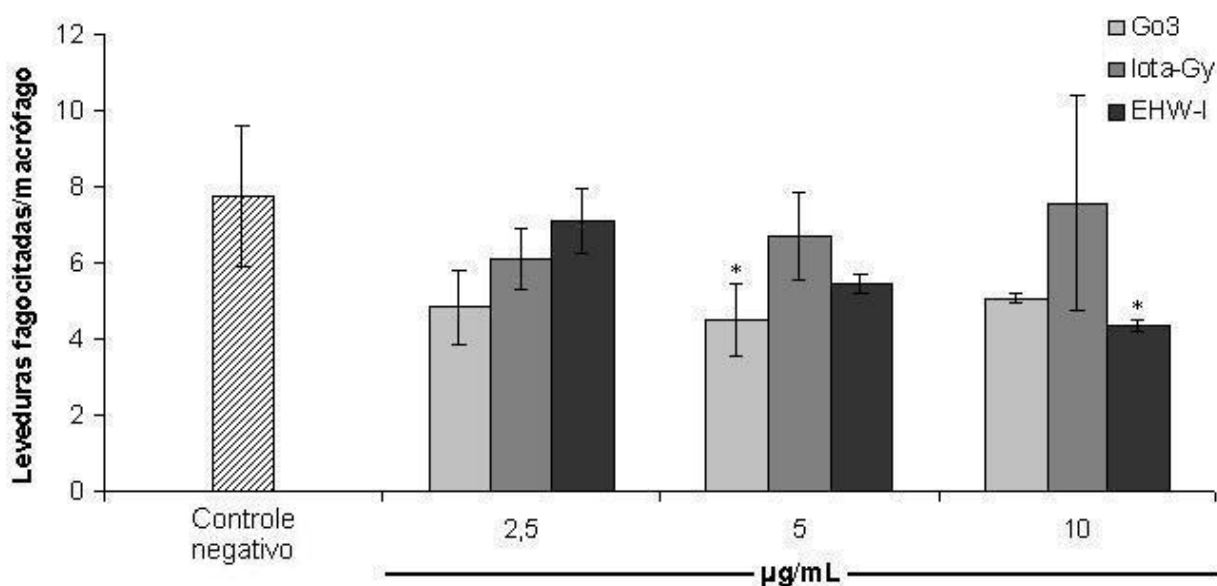


FIGURA 11 – ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AOS POLISSACARÍDEOS GO3, IOTA-GY E EHW-I
 FONTE: O autor (2010)

NOTA: Atividade fagocítica. Macrófagos peritoneais de camundongos foram expostos por 48 horas a 37 °C e 5% de CO_2 aos polissacarídeos Go3, Iota-Gy e EHW-I nas concentrações indicadas e, em seguida, incubados por uma hora com leveduras na proporção 5:1. O número de leveduras fagocitadas/ macrófago foi obtido por contagem em microscópio óptico. Como controle negativo foi utilizado apenas meio de cultura MEM. Os resultados estão expressos como média \pm DP (n = 2, sendo cada experimento em triplicata). * Diferença significativa do controle negativo: $p \leq 0,05$

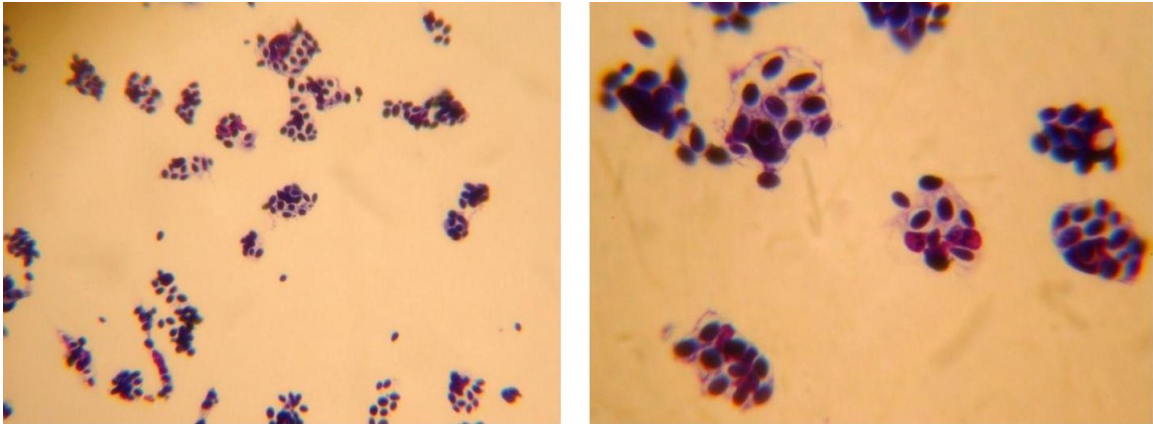


FIGURA 12 – ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Atividade fagocítica. Macrófagos peritoneais de camundongos foram mantidos por 48 horas com meio MEM, em seguida, incubados por uma hora com leveduras na proporção 5:1, sempre a 37 °C e 5% de CO_2 . As lamínulas foram processadas para microscopia óptica, coradas com Giemsa e fotografadas com zoom de 2,3X, no aumento 400X (A) e 1000X (B)

Além da avaliação das características funcionais, a modulação de macrófagos pode também ser estudada através de análises morfológicas. Para avaliar possíveis alterações na morfologia, macrófagos aderentes em lamínulas foram incubados na ausência ou presença de diferentes concentrações dos polissacarídeos Go3, Iota-Gy e EHW-I durante 48 horas. As imagens mais significativas da avaliação morfológica estão apresentadas nas figuras 13, 14, 15 e 16.

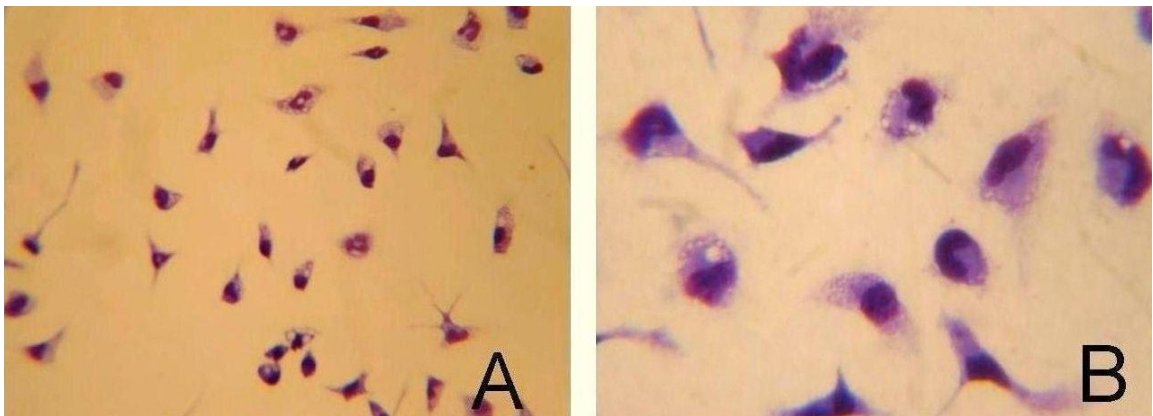


FIGURA 13 – ANÁLISES MORFOLOGICAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS NÃO TRATADOS

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Análises morfológicas. Macrófagos peritoneais de camundongos aderentes em lamínulas de vidro foram incubados por 48 horas a 37 °C e 5% de CO_2 apenas com meio MEM. As lamínulas foram processadas para microscopia óptica, coradas com Giemsa e fotografadas com zoom de 2,3X, no aumento 400X (A) e 1000X (B).

De acordo com a literatura, macrófagos residentes, que não sofreram estímulo, possuem núcleo pequeno e escuro, poucas projeções citoplasmáticas e pouco espalhados, enquanto que macrófagos ativados possuem citoplasma aumentado, núcleo grande e claro, várias projeções citoplasmáticas e grande capacidade de espalhamento (BURGALETA *et al.*, 1978). Na figura 13, que mostra os macrófagos não tratados, observa-se a predominância de características de macrófagos residentes.

Para o tratamento com o polissacarídeo Go3 na concentração 2,5 $\mu\text{g/mL}$, (figura 14 A-B), foram visualizadas alterações morfológicas discretas indicativas de ativação evidenciadas pelo núcleo maior e mais claro. Já na concentração 10 $\mu\text{g/mL}$ (figura 14 C-D) pode-se observar células menores, com o citoplasma e núcleo mais condensados e prolongamentos maiores que o controle. Estas características podem estar relacionadas com a primeira fase de morte celular por apoptose (ARENDS; MORRIS; WYLLIE, 1990; EDINGER; THOMPSON, 2004). Existem evidências de que óxido nítrico (*NO*) pode induzir apoptose em macrófagos (ALBINA *et al.*, 1993). Como a ramina Go3 apresentou intensidade maior na produção de *NO* dentre os compostos estudados neste trabalho, pode-se sugerir que estas alterações morfológicas podem estar relacionadas com a morte celular por apoptose. Porém, mais estudos são necessários para se confirmar a ativação de morte celular programada nestas células.

Para o tratamento com Iota-Gy (figura 15) pode-se observar na concentração 10 $\mu\text{g/mL}$, alterações discretas indicativas de ativação, como a presença de vacúolos no citoplasma, núcleo maior e mais claro. O polissacarídeo EHW-I foi o que causou alterações morfológicas mais intensas. A (figura 16) mostra o tratamento com a menor (16A, 2,5 $\mu\text{g/mL}$) e maior concentração (16B, 10 $\mu\text{g/mL}$). Pode-se observar que as células estão mais arredondadas e com a membrana plasmática aparentemente danificadas. O rompimento da membrana plasmática, assim como a perda de sua estrutura, podem estar relacionadas com morte celular por necrose (DUVALL; WYLLIE, 1986; BELLAMY *et al.*, 1995; EDINGER; THOMPSON, 2004).

Vale ressaltar que as concentrações utilizadas para avaliar interferência na morfologia são aquelas que não afetaram a viabilidade celular determinada pelo teste do MTT. Assim, as alterações visualizadas foram decorrentes de interferências em outros parâmetros das células, não aquele relacionado a atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais. Não se pode descartar a interferência no processo de adesão celular. Não foi realizado experimento adicional para comprovar esta hipótese, mas

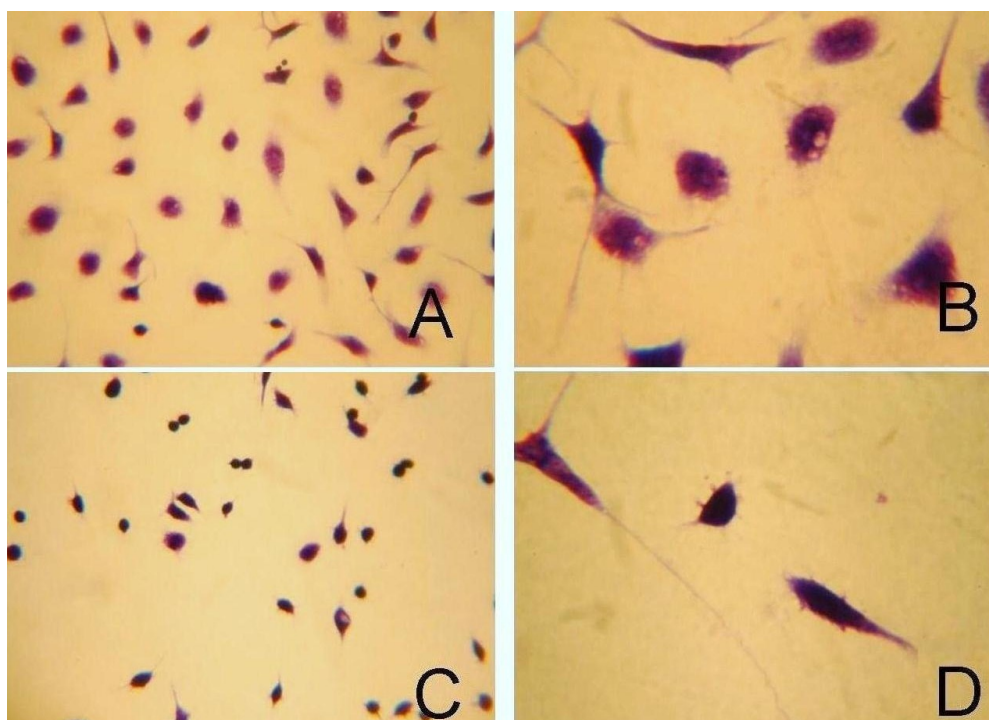


FIGURA 14 – ANÁLISES MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO POLISSACARÍDEO GO3

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Análises morfológicas. Macrófagos peritoneais de camundongos aderentes em lamínulas de vidro foram incubados por 48 horas a 37 °C e 5% de CO_2 na presença do polissacarídeo Go3. As lamínulas foram processadas para microscopia óptica, coradas com Giemsa e fotografadas com zoom de 2,3X, no aumento 400X (A, C) e 1000X (B, D). (A) e (B) correspondem à concentração 2,5 $\mu\text{g/mL}$; (C) e (D) à 10 $\mu\text{g/mL}$.

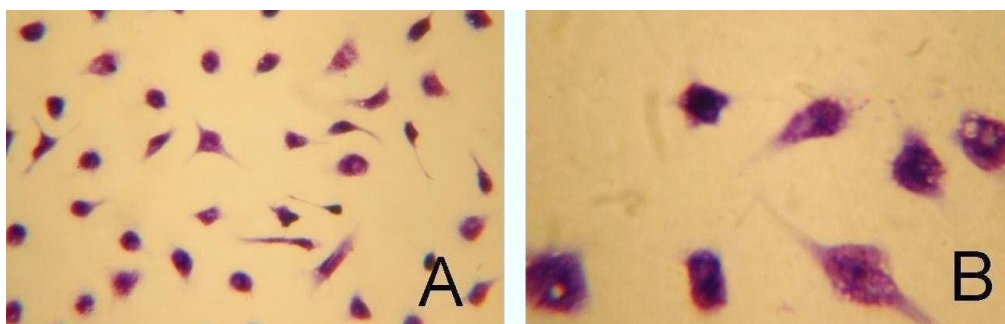


FIGURA 15 – ANÁLISES MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO POLISSACARÍDEO IOTA-GY

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Análises morfológicas. Macrófagos peritoneais de camundongos aderentes em lamínulas de vidro foram incubados por 48 horas a 37 °C e 5% de CO_2 na presença do polissacarídeo Iota-Gy. As lamínulas foram processadas para microscopia óptica, coradas com Giemsa e fotografadas com zoom de 2,3X, no aumento 400X ((A) e 1000X (B). (A) e (B) correspondem à concentração 10 $\mu\text{g/mL}$.

é possível observar nas micrografias que a densidade celular é menor para os polissacarídeos Go3 e EHW-I a partir da concentração 5 $\mu\text{g/mL}$ (figuras 14 e 16), além de ter um padrão de distribuição diferente ao longo da lamínula quando comparadas ao controle (figura 13).

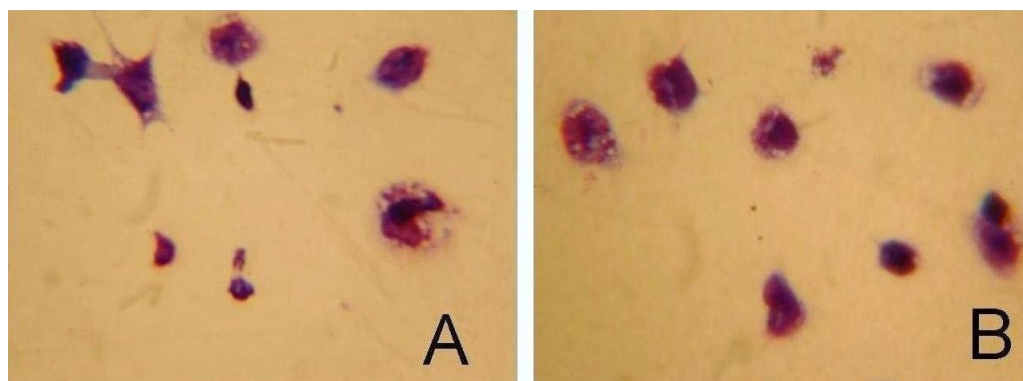


FIGURA 16 – ANÁLISES MORFOLÓGICAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO POLISSACARÍDEO EHW-I

FONTES: O autor (2010)

NOTA: Análises morfológicas. Macrófagos peritoneais de camundongos aderentes em lamínulas de vidro foram incubados por 48 horas a 37 °C e 5% de CO_2 na presença do polissacarídeo EHW-I. As lamínulas foram processadas para microscopia óptica, coradas com Giemsa e fotografadas com zoom de 2,3X, 1000X (A e B). (A) corresponde à concentração 2,5 $\mu\text{g/mL}$; (B) à 10 $\mu\text{g/mL}$.

Em estudos anteriores, através de análises morfológicas, verificou-se que o polissacarídeo ARAGAL foi capaz de ativar macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MORETÃO *et al.*, 2003). A porcentagem de macrófagos ativados foi de 40% em células não tratadas e de 90% com o tratamento *in vitro* por 48 horas a 300 $\mu\text{g/mL}$. Macrófagos de animais tratados com 500 mg/Kg por 24 horas exibiram 70% de ativação.

6.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS POLISSACARÍDEOS ARAGAL, GO3, IOTAGY E EHW-I SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

No presente estudo os polímeros sulfatados exibiram propriedades moduladoras de atividade de macrófagos, pois diminuíram a produção de $O_2^{\bullet-}$ e estimularam intensamente a produção de NO . A ativação de macrófagos para secreção de ambas as moléculas é de crucial importância para estas células exercerem sua atividade microbicida (SONG *et al.*, 2002; HALLIWELL, 2006). Tem sido reconhecido que, nestas células, a síntese de $O_2^{\bullet-}$ e NO ocorrem de forma independente, pois há liberação de $O_2^{\bullet-}$ na

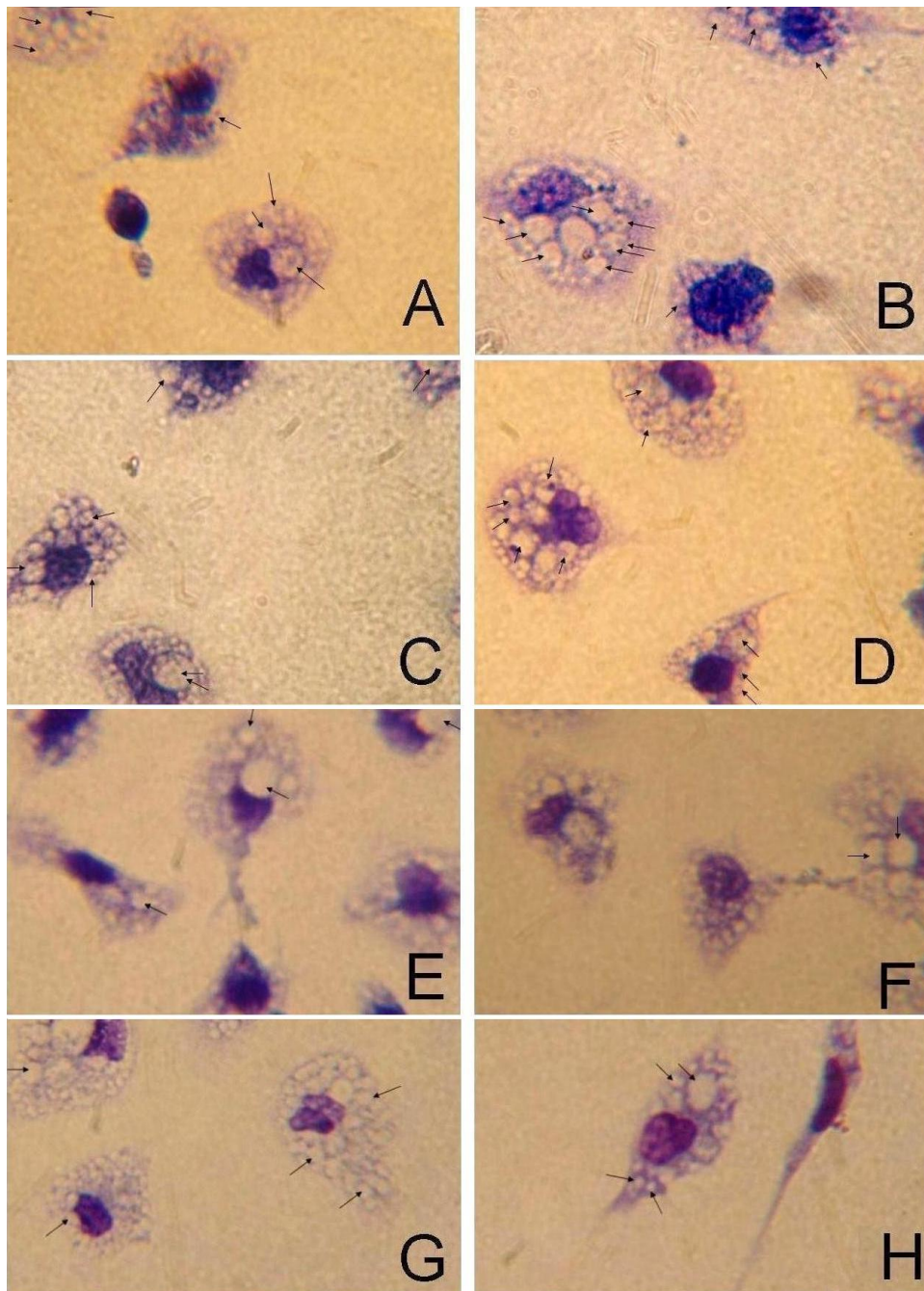


FIGURA 17 – ATIVIDADE LEISHMANICIDA EM LAMÍNULA, CONTROLE POSITIVO E NEGATIVO

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Macrófagos peritoneais de camundongos aderentes em lamínulas de vidro infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* por 12 horas a 34 °C na presença de CO_2 foram incubados por 48 horas a 37 °C e 5% de CO_2 na presença ou ausência de Glucantime 300 µg/mL. As lamínulas foram processadas para microscopia óptica, coradas com Giemsa e fotografadas com zoom de 2,3X, no aumento 1000X. (A), (B), (C) e (D) correspondem ao controle negativo, tratado com meio MEM. (E), (F), (G) e (H) correspondem ao tratamento com Glucantime 300 µg/mL, usado como controle positivo de atividade leishmanicida. As setas em A - D indicam parasitas internalizados, em E - H indicam vacúolos vazios.

ausência de produção de *NO* detectável e vice versa (DING; NATHAN; STUEHR, 1988; BOGDAN; ROLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000). Também é reconhecido que a produção de *NO* permanece por um período mais longo (KORHONEN *et al.*, 2005).

A capacidade dos polissacarídeos em estudo de modificar funções de macrófagos, motivou a avaliação da atividade leishmanicida destes compostos em macrófagos infectados com *Leishmania in vitro*. Os experimentos foram planejados para serem realizados em 48 horas de incubação, tempo no qual as células mostraram estar ativadas para a produção de *NO*. Os efeitos dos polissacarídeos sobre amastigotas intracelulares foram avaliados em duas condições experimentais; em uma das condições, as células foram fixadas em lamínulas e coradas, na outra, as células foram transferidas para meio rico, favorecendo o crescimento do parasita. Os resultados destes experimentos estão mostrados nas figuras 17 a 19. Como controle positivo foi utilizado o Glucantime 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, antimonial utilizado no tratamento das leishmanioses.

A figura 17 ilustra micrografias representativas de preparações de macrófagos infectados por *Leishmania (L.) amazonensis*, tratados ou não com Glucantime. Observa-se na figura 17A-D que as células do controle negativo apresentaram o citoplasma bastante vacuolado contendo parasitas na forma amastigota em seu interior, indicados por setas. Para o tratamento com Glucantime o número de parasitas internalizados diminuiu, fato observado pela presença de vacúolos vazios (figura 17 E-H). A contagem do parasita internalizado revelou atividade leishmanicida em lamínula para os polissacarídeos ARAGAL e EHW-I, como está mostrado na figura 18. O tratamento com ARAGAL diminuiu o número de *Leishmania* fagocitada por macrófago de 5,05 (controle negativo) para 2,3 e 1,1 nas concentrações 10 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. O tratamento com EHW-I apresentou um perfil semelhante, com 2,0 e 1,0 *Leishmania*/macrófago em 2,5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Vale destacar que esta atividade foi mais intensa que a do Glucantime 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que apresentou 3,2 *Leishmania*/macrófago.

A avaliação da atividade leishmanicida, somente em lamínulas coradas deixa um o seguinte questionamento; os parasitas que após o tratamento, ainda são visualizados nos vacúolos parasitóforos através da coloração, estavam viáveis ou não antes da fixação da lamínula? Para de fato caracterizar uma atividade leishmanicida, as células infectadas e tratadas foram expostas a condição que favoreça o crescimento dos parasitas que eventualmente sobreviveram ao tratamento. Neste sentido,

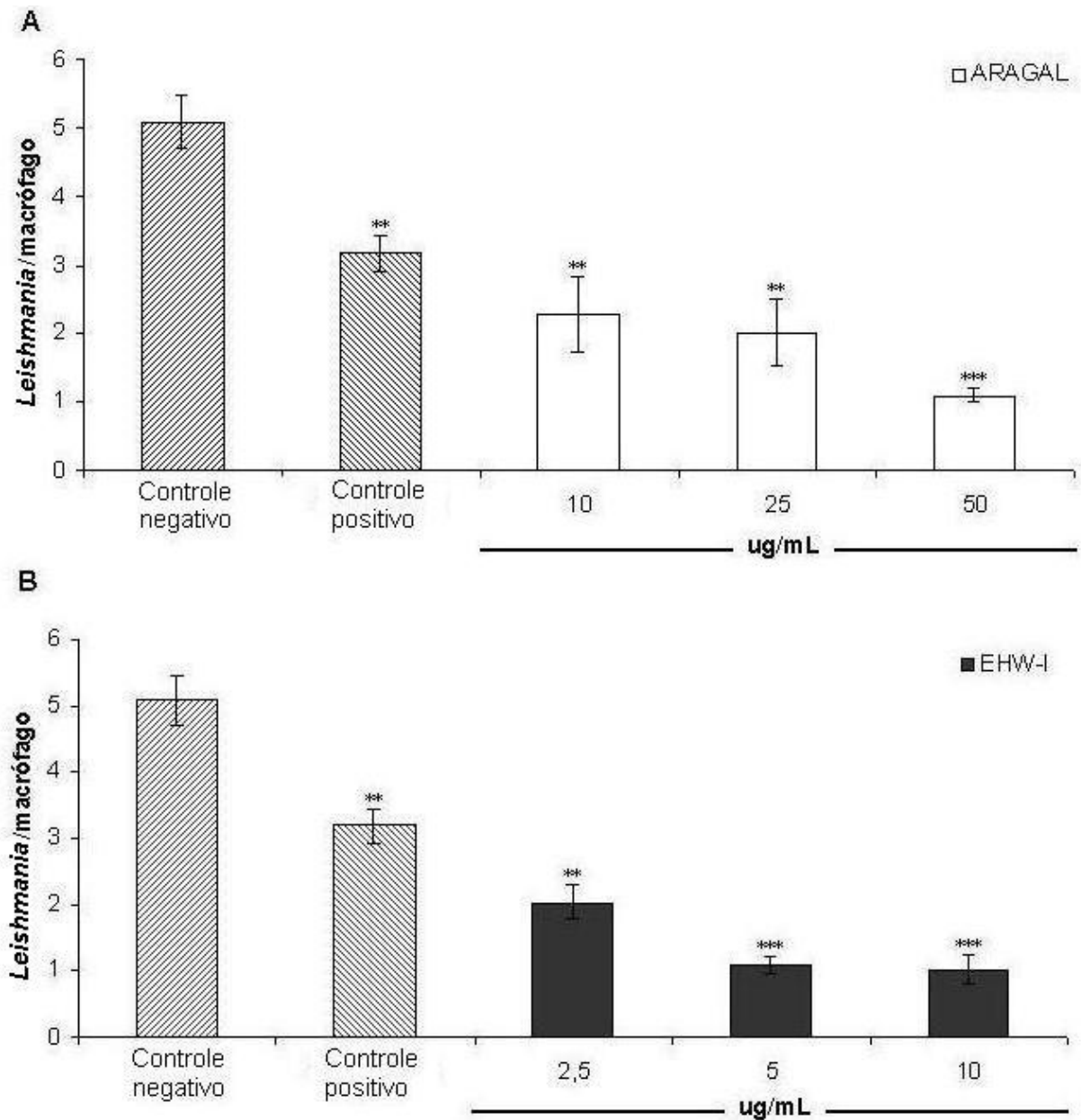


FIGURA 18 – ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS POLISSACARÍDEOS ARAGAL E EHW-I SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Leishmania (L.) amazonensis* EM LAMÍNULA

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Atividade leishmanicida. Macrófagos peritoneais de camundongos, aderentes em lamínulas de vidro, infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* por 12 horas a 34 °C na presença de CO₂ foram incubados por 48 horas a 37 °C e 5% de CO₂ na presença dos polissacarídeos ARAGAL e EHW-I nas concentrações indicadas. As lamínulas foram processadas para microscopia óptica e coradas com Giemsa. Como controle negativo foi utilizado apenas meio de cultura MEM e como controle positivo foi utilizado Glucantime 300 µg/mL. O número de *Leishmania*/macrófago foi obtido por contagem em microscópio óptico. Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 2, sendo cada experimento em triplicata). **, *** Diferença significativa do controle negativo: (p ≤ 0,02), (p ≤ 0,01) respectivamente.

foram realizados experimentos em meio Tobbie & Evans, que favorece o crescimento dos parasitas após o tratamento com os compostos em estudo. Nesta condição os protozoários intracelulares que estão viáveis conseguem evadir dos macrófagos e se transformam em promastigotas que proliferam em cultura. A proliferação da *Leishmania* na forma promastigota será proporcional ao número de amastigotas viáveis que saíram dos macrófagos. O tratamento com ARAGAL (figura 19A) a partir de 10 $\mu\text{g/mL}$ promoveu, uma diminuição expressiva de aproximadamente 88% no crescimento das *Leishmania (L.) amazonensis*. Este efeito foi ligeiramente superior ao do glucantime que apresentou cerca de 72% de inibição no crescimento dos parasitas, quando comparado com o controle negativo (meio).

MORETÃO *et al.*, (2003) verificam que o polímero ARAGAL foi capaz de modular funções de macrófagos. Este efeito foi caracterizado pelo aumento na atividade fagocítica e na quantidade de macrófagos ativados *in vitro*, além de aumentar a produção de ânion superóxido em macrófagos isolados de animais tratados com o polisacarídeo. Neste estudo, verificou-se que ARAGAL não teve efeito sobre a produção de óxido nítrico *in vivo*, em macrófagos isolados de animais tratados com o polisacarídeo. Uma vez que, este polímero, embora em condição de tratamento diferente, não apresentou efeito sobre a produção de *NO*, a atividade leishmanicida encontrada no presente estudo para o ARAGAL, pode ser, em parte, consequência do aumento do “burst” oxidativo. Porém, o tratamento dos macrófagos infectados foi investigado após o período de 12 horas de infecção, tempo suficiente para que ocorra diminuição da intensidade do “burst” oxidativo. Neste sentido, pode-se sugerir que a atividade leishmanicida observada para o ARAGAL seja resultado do envolvimento de outras vias de ativação de macrófagos. Em outro estudo, MORETÃO *et al.*, (2004) verificaram aumento na produção de $\text{TNF-}\alpha$ em macrófagos de animais tratados com ARAGAL.

Um possível mecanismo de ação leishmanicida, proposto para o antimônio gluconato de sódio (SAG), envolve duas etapas; a primeira observada após 6 horas de tratamento, está relacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio e, a segunda, observada em 24 e 48 horas de tratamento, deve-se a produção de *NO* (BASU *et al.*, 2006). Estes estudos evidenciam a possibilidade de atividade leishmanicida com ativação do “burst” oxidativo independente da produção de *NO*. Arabinogalactana, extraída de *Echinacea purpurea* apresentou 86,4% de inibição do crescimento de *Leishmania enriettii* intracelular com 48 horas de tratamento a 250 $\mu\text{g/mL}$ (LUETTIG *et al.*, 1989). Foi proposto que esta arabinogalactana possui atividade leishmanicida por aumentar a produção de radicais de oxigênio em duas vezes a 10 $\mu\text{g/mL}$

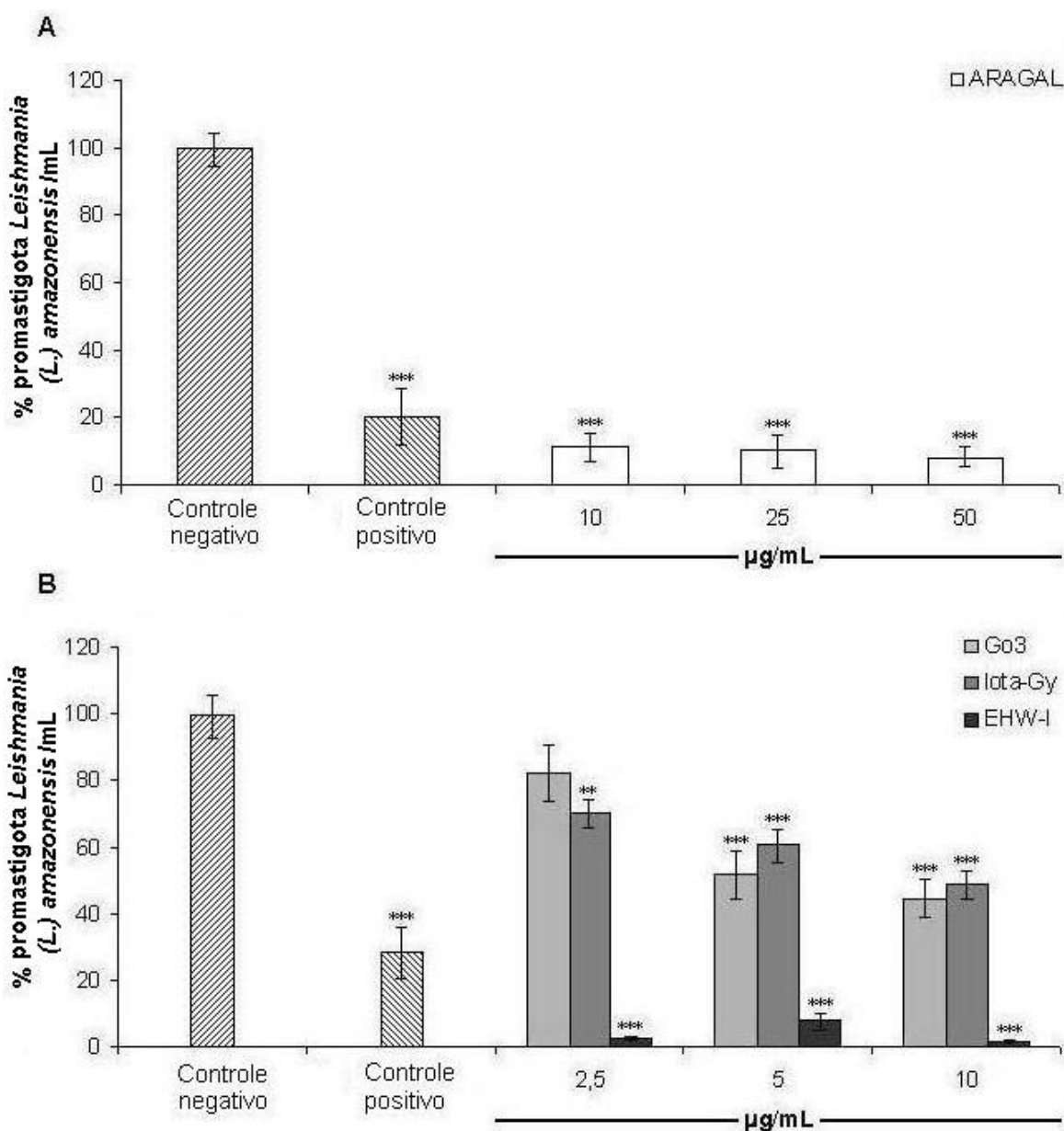


FIGURA 19 – ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS POLISSACARÍDEOS ARAGAL, GO3, IOTA-GY E EHW-I SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Leishmania (L.) amazonensis* EM MEIO TOBBIE & EVANS

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Atividade leishmanicida. Macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* por 12 horas a 34 °C na presença de CO₂ foram incubados por 48 horas a 37 °C e 5% de CO₂ na presença dos polissacarídeos ARAGAL (A), Go3, Iota-Gy e EHW-I (B) nas concentrações indicadas. Em seguida o conteúdo dos poços foi raspado e transferido para o meio Tobbie & Evans e incubado por 5 - 10 dias a 25 °C. Como controle negativo foi utilizado apenas meio de cultura MEM e como controle positivo foi utilizado Glucantime 300 µg/mL. O número de *Leishmania*/mL foi obtido por contagem em hemocitômetro de Neubauer. Os resultados estão expressos como média ± EP (n = 4, sendo cada experimento em triplicata). **, *** Diferença significativa do controle negativo: (p ≤ 0,02), (p ≤ 0,01) respectivamente.

in vitro e em 10 vezes a 500 $\mu\text{g}/\text{animal}$ *in vivo*. Houve também estímulo na produção de $\text{TNF-}\alpha$ *in vitro* na concentração 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As células tratadas produziram 2560 U, enquanto as células não tratadas produziram 4 U desta citocina (LUETTIG *et al.*, 1989). Nanopartículas poliméricas de polialquilcianoacrilato apresentaram atividade contra *Leishmania donovani* intracelular. Tal efeito foi atribuído ao aumento de metabólitos reativos de oxigênio (GASPAR *et al.*, 1992).

Os polissacarídeos sulfatados avaliados no presente trabalho apresentaram atividade leishmanicida em magnitudes diferentes, como pode ser verificado na figura 19B. A raminana Go3 apresentou atividade a partir da concentração 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, atingindo aproximadamente 55% de inibição do crescimento da *Leishmania*. O polímero Iota-Gy apresentou atividade leishmanicida em todas as concentrações, com inibição de aproximadamente 30% para concentração de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e de 50% para 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. EHW-I apresentou a maior atividade leishmanicida entre os polissacarídeos analisados. O efeito leishmanicida foi observado para todas as concentrações, sendo que a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a inibição foi de 98%. Todos os resultados foram analisados em relação ao controle negativo (macrófagos infectados e não tratados).

A atividade leishmanicida observada para estes compostos, pode estar, em partes, relacionada a ativação de produção de NO (BOGDAN, 2001; NOLETO *et al.*, 2002; OSORIO *et al.*, 2008). Recentemente, foi demonstrado que camundongos fêmeas, grávidas e lactantes, por apresentarem produção de NO elevada induzida por hormônio, mostraram resistência à infecção com *Leishmania infantum* (OSORIO *et al.*, 2008). A galactomanana (GMPOLY), isolada do líquen *Ramalina celastri*, apresentou atividade leishmanicida *in vitro* semelhante ao observado para o glucantime (NOLETO *et al.*, 2002). Os autores atribuíram este efeito ao aumento de aproximadamente 40% na produção de NO pelo macrófagos tratados com o polissacarídeo. No entanto, no presente estudo a intensidade de efeito leishmanicida parece não estar proporcionalmente relacionada ao aumento da produção de NO . Apesar de ter ativado mais intensamente a via de produção de NO , o polissacarídeo Go3 apresentou atividade leishmanicida discreta, comparável à do Iota-Gy. Este ativou a produção de NO em intensidade ligeiramente maior que o EHW-I que, por sua vez, exerceu atividade leishmanicida em maior magnitude. É interessante ressaltar que efeito tão intenso ainda não havia sido encontrado para polissacarídeos em concentrações até 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Em estudos recentes, a arabinomanose isolada de *Mycobacterium tuberculosis*, Z-100, diminuiu para 44,3% o crescimento de *Leishmania (Leishmania) amazo-*

nensis intracelular em macrófagos J774.1 após 48 horas de exposição à droga (BARROSO *et al.*, 2007). No mesmo estudo, em camundongos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* tratados *in vivo* por via intraperitoneal, o polímero a 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ não apresentou efeito leishmanicida, mas foi capaz de aumentar duas vezes a produção de $\text{INF-}\gamma$ e em quatro vezes a produção de $\text{INF-}\gamma$ e IL-10 nos nódulos linfáticos com o tratamento na mesma dose combinado a 28 mg/Kg de antimoniato de meglumina.

Embora, os efeitos leishmanicidas observados para os polissacarídeos em estudo sejam atribuídos aos estímulos das vias de produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ no caso do ARAGAL e de *NO* para os polímeros sulfatados, não se pode excluir a possibilidade de outra via de sinalização estar envolvida. É conhecido que macrófagos possuem em sua superfície vários tipos de receptores que podem ser alvo de ligação de diferentes polissacarídeos (BOHN; BeMILLER, 1995; MARTINEZ-POMARES *et al.*, 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Esta interação pode desencadear a ativação de alvos moleculares intracelulares que resultem em contribuir para o efeito leishmanicida.

Considerando a escassez de compostos eficazes para o tratamento das leishmanioses, o efeito leishmanicida verificado para o ARAGAL, Go3, Iota-Gy e EHW-I coloca estas moléculas em evidência para estudos futuros visando o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra infecções parasitárias, em especial as leishmanioses.

7 CONCLUSÕES

Os efeitos exibidos pelos polissacarídeos sulfatados (Go3, Iota-Gy e EHW-I) avaliados no presente trabalho em macrófagos peritoneais de camundongos foram evidenciados por evidenciadas por:

- Afetar a viabilidade celular, sendo necessário o uso desses polímeros em baixas concentrações (2,5 a 10 $\mu\text{g/mL}$);
- Diminuir a produção de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) na ausência e presença de PMA, apresentando comprovada atividade sequestradora desta espécie reativa;
- Aumentar intensamente a produção de óxido nítrico (NO);
- Diminuir a capacidade fagocítica (Go3 e EHW-I);
- Produzir alterações morfológicas visualizadas por microscopia óptica.

Todos os polissacarídeos testados (ARAGAL, Go3, Iota-Gy e EHW-I) apresentaram atividade leishmanicida em amastigota intracelular *in vitro*;

- ARAGAL exibiu atividade leishmanicida apresentando 88% de inibição do crescimento do parasita em 10 $\mu\text{g/mL}$;
- Go3 e Iota-Gy inibiram o crescimento da *Leishmania* atingindo 50% de inibição na concentração 10 $\mu\text{g/mL}$;
- EHW-I exibiu a atividade leishmanicida apresentando 98% de inibição do crescimento do parasita.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ADAMS, D. O. Macrophages. *Methods Enzymol.*, v. 58, p. 494–506, 1979.
- AKRAMIENE, D. *et al.* Effects of β -glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)*, v. 43, n. 8, p. 597–606, 2007.
- ALBINA, J. *et al.* Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, v. 150, p. 5080–5085, 1993.
- ARENDS, M. J.; MORRIS, R. G.; WYLLIE, A. H. Apoptosis: The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.*, v. 136, n. 3, p. 593–608, 1990.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, p. 1269–1281, 2000.
- BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CURNUTTE, J. T. The production by leukocytes of superóxide, a potencial bactericidal agent. *J. Clin. Invest.*, v. 49, p. 695–726, 1973.
- BADWEY, J. A.; KARNOVSKY, M. L. Active oxigen species and the function of phagocytic leukocytes. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 49, p. 695–726, 1980.
- BARROSO, P. A. *et al.* A trial of immunotherapy against leishmania amazonensis infection in vitro and in vivo with Z-100, a polysaccharide obtained from *Mycobacterium tuberculosis*, alone or combined with meglumine antimoniate. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 59, p. 1123–1129, 2007.
- BASU, J. M. *et al.* Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 50, n. 5, p. 1788–1797, 2006.
- BEHRENDT, N. *et al.* A urokinase receptor-associated protein with specific collagen binding properties. *J. Biol. Chem.*, v. 275, n. 3, p. 1993–2002, 2000.
- BELLAMY, C. O. *et al.* Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin. Cancer Biol.*, v. 6, p. 3–16, 1995.
- BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev. Infect. Dis.*, v. 10, n. 3, p. 560–586, 1988.
- BERTON, G.; GORDON, S. Modulation of macrophage mannosyl-specific receptors by cultivation on immobilized zymosan. Effects on superoxide-anion release and phagocytosis. *Immunology*, v. 49, p. 705–715, 1983.

- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.*, v. 40, p. 845–859, 2004.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.*, v. 2, n. 10, p. 907–916, 2001.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 12, p. 64–76, 2000.
- BOHN, J. A.; BeMILLER, J. N. (1→3) β -d-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polym.*, v. 28, p. 3–14, 1995.
- BRAGA, F. G. *et al.* Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, v. 111, p. 396–402, 2007.
- BURGALETA, C. *et al.* Glucan activated macrophages: functional characteristics and surface morphology. *J. Reticuloendothel. Soc.*, v. 23, p. 195–204, 1978.
- BURKE, B.; LEWIS, C. E. *The Macrophage*. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2002.
- CALEGARI-SILVA, T. C. *et al.* Nf- κ B-mediated repression of inos expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunol. Lett.*, v. 127, p. 19–26, 2009.
- CANTOS, G. *et al.* 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.
- CARVALHO, P. B. de; FERREIRA, E. I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature leadership against an ancient disease. *Fitoterapia*, v. 72, p. 599–618, 2001.
- CASBON, A. J. *et al.* Macrophage NADPH oxidase flavocytochrome b localizes to the plasma membrane and Rab11-positive recycling endosomes. *J. Immunol*, v. 182, p. 2325–2339, 2009.
- CASSOLATO, J. E. F. *et al.* Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. *Carbohydr. Res.*, v. 343, p. 3085–3095, 2008.
- CHEN, B. *et al.* Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharide from *Rhodella reticulata*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009.
- CHEN, Z. *et al.* Activation of macrophages by polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. *Phytother. Res.*, 2009.
- CHOI, I. *et al.* Stimulation of various functions in murine peritoneal macrophages by glucans produced by Glucosyltransferases from *Streptococcus mutans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 69, n. 9, p. 1693–1699, 2005.
- CLARK, R. A.; KLEBANOFF, S. J. Role of the myeloperoxidase– H_2O_2 –halide system in concanavalin A-induced tumor cell killing by human neutrophils. *J. Immunol.*, v. 122, p. 2605–2610, 1979.

- COHEN, S. M.; RYAN, L.; ROOT, K. The oxidative metabolism of thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages: the relationship between oxygen, superoxide and hydrogen peroxide and the effect on monolayer formation. *J. Immunol.*, v. 127, p. 1007–1011, 1981.
- COSTA, J. M. L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. *Gaz. méd. Bahia*, v. 75, n. 1, p. 3–17, 2005.
- COSTA, L. *et al.* Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomed. Pharmacother.*, v. 64, p. 21–28, 2010.
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.
- CROSS, A. R.; SEGAL, A. W. The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1657, p. 1–22, 2004.
- CRUZ, A. K. *et al.* Current treatment and drug discovery against *Leishmania spp.* and plasmodium spp.: A review. *Curr Drug Targets*, v. 10, p. 178–192, 2009.
- DELGOBO, C. *et al.* Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharide of *Anadenanthera colubrina*. *Phytochemistry*, v. 47, n. 7, p. 1207–1214, 1998.
- DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in leishmania infectivity. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1455, p. 341–352, 1999.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis, public health aspects and control. *Clin. Dermatol.*, v. 14, p. 417–423, 1996.
- DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, v. 141, n. 7, p. 2407–2412, 1988.
- DRÁBIKOVÁ, K. *et al.* Glucomannan reduces neutrophil free radical production in vitro and in rats with adjuvant arthritis. *Pharmacol. Res.*, v. 59, p. 399–403, 2009.
- DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- DUCATTI, D. R. *Oligossacarídeos obtidos por hidrólise redutiva parcial de polissacarídeos de algas vermelhas : estudos de ressonância magnética nuclear.* Dissertação (Mestrado) — UFPR, 2005.
- DUVALL, E.; WYLLIE, A. Death and the cell. *Immunol. Today*, v. 7, n. 4, p. 115–119, 1986.
- EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, v. 130, p. 432, 1959.
- EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 16, p. 663–669, 2004.

- FARIA-TISCHER, P. C. de S. *Estrutura química, propriedades reológicas e atividade antiviral das galactanas sulfatadas das algas vermelhas Meristiella gelidium e Gymnogongrus griffithsiae* (Gigartinales). Tese (Doutorado) — UFPR, 2006.
- FIETE, D. J.; BERANEK, M. C.; BAENZIGER, J. U. A cysteine-rich domain of the “mannose” receptor mediates galnac-4- SO_4 binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 95, p. 2089–2093, 1998.
- FIOCRUZ. *As Leishmanioses*. 2010.
[Http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/tratamento.htm](http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/tratamento.htm), acesso em 08 de março.
- FITZPATRICK, B. *et al.* inos as a therapeutic target for treatment of human tumors. *Nitric Oxide*, v. 19, p. 217–224, 2008.
- GARNIER, T.; CROFT, S. L. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, v. 3, n. 4, 2002.
- GASPAR, R. *et al.* Macrophage activation by polymeric nanoparticles of polyalkylcyanoacrylates: Activity against intracellular *Leishmania donovani* associated with hydrogen peroxide production. *Pharm. Res.*, v. 9, n. 6, p. 782–787, 1992.
- GOEBEL, W. S.; DINAUER, M. C. Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Acta Haematol.*, v. 110, p. 86–92, 2003.
- GONZÁLEZ, U. *et al.* *Interventions for OldWorld cutaneous leishmaniasis*. Geneva: JohnWiley & Sons, Ltd, 2008.
- GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, v. 126, p. 131–138, 1982.
- HALLIWELL, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem. Sci.*, v. 31, n. 9, p. 509–515, 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals reactive species and toxicology*. New York: Oxford University Press, 1999.
- HANCOCK, J. T.; JONES, O. T. G. The inhibition by diphenyleneiodonium and its analogues of superoxide generation by macrophages. *Biochem. J.*, v. 242, p. 103–107, 1987.
- HANNA, P. C. *et al.* Role of macrophage oxidative burst in the action of anthrax lethal toxin. *Mol. Med.*, v. 1, n. 1, p. 7–18, 1994.
- HASUI, M. *et al.* In vitro antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 17, n. 5, p. 293–297, 1995.
- HWANG, P.-A. *et al.* Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from seaweed *Sargassum hemiphyllum*. *J. Mar. Sci. Technol.*, v. 18, n. 1, p. 41–46, 2010.

- JEON, Y. J.; JUE, D. M. Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J. Immunol*, v. 158, p. 4901, 1997.
- JOHNSTON, R. B.; GODZIK, C. A.; COHN, Z. A. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J. Exp. Med.*, p. 115–127, 1978.
- KAUFMANN, S. H. E.; MEDZHITOV, R.; GORDON, S. *The Innate Immune Response to Infection*. Berlin: ASM Press, 2004.
- KEDZIERSKI, L. *et al.* Leishmaniasis: Current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Curr. Med. Chem.*, v. 16, p. 599–614, 2009.
- KIM, G.-Y. *et al.* Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from peritoneal macrophages. *J. Ethnopharmacol.*, v. 95, p. 69–76, 2004.
- KLEBANOFF, S. J. *Oxygen metabolites from phagocytes*. In: *Inflammation - Basic Principles and Clinical Correlates*. [S.l.]: Raven Press, 1992.
- KLEINERT, H. *et al.* Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 500, p. 255–266, 2004.
- KORHONEN, R. *et al.* Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug. Targets. Inflamm. Allergy.*, v. 4, p. 471–479, 2005.
- LEE, N. *et al.* Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Nature*, v. 9, p. 53–64, 2002.
- LEIRO, J. M. *et al.* Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agard. *Int. Immunopharmacol.*, v. 7, p. 879–888, 2007.
- LUETTIG, B. *et al.* Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 81, n. 9, p. 669–675, 1989.
- MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. *Ann. Rev. Immunol*, v. 15, p. 323–350, 1997.
- MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. *J. Biomed. Biotechnol.*, v. 2010, p. 8 páginas, 2009.
- MAO, W. *et al.* Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. *J. Appl. Phycol.*, v. 18, p. 9–14, 2006.
- MARQUIS, J.-F.; GROS, P. Intracellular *Leishmania*: your iron or mine? *Trends Microbiol.*, v. 15, n. 3, p. 93–95, 2007.
- MARTINEZ-POMARES, L. *et al.* Carbohydrate-independent recognition of collagens by the macrophage mannose receptor. *Eur. J. Immunol.*, v. 36, p. 1074–1082, 2006.

MELLINGER, C. G. *et al.* Chemical and biological properties of an arabinogalactan from *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod.*, v. 68, p. 1479–1483, 2005.

MELLINGER, C. G. *et al.* Chemical and immunological modifications of an arabinogalactan present in tea preparations of *Phyllanthus niruri* after treatment with gastric fluid. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 43, p. 115–120, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2. ed. Brasília, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Glossário - Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2009. [Http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560), acesso em 22 de novembro.

MONCADA, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med*, v. 92, p. 164–169, 1999.

MONROY, A. *et al.* Impaired regulation of the TNF- α converting enzyme/tissue inhibitor of metalloproteinase 3 proteolytic system in skeletal muscle of obese type 2 diabetic patients: a new mechanism of insulin resistance in humans. *Diabetologia*, v. 52, p. 2169–2181, 2009.

MORETÃO, M. P. *et al.* Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. *Immunol. Lett.*, v. 89, p. 175–185, 2003.

MORETÃO, M. P. *et al.* Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). *Immunol. Lett.*, v. 93, p. 189–197, 2004.

NAKAJIMA, H. *et al.* Immunopotentiality by a new antitumor polysaccharide, DMG, a degraded d-manno-d-glucan from *Microellobosporia grisea* culture fluid. *Gann*, v. 75, n. 3, p. 260–268, 1984.

NASEEM, K. M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol. Aspects Med.*, v. 26, p. 33–65, 2005.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 6, p. 173–182, 2006.

NATHAN, C.; XIE, Q. wen. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, v. 269, n. 19, p. 13725–13728, 1994.

NISHIKIMI, M.; RAO, N. A.; YAGI, K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 46, n. 2, p. 849–854, 1972.

NOLETO, G. R. *Efeito de Manana, galactomanana e seus complexos com íon vanadilo sobre macrófagos peritoneais de camundongos e Leishmania amazonensis*. Tese (Doutorado) — UFPR, 2002.

NOLETO, G. R. *et al.* Yeast mannan-vanadium (IV) complexes and their effects on peritoneal macrophages. *Carbohydr. Polym.*, v. 57, p. 113–122, 2004.

- NOLETO, G. R. *et al.* Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. *Mol. Cell. Biochem.*, v. 233, p. 73–83, 2002.
- OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 18, n. 2, p. 293–305, 2005.
- OSORIO, Y. *et al.* Pregnancy enhances the innate immune response in experimental cutaneous leishmaniasis through hormone-modulated nitric oxide production. *J. Leukoc. Biol.*, v. 83, p. 1413–1422, 2008.
- OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Immunomodulating activities of polysaccharide fraction from dried safflower petals. *Drug Resist. Updat.*, v. 7, p. 257–266, 2004.
- PATHAK, M. K.; YI, T. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J. Immunol.*, v. 167, p. 3391–3397, 2001.
- PAUTZ, A. *et al.* Similar regulation of human inducible nitric-oxide synthase expression by different isoforms of the RNA-binding protein AUF1. *J. Biol. Chem.*, v. 284, n. 5, p. 2755–2766, 2009.
- QI, H. *et al.* Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.*, v. 17, p. 527–534, 2005.
- QUINN, M. T.; SCHEPETKIN, I. A. Role of NADPH oxidase in formation and function of multinucleated giant cells. *J. Innate Immun.*, v. 1, p. 509–526, 2009.
- RAMAMOORTHY, L.; KEMP, M. C.; TIZARD, I. R. Acemannan, a β -(1,4)-acetylated mannan, induces nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264. *Mol. Pharmacol.*, v. 50, p. 878–884, 1996.
- RAMESH, H. P.; YAMAKI, K.; TSUHIDA t. Effect of fenugreek *Trigonella foenumgraecum* L. galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and Igm secretion in HB4C5 cells. *Carbohydr. Polymers*, v. 50, p. 79–83, 2002.
- REILLY, T. *et al.* Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. *Biochem. Pharmacol.*, v. 55, p. 803–810, 1998.
- ROBERTS, C. W. *et al.* Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 126, p. 129–142, 2003.
- ROBERTS, W. L. *et al.* Pentavalent antimony-mannan conjugate therapy of experimental visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 55, n. 4, p. 444–446, 1996.
- ROBERTS, W. L.; MCMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 42, n. 5, p. 1076–1082, 1998.

ROSÁRIO, M. *et al.* Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. *Phytochemistry*, v. 69, p. 464–472, 2008.

SANMUN, D. *et al.* Involvement of a functional NADPH oxidase in neutrophils and macrophages during programmed cell clearance: implications for chronic granulomatous disease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v. 297, p. C621–C631, 2009.

SASADA, M.; PABST, M.; JOHNSTON, R. Activation of peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, v. 258, n. 16, p. 9631–9635, 1983.

SCHEPETKIN, I. A. *et al.* Immunomodulatory activity of Oenothlein B isolated from *Epilobium angustifolium*. *J. Immunol*, v. 183, p. 1–13, 2009.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharmacol.*, v. 6, p. 317–333, 2006.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. *J. Innate Immun.*, v. 23, p. 197–223, 2005.

SHEPHERD, V. L. *et al.* Characterization of the mannose/fucose receptor on human mononuclear phagocytes. *J. Reticuloendothel. Soc.*, v. 32, n. 6, p. 423–431, 1982.

SONG, J. Y. *et al.* Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. *Immunopharmacol*, v. 2, p. 857–865, 2002.

SOUBA, W. W. Cytokine control of nutrition and metabolism during critical illness. *Curr. Probl. Surg.*, v. 31, p. 587–643, 1994.

SOUZA, M. C. R. de *et al.* Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J Appl Phycol*, v. 19, p. 153–160, 2007.

STAHL, P. *et al.* Mannose-specific oligosaccharides recognition by mononuclear phagocytes. *Cell*, v. 51, p. 215–218, 1984.

STENVINKEL, P. *et al.* IL-10, IL-6, and $TNF - \alpha$: Central factors in the altered cytokine network of uremia - The good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.*, v. 67, p. 1216–1233, 2005.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 82, p. 7738–7742, 1985.

STUEHR, D. J. *et al.* Update on mechanism and catalytic regulation in the no synthases. *J. Biol. Chem.*, v. 279, n. 35, p. 36167–36170, 2004.

STUELP-CAMPELO, P. M. *et al.* Effect of a soluble α -d-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. *Int. Immunopharmacol.*, v. 2, p. 691–698, 2002.

TAKADA, T. *et al.* Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J. Biol. Chem.*, v. 278, n. 44, p. 43229–43235, 2003.

- TALARICO, L. B. *et al.* Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 34, p. 63–71, 2004.
- TANNIN-SPITZ, T. *et al.* Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *J. Appl. Phycol.*, v. 17, p. 215–222, 2005.
- TAYLOR, M. E.; BEZOULKA, K.; DRICKAMER, K. Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor. *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 3, p. 1719–1726, 1992.
- TAYLOR, M. E. *et al.* Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *J. Biol. Chem.*, v. 265, n. 21, p. 12156–12162, 1990.
- TIZARD, I. R. *et al.* The biological activities of mannans and related complex carbohydrates. *Mol. Biother.*, v. 6, p. 290–296, 1989.
- TSIAPALI ekaterini *et al.* Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 30, n. 4, p. 393–402, 2001.
- TUON, F. F. *et al.* Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect. Immun.*, v. 76, n. 3, p. 866–872, 2008.
- USHIO-FUKAI, M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci. STKE*, v. 349, p. re8, 2006.
- USHIO-FUKAI, M. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid. Redox Signal.*, v. 11, p. 1289–1299, 2009.
- VIGNAIS, P. V. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 59, p. 1428–1459, 2002.
- WHO. *Control of the Leishmaniasis*. Geneva, 1990.
- WHO. *Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire*. Geneva, 2002. v. 44, 365-372 p.
- WHO. *Control of the Leishmaniasis, Report by the Secretariat*. Geneva, 22 March 2007. A60/10.
- XIE, Q. wen *et al.* Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, v. 256, p. 225–228, 1992.
- YIN, J.-Y. *et al.* Chemical characteristics and antioxidant activities of polysaccharide purified from the seeds of *Plantago asiatica* L. *J. Sci. Food Agric.*, v. 90, p. 210–217, 2010.
- ZUCKERBRAUN, B. S. *et al.* Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB J.*, v. 21, p. 1099–1106, 2007.

**ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL**



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 389

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.090837/2009-19

APROVADO: 05/08/2009 – R.O. 07/2009

TÍTULO:

Avaliação de atividade leishmanicida de diferentes polissacarídeos *in vitro*

AUTORES:

Guilhermina Rodrigues Noletto, Mônica Mendes K. Marcolino, Marianna Maia Taulois do Rosário

DEPARTAMENTO:

Bioquímica

Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi
Coordenadora do CEEA