

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM SAÚDE PÚBLICA

Amanda Silva dos Santos Aliança

ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PRODUTOS NATURAIS DE
MACROALGAS DO LITORAL NORDESTINO SOBRE *Leishmania amazonensis*

RECIFE

2012

Amanda Silva dos Santos Aliança

**ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PRODUTOS NATURAIS DE
MACROALGAS DO LITORAL NORDESTINO SOBRE *Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,
Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

RECIFE

2012

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

A398e Aliança, Amanda Silva dos Santos.
Estudo da atividade biológica de produtos naturais de macroalgas do litoral nordestino sobre *Leishmania amazonensis* / Amanda Silva dos Santos Aliança. - Recife: s.n, 2012.
76, ilus, graf, tab.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2012
Orientadora: Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo.

1. Leishmaniose - quimioterapia. 2. Alga Marinha.
3. *Leishmania amazonensis*. 1. Figueiredo, Regina Célia Bressan Queiroz. II. Título.

CDU 616.993.161

Amanda Silva dos Santos Aliança

**ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PRODUTOS NATURAIS DE
MACROALGAS DO LITORAL NORDESTINO SOBRE *Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,
Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Milena de Paiva Cavalcanti
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Karina Lidianne Alcântara Saraiva
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

Aos meus pais, Argemiro de Aliança e Maria Dalva,
minhas duas grandes fontes de inspiração e a razão do
meu esforço na busca de superação, crescimento e
melhora pessoal a cada dia.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser o criador e eu criatura.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, por ter cedido sua estrutura, sem a qual seria impossível a realização desse trabalho.

À Dr^a Regina Célia B. Q. Figueiredo pelos ensinamentos e orientação durante a realização desse trabalho.

Ao Dr Éverson Bianco, por ter cedido os extratos de macroalgas.

À minha grande família, pelo amor que existe entre nós. Em especial, a minha mamãe querida Maria Dalva, aos meus irmãos Abidjan, Adailta e Daniel; as minhas lindas sobrinhas Larissa e Aninha e a minha cunhada Vilma.

Aos amigos de ontem, hoje e sempre Línthia, Danielle, Solange, Paula, Diego, Andréa e Rose estou aprendendo com vocês dia após dia como é importante edificar uma amizade, respeitando as diferenças de cada um.

Aos amigos do laboratório de Biologia Celular (Bio Cel), Aline Silva, Andrezza Borges, Divar Fernandes, Jana Sandes, Juliana Aires, Karla Ribeiro, Keicyanne Fernanda, Neyla Alves e Taciana Higino, sou muito grata a todos pelos momentos inesquecíveis de discussões científicas, horas e horas de trabalho, mas principalmente pelas nossas cantorias e resenhas. Ah, não poderia esquecer os mais novos “internos” da família Bio Cel Luís, Lívia e Thiago. Sentirei muita falta de todos!

A minha aluna de iniciação científica Keicyanne Fernanda, um agradecimento especial pela ajuda fundamental no desenvolvimento deste trabalho e companhia nas intermináveis horas de contagens e trabalho de bancada.

Aos grandes amigos que fiz na biomedicina, Anacássia Fonceca, Isabelle Freitas, Jana Sandes, Juliana Ribeiro, Lívia Bandeira, Luís Cláudio, Márcia Schneider, Maria Carolina,

Natália Gomes, Steffany Ferreira, Rafaela Fernandes, Rafael Silva, Renato César, Veridiana Sales, Wheverton Ricardo, muito obrigada por tudo.

Aos colegas de mestrado pela amizade e colaboração.

À equipe do Biotério Experimental (Giuliana, Conceição, Laurimar, Rodrigo e Eduardo).

À fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

À colaboração dos Doutores Fábio Brayner e Luiz Alves, que foi importante para a aquisição das imagens da microscopia eletrônica de varredura.

A todos, que de alguma forma, contribuíram com o desenvolvimento e conclusão desta dissertação.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver...”

Martin Luther King

ALIANÇA, Amanda Silva dos Santos. **Estudo da atividade biológica de produtos naturais de macroalgas do litoral nordestino sobre *Leishmania amazonensis***. 2012. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

RESUMO

O tratamento utilizado para a leishmaniose apresenta efeitos colaterais graves, exige acompanhamento médico e prolongado tempo de terapia. Assim, a prospecção de novos compostos contra esta doença ainda se faz necessária. As macroalgas possuem grande variedade de moléculas bioativas. No presente trabalho foi avaliada a atividade leishmanicida, a citotoxicidade, a produção de óxido nítrico (NO) e os possíveis alvos dos extratos de macroalgas. Foi avaliado o efeito de 10 extratos sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*. A citotoxicidade em células de mamíferos foi avaliada através do método do MTT e o índice de seletividade foi determinado. A produção de NO por macrófagos foi avaliada pelo reagente de Griess. A análise ultraestrutural foi realizada por microscopia eletrônica. Para análise dos efeitos dos extratos sobre a membrana e o potencial de membrana mitocondrial células tratadas e controles foram submetidas à marcação com iodeto de propídio (IP) e rodamina 123. Os dados mostraram que todos os extratos inibiram o crescimento de formas promastigotas e apresentaram baixa toxicidade para células de mamífero. *Canistrocarpus cervicornis* (CC), *Dictyota mertensii* (DM) e *Laurencia dendroidea* (LD) foram as mais efetivas e mais seletivas contra formas promastigotas entre todas as algas testadas. Estes extratos também inibiram a infecção e índice de sobrevivência de formas amastigotas no interior de macrófagos. Esses extratos aumentaram a produção de NO em relação às células controles. Alterações compatíveis com a perda de viabilidade e morte celular foram observadas por microscopia eletrônica. Células tratadas apresentaram discreto aumento no número de células IP⁺. Os extratos induziram alterações significativas no potencial de membrana mitocondrial. A baixa toxicidade às células de mamíferos e a atividade leishmanicida apresentadas apontam para a utilização dos extratos de CC, DM e LD como agentes promissores para o tratamento da leishmaniose cutânea.

Palavras chaves: Leishmaniose- quimioterapia. Alga Marinha. *Leishmania amazonensis*.

ALIANÇA, Amanda Silva dos Santos. **Study of the biological activity of natural products from macroalgae of the northeastern coast against *Leishmania amazonensis***. Dissertation (Academic Master in Public Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

ABSTRACT

The treatment used for leishmaniasis has severe side effects, requires medical supervision and prolonged therapy. Thus, the screening of new compounds against these diseases is still needed. Seaweeds possess a wide variety of bioactive molecules. In this study we evaluated the leishmanicidal activity, cytotoxicity, the nitric oxide production and the possible targets of macroalgae extracts. Was evaluated the effect of 10 extracts on promastigote growth. The cytotoxic potential of these extract against mammalian cells were evaluated by using MTT method and he selectivity index was determined. The nitric oxide (NO) production by macrophages was measured by Griess reagent. The ultrastructural analysis was performed by electron microscopy. To analyze the effects of extracts on the membrane and the mitochondrial membrane potential, treated and untreated cells were submitted to propidium iodide and Rhodamin 123 staining. The data showed that all tested extract inhibited the growth of promastigotes and presented low toxicity for mammalian cells. *Canistrocarpus cervicornis* (CC), *Dictyota mertensii* (DM) e *Laurencia dendroidea* were the most effective and selective against promastigotes among the tested algae. These extracts efficiently inhibited the infection and the survival index of amastigotes inside macrophages. Our results showed that CC, CM and LD increase NO production as compared to control cells. Changes consistent with the loss of viability and cell death were observed by electron microscopy. Treated cells presented slight increase in PI⁺ cells. The extracts were able to induce significant changes in the mitochondrial membrane potential. The low toxicity of CC, DM and LD and their high leishmanicidal activity, point to the use of CC, DM and LD as promissory agents for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Key-Words: Leishmaniasis- chemotherapy. Marine Algae. *Leishmania amazonensis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	O inseto vetor da leishmaniose e os hospedeiros reservatórios do parasita <i>Leishmania</i> sp.	16
Figura 2-	Distribuição mundial da leishmaniose cutânea e visceral	16
Figura 3-	Manifestações clínicas da Leishmaniose (LC, LMC, LCD e LD)	19
Figura 4-	Manifestações clínicas da Leishmaniose (Leishmaniose Visceral)	20
Quadro 1-	As principais espécies de <i>Leishmania</i> e suas manifestações clínicas	21
Figura 5-	Desenho esquemático da distribuição geográfica dos agentes etiológicos da Leishmaniose cutânea no Brasil	22
Figura 6-	Representação esquemática das formas evolutivas de <i>Leishmania</i> sp	23
Figura 7-	O ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp	24
Figura 8-	Estrutura química dos antimoniais pentavalentes	28
Quadro 2-	Espécies estudadas no trabalho que possuem atividade biológica descrita na literatura	31
Figura 9-	Algas pardas - <i>Canistrocarpus cervicornis</i> e <i>Dictyota mertensii</i>	32
Figura 10-	Algas vermelhas - <i>Laurencia dendroidea</i> e <i>Hypnea musciformis</i>	33
Figura 11-	Algas verdes - <i>Caulerpa racemosa</i> e <i>Chaetomorpha antennina</i>	33
Quadro 3-	Lista de espécies estudadas e os respectivos locais de coleta	38
Figura 12-	Evaporador rotativo	39
Figura 13-	Ultraestrutura da forma promastigota	49
Figura 14-	Efeito dos extratos de CC, DM e LD sobre a ultraestrutura de <i>L. amazonensis</i>	50
Figura 15-	Microscopia eletrônica de varredura de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	51
Figura 16-	Microscopia confocal de células controles e tratadas com o extrato de <i>D. mertensii</i> e <i>L. dendroidea</i> submetidas à marcação com iodeto de propídio	56
Figura 17-	Microscopia confocal de células controles e tratadas com o extrato de <i>D. mertensii</i> e <i>L. dendroidea</i> submetidas a marcação com rodamina 123.	57
Figura 18-	Cromatografia de camada delgada dos extratos de <i>L. dendroidea</i> coletadas em diferentes localidades e extraídos com solventes distintos	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Distribuição dos casos de LTA notificados no Brasil por região durante o período de 2001 a 2010	17
Gráfico 2-	Inibição do crescimento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	46
Gráfico 3-	Índice de sobrevivência após tratamento com os extratos por 18 horas	47
Gráfico 4-	Histogramas representativos do efeito do tratamento de promastigotas com os extratos de macroalgas sobre a permeabilidade da membrana	53
Gráfico 5-	Histograma representativo do efeito dos extratos de DM e LD sobre a polarização da membrana mitocondrial	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Esquema terapêutico para as formas clínicas de LTA	29
Tabela 2-	Rendimentos dos extratos brutos obtidos a partir de 20g uma massa seca das algas	44
Tabela 3-	Efeito dos extratos sobre o crescimento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e sobre macrófagos.	45
Tabela 4-	Efeitos dos extratos de CC, DM e LD sobre formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	47
Tabela 5-	Efeito dos extratos na produção de Óxido Nítrico (μM) por macrófagos	58
Tabela 6-	Porcentagem de células com Iodeto de propídio	52
Tabela 7-	Efeito dos extratos de DM e LD sobre o potencial de membrana mitocondrial	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CC ₅₀	Concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% das células
CI ₅₀	Concentração de Inibição de 50% do crescimento
DIC	Differential Interference Contrast
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Extrato de Macroalga
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
IL	Interleucina
IP	Iodeto de Propídeo
ISe	Índice de Seletividade
ISo	Índice de Sobrevivência
IV	Índice de variação
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LVA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MC	Média de intensidade do controle
MT	Média de intensidade do tratado
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate Buffer Saline
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
Sb	Antimoniais Pentavalentes
SFB	Soro fetal bovino
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Leishmanioses	16
1.2	Formas clínicas	18
1.3	Agente etiológico	21
1.4	Ciclo de vida e Imunologia	23
1.5	Biologia celular da <i>Leishmania</i> sp.	25
1.5.1	Mitocôndria	25
1.5.2	Microtúbulos	26
1.5.3	Glicossomos	26
1.5.4	Acidocalcisomas	27
1.5.5	Megassomos	27
1.6	Quimioterapia	28
1.7	Macroalgas	30
2	JUSTIFICATIVA	35
3	PERGUNTA CONDUTORA	36
4	OBJETIVOS	37
4.1	Objetivo geral	37
4.2	Objetivos específicos	37
5	MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1	Coleta das amostras	38
5.2	Obtenção e preparo dos extratos	38
5.3	Cultivo dos parasitas	39
5.4	Atividade biológica dos extratos em <i>Leishmania amazonensis</i>	39
5.5	Análise de citotoxicidade dos extratos em células de mamífero	40
5.6	Produção de óxido nítrico	42
5.7	Análise ultraestrutural	42

5.8	Análises por Citometria de fluxo e Microscopia confocal	42
5.9	Análise estatística	43
6	RESULTADOS	44
7	DISCUSSÃO	58
8	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	67
	Anexo A - Parecer do CEUA/CPqAM	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses, são doenças zoonóticas tropicais causadas por protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania*, são transmitidas pela picada de fêmeas de insetos flebotomíneos (DIPTERA: PSYCHODIDAE) (HARHAY et al., 2011). Estas patologias acometem o homem e algumas espécies de mamíferos sinantrópicos, silvestres e domésticos, os quais alguns são considerados como hospedeiros reservatórios (REY, 2001) (**Figura 1**). Apenas dois gêneros de vetores são realmente importantes para a epidemiologia das leishmanioses no mundo: *Lutzomya*, que são os vetores nas Américas; e *Phlebotomus* que são os transmissores de leishmaniose na África, na Europa e na Ásia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004) (**Figura 1**).

Figura 1- O inseto vetor da leishmaniose e os hospedeiros reservatórios do parasita *Leishmania* sp.

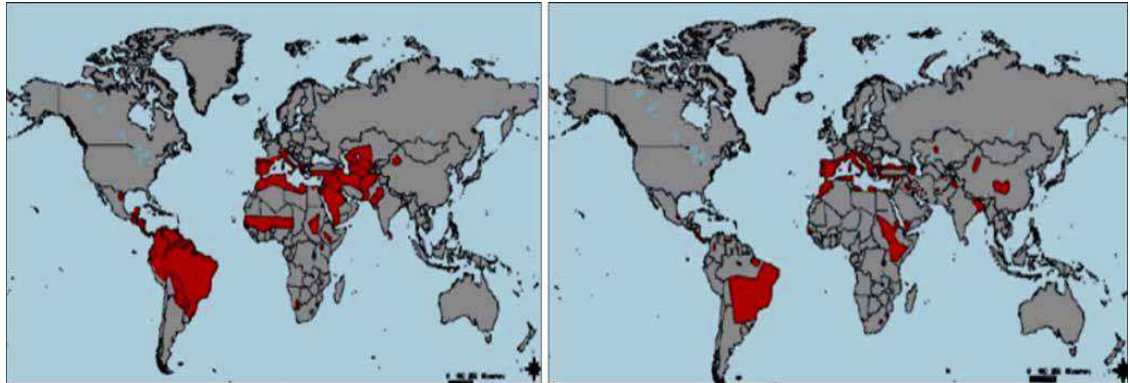


Fonte: Brasil (2007)

Legenda: Fêmea do flebotomíneo; Mamífero sinantrópico; Mamífero silvestre; Mamífero doméstico.

Sendo consideradas doenças de importância no contexto da saúde pública, as leishmanioses estão incluídas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) entre as seis doenças endêmicas de maior relevância no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006). As leishmanioses estão presentes em 88 países, com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas, 350 milhões de pessoas sob o risco de infecção (**Figura 2**). São estimados cerca de 2 milhões novos casos, sendo 500.000 de leishmaniose visceral e 1.500.000 da forma tegumentar (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

Figura 2- Distribuição mundial da leishmaniose cutânea (esquerda) e visceral (direita). As áreas afetadas estão marcadas em vermelho.

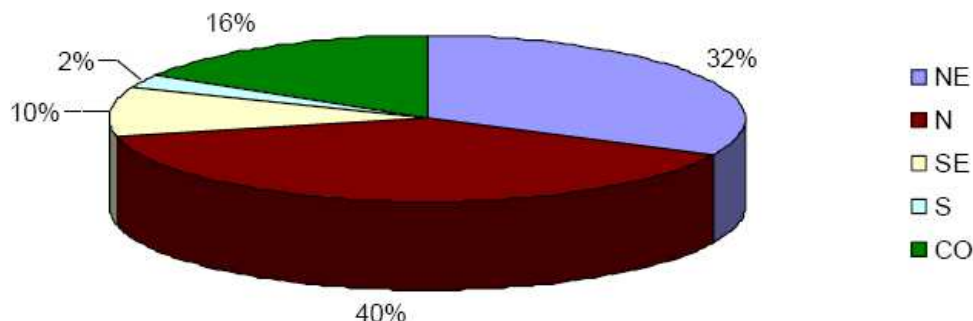


Fonte: Santos et al. (2008)

As leishmanioses ainda são uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando principalmente os países mais pobres, principalmente os em desenvolvimento, como Índia, Bangladesh, Sudão, Brasil, Nepal e Etiópia que contribuem com noventa por cento dos casos mundiais da leishmaniose visceral. Noventa por cento dos casos de leishmaniose tegumentar ocorrem no Afeganistão, Algeria, Etiópia, Sudão, Irã, Iraque, Arábia Saudita, Síria, Brasil e Peru (DESJEUX, 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008).

No Brasil, a doença é considerada de notificação compulsória, estando presente em todos os estados brasileiros, principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, com incidência de mais de 23.000 casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (BRASIL, 2007) e cerca de 2.000 casos da forma visceral (MAIA-ELKHOURY et al., 2008) (**Gráfico 1**).

Gráfico 1- Distribuição dos casos de LTA notificados no Brasil por região durante o período de 2001 a 2010.



Fonte: Sistema de Informação Nacional de Agravos de Notificação (2011)

Na última década, tem-se observado a expansão das áreas consideradas endêmicas para as leishmanioses, assim como o aparecimento de surtos epidêmicos em regiões antes

consideradas livres dessas doenças. Entre os fatores que contribuem para este crescimento temos indivíduos que visitam áreas endêmicas ou indivíduos portadores que migram para outras regiões (SCHWARTZ; HATZ; BLUM, 2006), além de casos associados à aceleração do desmatamento para as expansões agrícolas e urbanas, entre outras atividades (DESJEUX, 2001).

A doença está presente em todas as regiões do Estado de Pernambuco, com predominância (mais de 60% dos casos humanos) na região correspondente à Zona da Mata Atlântica, sendo a quase totalidade da forma cutânea localizada (BRANDÃO-FILHO et al., 1999). É importante registrar que, a partir de 2000, verifica-se também um aumento da ocorrência de leishmaniose cutânea no Sertão do Estado (PERNAMBUCO, 2002), demonstrando que a doença apresenta um aumento no número de casos e uma importante expansão espacial (ANDRADE et al., 2009).

1.2 Formas clínicas

As leishmanioses apresentam grande diversidade de manifestações clínicas que dependem tanto da espécie infectante quanto de fatores do hospedeiro, os quais determinam a resposta imunológica ao agente agressor podendo assumir, a forma tegumentar, que inclui a cutânea e mucocutânea e a forma visceral (BRASIL, 2007) (**Figura 3 e 4**).

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, o risco de ocorrência de deformidades que podem produzir no ser humano e o envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (BRASIL, 2007).

As manifestações clínicas da LTA são diversas e incluem: (a) forma cutânea localizada (**Figura 3A**), a mais frequente, com lesão única; (b) disseminada (**Figura 3D**), que se caracteriza pela presença de várias lesões distribuídas em diversas regiões do corpo; (c) difusa, em que as lesões se apresentam de forma nodular (**Figura 3C**); (d) forma mucocutânea em que pode ocorrer à destruição do septo nasal e boca, resultando em deformidades severas (**Figura 3B**) (MURRAY, et al., 2005). As lesões apresentam aspectos variados e a infecção secundária bacteriana altera este aspecto tornando-as mais inflamadas, dolorosas e purulentas (BRASIL, 2007).

Atualmente pode-se dizer que, no Brasil, a leishmaniose cutânea apresenta três padrões epidemiológicos característicos: a) Silvestre - a transmissão ocorre em área de

vegetação primária e é fundamentalmente uma zoonose de animais silvestres, que pode acometer o ser humano quando este entra em contato com o ambiente silvestre, onde esteja ocorrendo enzootia; b) Ocupacional e Lazer - a transmissão está associada à exploração desordenada da floresta por derrubada de matas para construção de estradas, usinas hidrelétricas, instalação de povoados, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, de treinamentos militares e ecoturismo; c) Rural e periurbano em áreas de colonização – este padrão está relacionado ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais (BRASIL, 2007).

Figura 3- Manifestações clínicas da Leishmaniose.



Fonte: Brasil (2007); Veloso et al. (2006)

Legenda: A- Leishmaniose Cutânea (LC), B- Leishmaniose Mucocutânea (LMC), C- Leishmaniose Difusa (LCD), D- Leishmaniose Disseminada (LD)

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica muito grave, com migração dos parasitos para o fígado, baço e medula óssea, podendo levar o paciente a morte (CARVALHO; ARRIBAS; FERREIRA, 2000; HANDMAN, 2000) (**Figura 4**). No Brasil, a LV inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte (BRASIL, 2007). A doença é mais freqüente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em

menores de 5 anos. O sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (60%) (BRASIL, 2007).

Figura 4- Manifestações clínicas da Leishmaniose (Leishmaniose Visceral)



Fonte: Desjuex (2011)

Nota: Inchaço do fígado e do baço provocado pelos parasitas

No Brasil, já foram identificadas sete espécies do parasita, seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*, sendo as três principais causadoras de LTA: *L. (V.) brasiliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. No Novo Mundo, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a espécie comumente isolada em pacientes com LV (BRASIL, 2007) (Quadro 1).

Quadro 1- As principais espécies de *Leishmania* e suas manifestações clínicas.

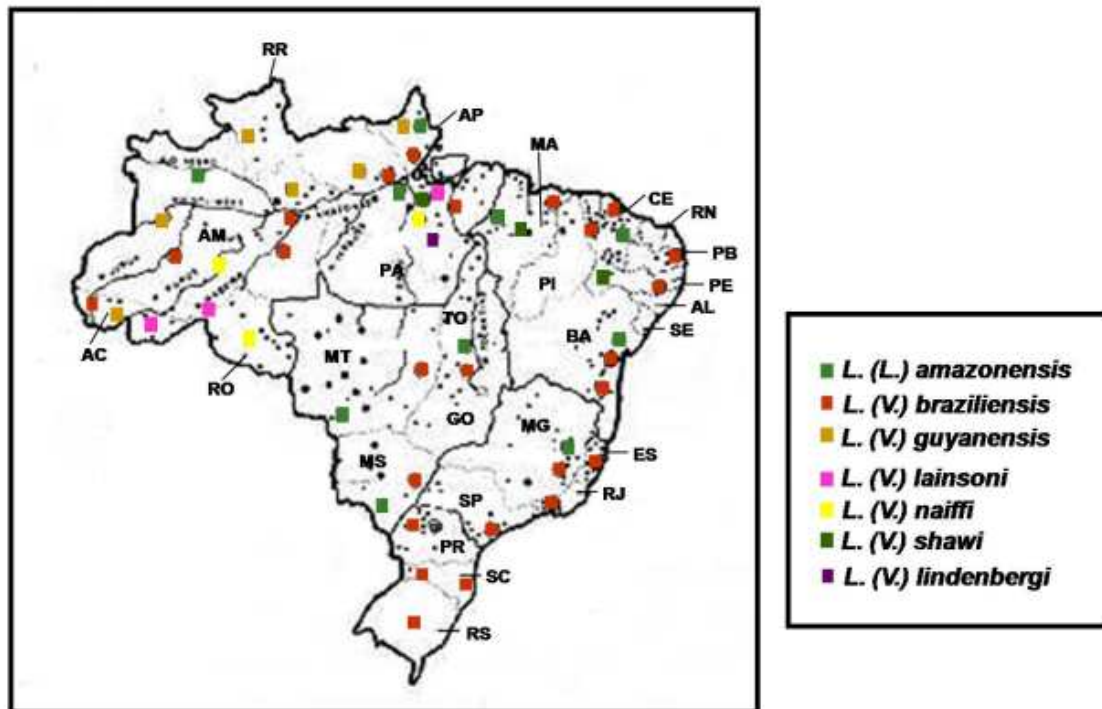
Principais manifestações	Espécies
Velho Mundo- subgênero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniose Cutânea	<i>L. major</i> , <i>L. tropica</i>
Leishmaniose Visceral	<i>L. infantum</i> e <i>L. donovani</i>
Novo Mundo- subgênero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniose Cutânea	<i>L. mexicana</i> , <i>L. amazonensis</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>L. mexicana</i> , <i>L. amazonensis</i>
Leishmaniose Visceral	<i>L. chagasi</i>
Novo Mundo- subgênero <i>Viannia</i>	
Leishmaniose Cutânea	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. peruviana</i>
Leishmaniose Mucocutânea	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. panamensis</i>

Fonte: Modificado de Organização Mundial da Saúde (2010)

1.3 Agente etiológico

O gênero *Leishmania* abrange cerca de 30 espécies catalogadas, das quais 20 estão implicadas em doenças de humanos (ASHFORD, 2000). Os parasitos do gênero *Leishmania* são classificados em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, sendo esta classificação baseada no desenvolvimento do parasito no inseto vetor. As espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* desenvolvem-se primeiramente no intestino posterior dos vetores e depois migram para o intestino médio e anterior (secção peripilária). Já os do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se apenas no intestino anterior e médio (secção suprapilária) (LAINSON; SHAW, 1998) (**Figura 5**).

Figura 5- Desenho esquemático da distribuição geográfica dos agentes etiológicos da Leishmaniose cutânea no Brasil.

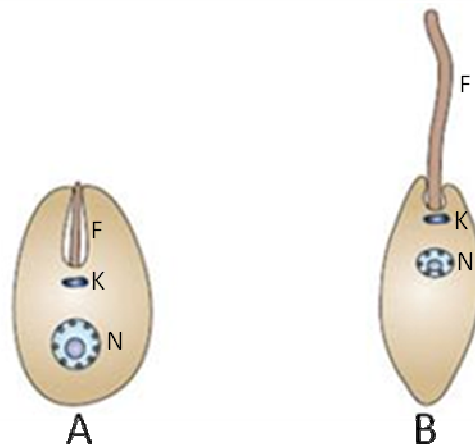


Fonte: Modificado de Grimaldi et al. (1987) e Marzochi (1994)

Durante o seu ciclo de vida, os parasitas do gênero *Leishmania*, apresentam dois estágios: a forma promastigota com motilidade flagelar, que vive no trato digestivo dos flebotomíneos, e a forma amastigota, não móvel, que reside dentro de macrófagos de hospedeiros vertebrados (**Figura 6**).

As promastigotas possuem forma alongada, com único núcleo, flagelo livre e cinetoplasto (região especializada da mitocôndria onde se localiza o DNA mitocondrial) anterior ao núcleo. O tamanho das formas promastigotas é variável, mesmo dentro de uma mesma espécie, podendo medir entre 16,0 – 40,0 x 1,5 – 3,0 μm (comprimento x largura) incluindo o flagelo que é sempre maior que o corpo do parasito. Multiplica-se por divisão binária longitudinal dentro do tubo digestivo do inseto vetor. As amastigotas se multiplicam no interior dos macrófagos possuindo morfologia ovalada, com núcleo único, cinetoplasto e um flagelo que nunca excede os limites da bolsa flagelar. A forma amastigota varia de tamanho dependendo da espécie, podendo medir entre 3,0 – 6,5 x 1,5 – 3,0 μm (comprimento x largura).

Figura 6- Representação esquemática da forma amastigota e promastigota de *Leishmania* sp. Mostrando o núcleo (N), flagelo (F) e cinetoplasto (K).



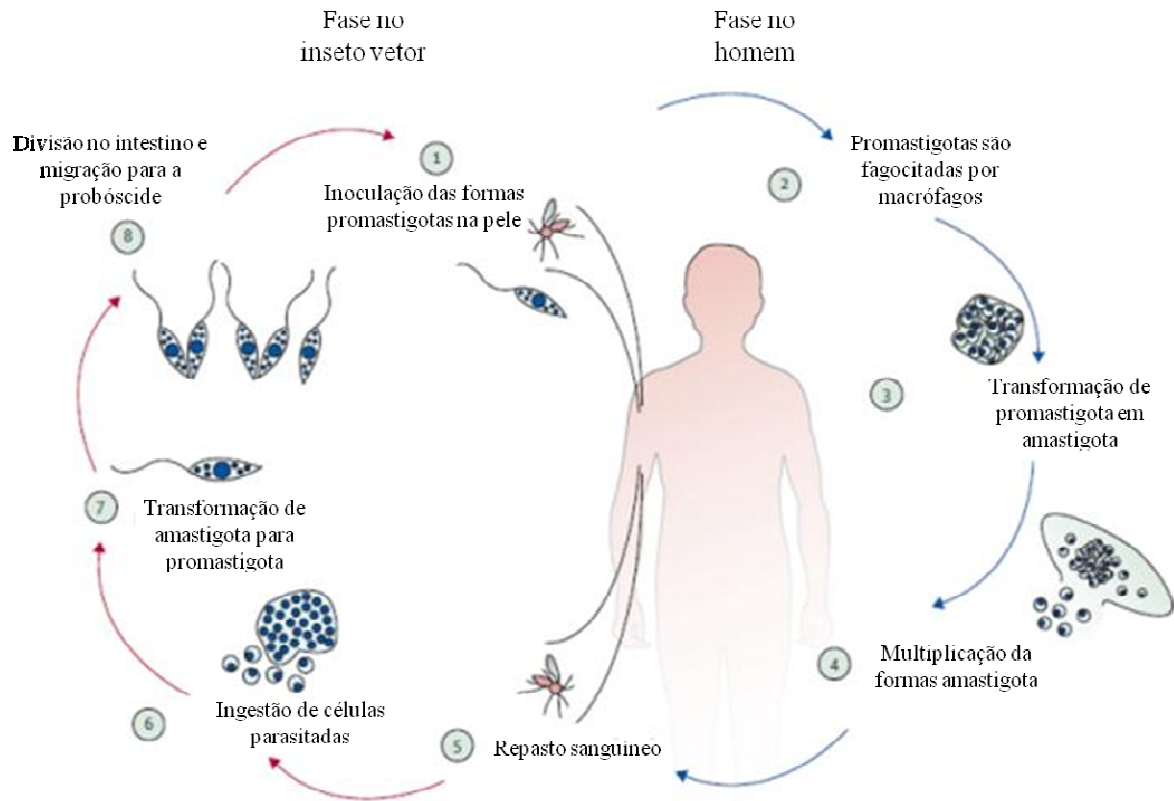
Legenda: A- Forma amastigota e B- Forma promastigota

Fonte: Modificado de Docampo et al. (2005)

1.4 Ciclo de vida e Imunologia

O ciclo biológico da *Leishmania* é heteroxeno, envolvendo um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. Os hospedeiros invertebrados são flebotomíneos hematófagos do gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo, ou *Phlebotomus*, no Velho Mundo (ROBERTS; JANOVY, 2000). Além de um vetor invertebrado, o parasito necessita de um hospedeiro vertebrado que atua como reservatório. Dentre estes, temos uma ampla variedade de roedores, canídeos, marsupiais e humanos. Geralmente o homem participa do ciclo de transmissão como um hospedeiro acidental quando entra em ambientes de alta transmissão, onde a doença se mantém em função dos reservatórios naturais (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987).

Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor regurgita as formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado. Estas formas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear iniciando a fase de desenvolvimento intracelular do parasito, onde se diferenciam em amastigotas. As amastigotas se multiplicam dentro das células, que podem se romper e assim reinfetar mais células. Eventualmente, as amastigotas livres ou células infectadas podem ser ingeridas por um flebotomíneo não infectado durante o repasto sanguíneo. No interior do intestino dos insetos as células infectadas se rompem liberando as formas amastigotas, que se transformam em promastigotas recomeçando o ciclo biológico do parasita (KAYE; SCOTT, 2011) (**Figura 7**).

Figura 7- O ciclo biológico da *Leishmania* sp.

Fonte: Reithinger et al. (2007)

Além das formas promastigotas, ao se alimentar o inseto inocula componentes da própria saliva, como a proteína maxadilan, que é um vasodilatador (LERNER; SHOEMAKER, 1992). Os componentes salivares e as moléculas do parasita possuem um papel na ativação da resposta imune do hospedeiro contra o parasita. Quando na pele, as promastigotas interagem primeiramente com as células residentes, por exemplo, macrófagos da derme, queratinócitos e células de Langerhans (KAYE; SCOTT, 2011 apud LOCKSLEY et al., 1988). Nos macrófagos, os parasitos internalizados se estabelecem em um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma), que os separa do citoplasma celular. No interior do vacúolo parasitóforo ocorre a mudança da forma evolutiva de promastigota para amastigota (**Figura 7**). Embora os macrófagos sejam células fagocitárias especializadas no combate a agentes infecciosos, as leishmanias desenvolveram mecanismos de defesa capazes de subverter sua capacidade microbicida, conseguindo sobreviver neste ambiente potencialmente tóxico e multiplicar-se até a ruptura da célula, quando são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando a infecção (VANNIER-SANTOS et al., 2002).

Trabalhos experimentais (GOLLOB et al., 2008; NATEGHI et al., 2010) demonstram a relação entre o tipo de resposta adquirida do hospedeiro e a sensibilidade/resistência ao parasita, onde a resistência está relacionada a presença de células T CD4⁺ Th1 e células T CD8⁺ que são responsáveis pela ativação de macrófagos para fagocitar parasitas intracelulares e/ou lisar células infectadas. Por outro lado a sensibilidade a doença é relacionada à presença de células T CD4⁺ Th2 com produção de interleucinas (IL)-4, IL-5 e IL -10, que inibem a ativação de macrófagos e a produção de IL-12 (PASSERO et al., 2010). No caso das infecções por microrganismos intracelulares, inclusive na infecção por *Leishmania*, a ativação das células Th2 leva ao agravamento da doença (COSTA et al., 2011). Na leishmaniose cutânea, o balanço Th1/Th2 tem sido utilizado no diagnóstico para prever o desenvolvimento de resistência ou progressão da doença (PASSERO et al., 2010).

Uma das espécies causadoras da LTA no Brasil é a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, responsável pelas formas cutânea, cutâneo-mucosa e cutâneo-difusa (LCD), esta última considerada o pólo anérgico da LTA (BARRAL et al., 1991). A principal característica imunológica da LCD é a ausência de resposta imunocelular específica contra antígenos da *Leishmania* (PETERS et al., 1982).

A resposta Th1, com produção predominante de IFN- γ , se associa com resistência em todas as formas de leishmaniose (BARRAL-NETTO et al., 1998; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Há indicações que a *L. amazonensis* pode levar a apresentação antigênica não efetiva e induzir apoptose com possível envolvimento na hiporresponsividade de produção de citocinas implicadas na atividade leishmanicida (PINHEIRO et al., 2004).

1.5 Biologia Celular da *Leishmania* sp.

Os protozoários possuem organelas comuns a outras células eucarióticas, como Complexo de Golgi e Retículo Endoplasmático, mas possuem estruturas citoplasmáticas e organelas que lhes são peculiares. Estudos revelaram que nessas organelas existem vias metabólicas únicas que abrem possibilidades para a identificação de alvos terapêuticos potenciais (SOUZA, 2008). Veremos algumas delas com mais detalhamento a seguir.

1.5.1 Mitocôndria

Ao contrário das células de mamíferos que possuem centenas a milhares de mitocôndrias protozoários tripanosomatídeos, entre os quais se incluem o *Trypanosoma cruzi*

e as diversas formas de *Leishmania*, possuem uma mitocôndria única (FIDALGO; GILLE, 2011). O bom funcionamento desta estrutura torna-se, desta forma, imprescindível para a sobrevivência dos parasitas (MEHTA; SHAHA, 2004). A ultraestrutura da mitocôndria nos tripanosomatídeos é bastante diversa em comparação aos organismos multicelulares, no que diz respeito a densidade da matriz bem como a forma e número de cristas. Geralmente a mitocôndria se localiza abaixo da membrana plasmática correndo todo o corpo do parasita abaixo dos microtúbulos sub-peliculares. Uma característica peculiar da mitocôndria dos protozoários da ordem kinetoplastida, é que o DNA mitocondrial (k-DNA) concentra-se em uma região especializada da mitocôndria denominada cinetoplasto (SOUZA; ATTIAS; RODRIGUES, 2009). O cinetoplasto se situa próximo ao núcleo e sua forma e organização estrutural variam de acordo como o estágio de desenvolvimento do protozoário (SOUZA, 2008). O k-DNA representa cerca de 30% do DNA celular e é composto de duas classes de moléculas circulares de diferentes tamanhos, os maxi- e minicírculos (SHAPIRO; ENGLUND, 1995).

1.5.2 Microtúbulos

Nos tripanossomatídeos, os microtúbulos sub-peliculares são feixes de microtúbulos arranjados em paralelo e estão localizados exclusivamente na periferia da célula. Através da criofratura (HEUSER, 2001) vê-se claramente que eles são conectados uns aos outros através de filamentos, bem como à membrana plasmática e à cisterna periférica do retículo endoplasmático. São estruturas resistentes a baixas temperaturas, bem como à inúmeras drogas usualmente empregadas na ruptura de microtúbulos, como colchicina, colcemide e taxol (SOUZA, 2008).

1.5.3 Glicossomos

Os glicossomos aparecem normalmente como organelas esféricas distribuídas aleatoriamente por toda a célula. O número de glicossomos e a área que ocupam no citoplasma de tripanossomatídeos variam de acordo com as espécies e até mesmo entre estágios de desenvolvimento dentro da mesma espécie. Estas organelas não possuem genoma. Portanto, suas proteínas são codificadas por genes nucleares, traduzidas nos ribossomos livres, e importadas para a organela pós-tradução. A função dos glicossomos parece residir exclusivamente na glicólise, onde as enzimas glicolíticas ocupam 90% do conteúdo protéico

desta organela em *T. brucei*. Dentre as enzimas que compõem essa organela, sete participam das primeiras etapas da via glicolítica e duas metabolizam glicerol, permitindo que esses parasitas aumentem significativamente a taxa de glicólise e, conseqüentemente, a produção de ATP. Além das funções relacionadas à produção de energia, outras vias bioquímicas estão pelo menos parcialmente associadas aos glicossomos nesses parasitas, como a β -oxidação de ácidos graxos, a biossíntese de pirimidinas, entre outras (MICHELS et al., 2006).

1.5.4 Acidocalcisomas

Os acidocalcisomas são organelas encontradas em todos os membros da família Trypanosomatidae e muitos membros do filo Apicomplexa (DO CAMPO et al., 2005). Estas estruturas são morfológicamente variáveis de acordo com a espécie, o meio de cultivo, etc. São organelas eletrondensas acídicas, ricas em polifosfato (poliP) complexado com cálcio e outros cátions. Enquanto sua matriz contém enzimas relacionadas com o metabolismo de PoliP, sua membrana é rica em bombas do tipo P (Ca^{++} -ATPase, V- H^+ -ATPase, H^+ -PPase), transportadoras (Na^+/H^+ , $\text{Ca}^{++}/\text{H}^+$), e no mínimo uma proteína canal (aquaporina) (DO CAMPO; MORENO, 2008) podendo também ser atribuída a esta organela a manutenção do equilíbrio de íons incluindo o cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco, ferro, compostos fosforados (como determinado por análises bioquímicas e por microanálise de raio-X), controle do pH e osmoregulação juntamente com o vacúolo contrátil (DO CAMPO et al., 2005).

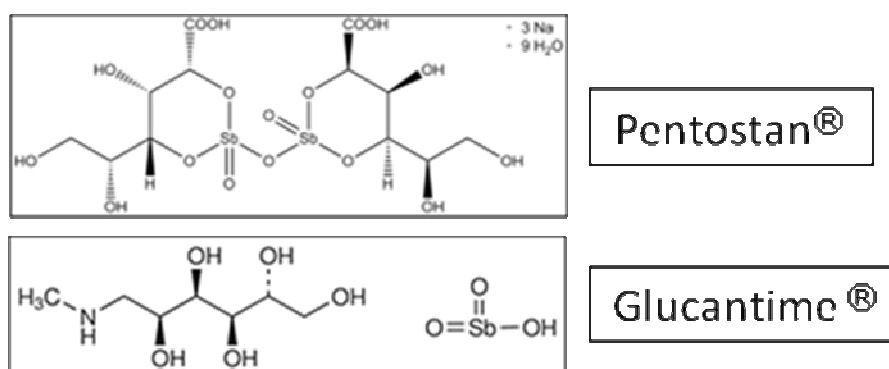
1.5.5 Megassomos

Os megassomos são estruturas elétrondensas delimitadas por membranas abundantes no citoplasma, primeiramente descritos em formas amastigotas de *Leishmania* pertencentes ao complexo mexicana. Variam de tamanho, número e aparência. Sua matriz é heterogênea, apresentando inclusões densas e vesículas (UEDA-NAKAMURA; ATTIAS; DE SOUZA, 2001). Através da citoquímica, mostrou-se que o megassomo contém fosfatase ácida e cisteína-proteinase correspondendo a um lisossomo típico. Megassomos não são observados em formas promastigotas, aparecendo apenas durante o processo de transformação destas formas em amastigotas (BOUKAI et al., 2000). Estas organelas e seus constituintes podem estar diretamente envolvidos na infectividade e virulência da *Leishmania* (UEDA-NAKAMURA et al., 2007).

1.6 Quimioterapia

O tratamento das leishmanioses é feito através de antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan) e o antimoniato de meglumina (Glucantime) (**Figura 8**), os quais foram introduzidos como quimioterápicos na década de 40, sendo utilizados até os dias atuais apesar de sua toxicidade. Embora sejam fármacos de primeira escolha, os antimoniais, apresentam eficácia limitada e algumas vezes significativa toxicidade e efeitos adversos (AMATO et al, 2008). Os antimoniais pentavalentes são indicados para o tratamento de todos os tipos de manifestações clínicas da leishmaniose. Eles interferem na bioenergética das formas amastigotas da *Leishmania*, inibindo tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, causando a redução na produção de ATP e GTP (BRASIL, 2007).

Figura 8- Estrutura química dos antimoniais pentavalentes



Fonte: Kumari e Ram (2002)

No Brasil, o medicamento antimonial de escolha é antimoniato de meglumina, o qual, se administrado de forma contínua e posologicamente adequada, é eficaz ao tratamento das formas visceral, cutânea e mucocutânea de leishmaniose. Por sua vez, baixas dosagens e tratamentos descontínuos levam a falhas na terapia e ao aparecimento de formas resistentes do parasita (RATH et al, 2003). Com o objetivo de padronizar o esquema terapêutico, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose deste antimonial seja calculada em mg Sb+5/kg/dia (BRASIL, 2007). Podem ocorrer um ou mais efeitos adversos, na seguinte ordem de frequência: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda (IRA). Essas queixas são geralmente discretas ou moderadas e raramente exigem a suspensão do tratamento. Porém, na dose de 20mg Sb+5/kg/dia, o antimonial pode atingir seu

limiar de toxicidade, levando a alterações cardíacas, pancreáticas ou renais que obriguem a suspensão do tratamento (BRASIL, 2007). Recomenda-se o tratamento da LV com a dose de 20mg Sb+5/kg/dia, por no mínimo 20 dias e no máximo 40 dias, por via endovenosa ou intramuscular (BRASIL, 2006) (**Tabela 1**).

Tabela 1- Esquema terapêutico para as formas clínicas de LTA

Forma Clínica	Dose	Tempo de duração mínimo
Leishmaniose Cutânea	10- 20mg Sb+5/kg/dia	20 dias
Leishmaniose Difusa	20mg Sb+5/kg/dia	20 dias
Leishmaniose Mucosa	20mg Sb+5/kg/dia	20 dias
Leishmaniose Visceral	20mg Sb+5/kg/dia	20 dias

Fonte: Modificado de Brasil (2007)

Como segunda linha de escolha para o tratamento tem-se a Pentamidina e a Anfotericina B (AMATO et. al., 2008). A pentamidina é a droga, mais comumente recomendada, embora também apresente efeitos adversos significantes e requeira administração parenteral (GIL et al., 2007). A anfotericina, um antibiótico macrolítico, é usada extensivamente no caso de falhas no tratamento com compostos antimoniais. Apesar de sua elevada toxicidade e de também requerer administração parenteral, tem sido proposta como agente terapêutico de escolha para leishmaniose visceral e para infecção sistêmica por fungos (CROFT; COOMBS, 2003). No caso do tratamento de pacientes gestantes com LTA e pacientes com coinfeção Leishmania/HIV esta droga passa ser a primeira escolha (BRASIL, 2009). A anfotericina lipossomal é uma nova formulação em que a anfotericina B é incorporada a lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. No Brasil, esta droga está registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para uso no tratamento da leishmaniose visceral (BRASIL, 2009). Tanto a anfotericina quanto a pentamidina possuem limitações e efeitos colaterais frequentes e graves, como alterações renais, cardíacas e hepáticas (BRASIL, 2007) além de alto custo de tratamento e necessidade de serviços de maior complexidade para sua administração.

A paromicina é o único aminoglicosídeo com atividade leishmanicida importante clinicamente. Ambas as formas de leishmaniose podem ser tratadas com esse antibiótico, mas por ter baixa absorção oral formulações parenterais e tópicas tem sido desenvolvida para a forma visceral e cutânea, respectivamente (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Além de a ação da droga sobre os parasitas o sucesso do tratamento da leishmaniose está sujeito a imunidade celular, independentemente da droga utilizada. Assim, em pacientes com co infecção HIV- leishmaniose o tratamento tende mais ainda ao insucesso - entre 40% e 65% (CHRISTOPHER et al., 2007).

1.7 Macroalgas

A flora brasileira apresenta um imenso potencial para a produção de compostos primários e secundários, uma vez que cerca de 16% das 500.000 espécies de plantas que existem no mundo encontram-se na floresta Amazônica (BASSO et al., 2005; MYERS et al., 2000). Entretanto, a pesquisa de substâncias ativas derivadas de plantas no Brasil, em especial da região Nordeste, ainda é muito incipiente: estima-se que até o início da década de 80 menos de 1% das espécies da flora brasileira eram conhecidas quanto aos seus constituintes químicos (GOTTLIEB; MORS 1980). A demanda por novos fármacos leishmanicidas tem se intensificado com o aumento da resistência aos antimoniais pentavalentes, bem como a fármacos de segunda geração (VOULDOUKIS et al., 2006). Reforçando esta idéia sabe-se que produtos naturais derivados de plantas representam mais que 30% do mercado farmacêutico (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

Sabe-se que a maioria dos estudos tem se focado na procura de substâncias naturais derivadas de vegetais superiores terrestres, principalmente devido à facilidade de acesso quando comparados aos marinhos (BASSO et al., 2005). No entanto, os oceanos cobrem 70 % da superfície terrestre e são habitados por cerca de 200.000 espécies de plantas e invertebrados marinhos e milhões de microrganismos (PINTO et al., 2002). A capacidade metabólica e fisiológica desses organismos marinhos, em especial as macroalgas, em lidar com um ambiente altamente complexo e muitas vezes hostil, tem despertado o interesse de vários pesquisadores quanto ao manancial de compostos bioativos que não encontram paralelo no ambiente terrestre. De fato, vários trabalhos têm demonstrado o valor das macroalgas, como fonte de compostos bioativos (FAULKER, 2002). Estes organismos são utilizados na alimentação e na medicina popular, principalmente entre os povos orientais, desde tempos remotos, com sua utilização contra parasitas remontando há 300 anos a.C. (KANG et al., 2008). As macroalgas também apresentam atividades antiviral, antibacteriana, anticoagulante, antitumoral, antioxidante e antiprotozoária (WANG; OOI; ANG, 2008; BARBOSA et al., 2004; VAIRAPPAN et al., 2008; MANIVANNAN et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2004; ROCHA et al., 2007; MAGALHAES et al., 2011; SILVA et al., 2005; SANTOS et al.,

2011) (**Quadro 2**), sendo estas atividades atribuídas principalmente a presença de terpenos e polissacarídeos complexos (TEIXEIRA; KELECOM, 1991). Embora poucas pesquisas tenham focado sua atenção sobre o efeito de extratos de macroalgas e/ou seus compostos isolados sobre protozoários parasitas, recentes estudos demonstraram resultados promissores sobre *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania mexicana* e *Plasmodium falciparum*, constituindo assim um campo vasto para prospecção de compostos bioativos contra estes parasitas (MOOPUC; ROBLEDO; FREILE-PELEGRIN, 2008; FREILE-PELEGRIN et al., 2008; ORHAN et al., 2006).

Quadro 2- Espécies estudadas no trabalho que possuem atividade biológica descrita na literatura.

Filo/ Espécies	Atividade Biológica
Phylum Ochrophyta	
<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	Leishmanicida
<i>Padina gymnospora</i>	Anticoagulante/ Anti-inflamatória
Phylum Rhodophyta	
<i>Digenia simplex</i>	Antitumoral
<i>Laurencia dendroidea</i>	Antifúngica/ Tripanocida/Leishmanicida
<i>Hypnea musciformis</i>	Antigenotóxica/ Anti-oxidativa
Phylum Chlorophyta	
<i>Chaetomorpha antennina</i>	Antimalárica
<i>Caulerpa racemosa</i>	Antibacteriana

Fonte: Aliança (2011)

Legenda: Ochrophyta = algas pardas; Rhodophyta = algas vermelhas; Chlorophyta = algas verdes.

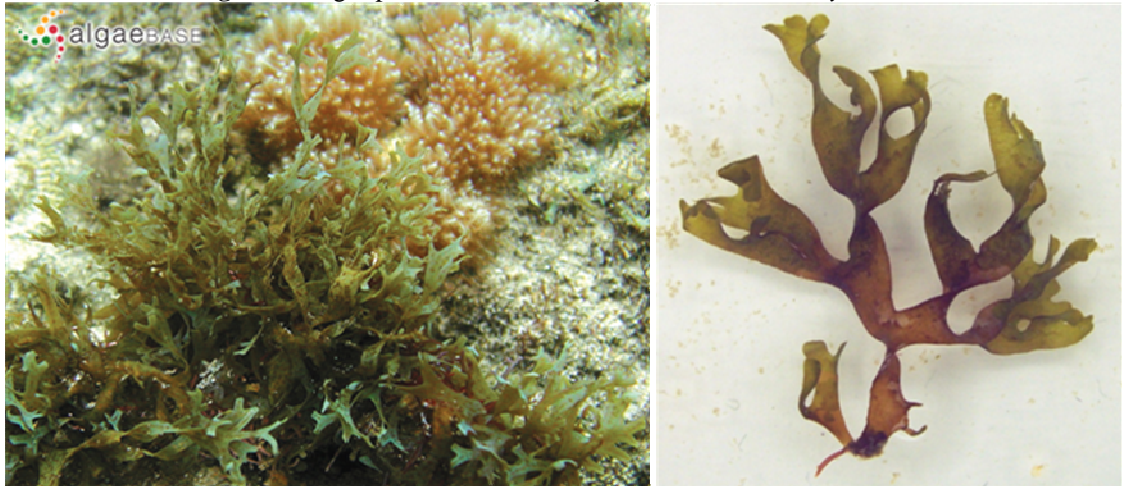
Os principais representantes de macroalgas pertencem às classes Phaeophyceae (algas pardas), Chlorophyceae (algas verdes), Rhodophyceae (algas vermelhas), e dentre as microalgas Dinophyceae (dinoflagelados), Bacillariophyceae (diatomáceas) e Cyanophyceae (algasverde-azuladas) (TEIXEIRA; KELECOM, 1991).

O termo “macroalgas marinhas” inclui as algas verdes, vermelhas e pardas macroscópicas e multicelulares. No entanto, todas são unicelulares em algum estágio do ciclo de vida (usualmente quando esporos ou zigotos) e são reconhecidas como organismos fotossintéticos primitivos devido a sua simples constituição, reprodução e fisiologia (PAUL; CRUZ-RIVERA; THACKER, 2001).

As macroalgas pertencentes à divisão Phaeophyta (**Figura 9**), são quase exclusivamente marinhas, vivendo fixadas em um substrato ou flutuando, formando imensas “florestas” algáceas submersas. As macroalgas pardas bentônicas representantes da divisão Phaeophyta se destacam pela produção de um perfil químico muito amplo e diferenciado, produzindo substâncias denominadas metabólitos secundários, pertencentes a várias classes

químicas (FAULKNER, 2002). Estes compostos naturais bioativos possuem uma variedade de funções ecológicas como, por exemplo, defesa contra herbívoros (PEREIRA; CAVALCANTI; TEIXEIRA, 2000) e micróbios patogênicos (ENGEL; JENSEN; FENICAL, 2002).

Figura 9- Algas pardas - *Canistrocarpus cervicornis* e *Dictyota mertensii*



Fonte: Oliveira; Österlund; Mtolera. (2005); STRI (2008)

Macroalgas marinhas vermelhas (Rhodophyceae) formam o grupo mais rico (**Figura 10**), dentre as algas, em diversidade e abundância de metabólitos secundários, compreendendo mais de 1.500 substâncias distintas (BLUNT et al., 2011). Uma gama de metabólitos secundários como compostos halogenados e sulfurados (KLADI et al., 2004; KARABAY-YAVASOGLU et al., 2007), hidrocarbonetos, alcoóis, fenóis, acetonas, ácidos, ésteres, terpenos e outros compostos (GRESSLER et al., 2011), são distribuídos entre as algas vermelhas.

Figura 10- Algas vermelhas - *Laurencia dendroidea* e *Hypnea musciformis*

Fonte: Nuestro Mar (2011); Marine life photography (2011).

As Chlorophytas ou “algas verdes” (**Figura 11**) caracterizam-se como o grupo mais complexo em termos de riqueza de espécies se assemelhando às plantas superiores por apresentarem clorofila b e em especial a, fundamentais para a fotossíntese. São conhecidas como produtoras de sesquiterpenos e diterpenos, em sua maioria, produzidos por espécies de Caulerpas (PEREIRA; DA GAMA, 2008). Outros poucos gêneros (com destaque para *Avrainvillea*, *Cymopolia* e *Neomeris*) também produzem metabólitos halogenados (BLUNT et al. 2011).

Figura 11- Algas verdes - *Caulerpa racemosa* e *Chaetomorpha antennina*

Fonte: Seres vivos do RN- Alga verde *Caulerpa racemosa* (2010); Marine life photography (2011).

As algas marinhas produzem uma variedade de compostos secundários ainda pouco explorados no que diz respeito ao seu potencial biomédico, embora sejam especialmente disponíveis. Estudos com as macroalgas marinhas tropicais têm demonstrado a sua extensa atividade biológica, incluindo antiprotozoária, mas ainda são incipientes no Nordeste brasileiro. Tendo em vista o manancial de compostos ainda poucos explorados e a

necessidade de prospecção de novas drogas menos tóxicas e com baixo custo associado para o tratamento das leishmanioses, em particular da LTA, no presente trabalho investigaremos o potencial leishmanicida e citotóxico de algas do litoral pernambucano.

2 JUSTIFICATIVA

As infecções humanas causadas por parasitas constituem um sério problema de saúde pública, principalmente nos países tropicais e subtropicais em desenvolvimento. As plantas oferecem uma diversidade química de princípios bioativos de valor incomparável, permitindo o desenvolvimento de uma grande variedade de fármacos. De fato, a maioria das drogas usadas no tratamento de infecções por parasitas são derivadas de produtos naturais. Os agentes antimaláricos e os anti-amébianos são bons exemplos disso. Com relação às doenças causadas por tripanosomatídeos vários compostos derivados de plantas com atividade leishmanicida e tripanocida têm sido descritos utilizando extratos totais ou compostos purificados. No entanto, o estudo do potencial dos organismos marinhos, em especial as macroalgas, como fornecedores de compostos bioativos com atividade anti-parasitária ainda é escasso no Brasil. Sabe-se que utilização de plantas medicinais é uma prática generalizada na medicina popular no tratamento de diversas doenças de etiologias diferentes, principalmente nos países onde a oferta de atendimento médico às populações ainda é precária. A importância da medicina popular é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde e pelo governo brasileiro o qual, por meio do decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, estabeleceu as diretrizes da política de plantas medicinais e fitoterápicos.

Por outro lado, considerando a importância da prospecção de compostos naturais bioativos que possam ser utilizados no tratamento dos diversos tipos de leishmanioses, pouco incentivo ainda é dado aos grupos que trabalham neste tema no Nordeste do Brasil. Paradoxalmente, os estados destas regiões são os que mais sofrem com estas endemias. Assim, o desenvolvimento do presente trabalho se justifica no contexto da linha “Desenvolvimento e validação de métodos diagnósticos e terapêuticos, aplicados à Saúde Pública” inserida dentro do programa de pós-graduação em Saúde Pública deste centro e tem como principal objetivo o desenvolvimento de quimioterápicos mais eficazes e com menos efeitos colaterais contra doenças negligenciadas como as Leishmanioses

3 PERGUNTA CONDUTORA

Quais os efeitos biológicos dos Extratos de Macroalgas sobre as formas evolutivas de *Leishmania amazonensis* e sobre células de mamíferos?

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito dos extratos de macroalgas (EM) do litoral de Pernambuco sobre *Leishmania amazonensis*.

4.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito dos EMs sobre o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis*, através da determinação da IC₅₀;
- b) Avaliar *in vitro* o índice e o percentual de infecção de amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados ou não com os extratos;
- c) Analisar a citotoxicidade dos EMs, através da técnica do MTT sobre as células de mamíferos (Macrófagos) e estimar o Índice de Seletividade dos EMs para formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*;
- d) Analisar o efeito dos extratos de macroalgas sobre a produção de óxido nítrico de macrófagos;
- e) Avaliar através da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão as alterações ultra-estruturais em *L. amazonensis* tratadas com os diferentes EMs;
- f) Analisar possíveis alterações na membrana plasmática e mitocôndria dos parasitas tratados com EM, por citometria de fluxo e microscopia confocal a laser.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Coleta das amostras

Os espécimes de macroalgas foram coletados através da técnica de mergulho livre a 1-2 m de profundidade ao longo do litoral sul pernambucano, Brasil (8°45' S; 35°05' W), nas seguintes regiões: Praia do Paraíso, Praia de Itapuama, Praia de Boa Viagem e Praia de Suape. O material coletado foi triado (separados de sedimentos, epífitas e outros organismos associados) e identificados no Departamento de Oceanografia da UFPE. Em seguida, o mesmo material foi seco ao ar livre (72 h), sempre protegido da ação do sol, de forma a minimizar a formação de artefatos. As exsiccatas dos espécimes coletados foram depositadas no herbário do Departamento de Biologia dessa Universidade (**Quadro 3**).

Quadro 3- Lista de espécies estudadas e os respectivos locais de coleta.

Espécies	Local de coleta
Phylum Ochrophyta	
<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	Praia do Paraíso (08°21' S; 34°57' W)
<i>Dictyota mertensii</i>	Praia de Itapuama (08°17' S; 34°57' W)
<i>Padina gymnospora</i>	Praia de Boa Viagem (08°07' S; 34°53' W)
<i>Sargassum vulgare</i> var. <i>nanun</i>	Praia do Paraíso (08°21' S; 34°57' W)
<i>Sargassum vulgare</i> var. <i>vulgari</i>	Praia do Paraíso (08°21' S; 34°57' W)
Phylum Rhodophyta	
<i>Digenia simplex</i>	Praia de Suape (08°22' S; 34°56' W)
<i>Laurencia dendroidea</i>	Praia de Suape (08°22' S; 34°56' W)
<i>Hypnea musciformis</i>	Praia do Paraíso (08°21' S; 34°57' W)
Phylum Chlorophyta	
<i>Chaetomorpha antennina</i>	Praia de Suape (08°22' S; 34°56' W)
<i>Caulerpa racemosa</i> var. <i>racemosa</i>	Praia de Suape (08°22' S; 34°56' W)

Fonte: Bianco (2010)

5.2 Obtenção e preparo dos EMs

Algas secas, livre de epibiontes (20 g) foram separadamente reduzidas a pó e submetidas à extração com uma mistura de Diclorometano (CH₂Cl₂, DCM) e Metanol (MeOH) na proporção de 2:1 DCM/MeOH. Os volumes dos extratos brutos obtidos foram reduzidos sob pressão em evaporador rotativo a 40 °C para evitar formação de artefatos e armazenados sob refrigeração para os posteriores bioensaios antiparasitários.

Figura 12: Evaporador rotativo

Fonte: Marca médica (2011)

Os extratos foram inicialmente diluídos em DMSO a uma concentração de 50mg/ml. Esta solução foi dissolvida em meio de cultura para obter uma solução a 1mg/ml e uma concentração de DMSO não tóxica de 0,02%. Ambas as soluções foram guardadas a -20°C, protegidas da luz. A solução estoque foi diluída em diferentes concentrações para os experimentos.

5.3 Cultivo dos parasitas

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (Cepa LTB 0016) foram mantidas a 26° C em meio de Schneider (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino, com repiques a cada três dias. Parasitas na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos. Formas amastigotas foram obtidas a partir da inoculação de formas promastigotas infectivas em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e utilizadas nos ensaios de atividade biológica dos extratos conforme descrito abaixo.

5.4 Atividade biológica dos EMs em *Leishmania amazonensis*

Visando um “screening” inicial dos extratos com atividade leishmanicida, formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram coletadas, contadas e diluídas em meio de Schneider (Sigma) suplementado com 10% de SFB a uma concentração de 1×10^6 células /mL. Após a diluição, as células foram incubadas na presença de diferentes concentrações (15,63; 31,25; 62,5; 125 e 250 µg/mL) dos extratos, por 72 horas. Células incubadas apenas com o

meio de Schneider foram utilizadas como controle. O crescimento da cultura foi acompanhado através de contagens diárias em câmara de Neubauer. A IC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitas) foi determinada após 72 horas de cultivo por análise de regressão linear. Cada teste foi feito em 2 experimentos independentes em triplicata.

Os extratos mais promissores foram selecionados para avaliar a atividade sobre as formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Para tal, camundongos BALB/c foram eutanasiados por asfixia em câmara de CO_2 , o peritônio dos mesmos foi exposto com auxílio de tesoura e pinça cirúrgica. Em seguida, 10 mL de meio RPMI foram inoculados na cavidade peritoneal do animal. Para liberar os macrófagos aderidos à parte interna do peritônio, este foi levemente massageado e o fluido peritoneal foi aspirado com seringa e agulha e transferido para um recipiente de vidro estéril e acondicionado a 4°C. Ao final da coleta, o *pool* de células foi contado em câmara de Neubauer e semeado em placas de cultivo de 24 poços, a uma concentração de 3×10^5 células/mL, contendo uma lamínula de vidro, e mantidas a 37°C numa atmosfera de 5% de CO_2 . Após um dia de cultivo, as culturas foram lavadas com meio RPMI (Sigma) e infectadas, por três horas com formas promastigotas, na proporção de 10:1 promastigotas/macrófago. Em seguida, os parasitas não internalizados foram retirados por lavagem em meio RPMI e incubadas em meio fresco na presença ou ausência de diferentes concentrações dos extratos. Após 18 horas de tratamento as lamínulas foram retiradas e coradas com panótico rápido. A IC_{50} (concentração que inibe em 50% a infecção dos macrófagos) foi determinada através da contagem direta das células infectadas e das amastigotas intracelulares em microscópio óptico convencional. O índice de sobrevivência (SI) foi obtido multiplicando a porcentagem de células infectadas pelo número de amastigotas/macrófago.

Todos os procedimentos envolvendo animais experimentais foram realizados de acordo com protocolos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA- FIOCRUZ) sob o número L-001/08.

5.5 Análise da citotoxicidade dos extratos de macroalgas em células de mamífero

O teste do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formam-se, intracelularmente, cristais azuis que são solubilizados e

posteriormente analisados por espectrofotometria UV/visível. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico.

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (coletados com descrito anteriormente) foram semeados em placas de 96 poços na concentração de 6×10^5 células/poço e incubados em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas, o meio foi removido e as células foram incubadas na presença de várias concentrações dos EMs (15,63 - 250 µg/mL) por 48 h. Após este período, o meio foi novamente retirado e adicionado a mesma quantidade de meio RPMI sem vermelho de fenol mais 10 µL de MTT, a uma concentração de 5mg/mL diluído em PBS, as células foram incubadas por mais 3 horas nas mesmas condições de cultivo. Após incubação, o MTT foi retirado cuidadosamente e adicionado 100 µL de DMSO por poço para a solubilização dos cristais derivados da redução do MTT, seguido de agitação da placa durante 15 minutos. A leitura da absorbância dos cristais de formazan solubilizados foi realizada utilizando o leitor de ELISA Benchmark Plus (Bio-Rad) com comprimento de onda de 595nm. A porcentagem de células viáveis em relação às células controles foi estimada. A concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% (CC₅₀) das células foi determinada por análise de regressão logarítmica dos dados obtidos pelo software SPSS 8.0 para Windows. O índice de seletividade (IS) foi determinado como a razão entre os valores de CC₅₀ e IC₅₀ para cada extrato. Cada experimento foi realizado em dois experimentos distintos em quadruplicata.

5.6 Produção de óxido nítrico

A fim de analisarmos o efeito dos diferentes EMs na produção de óxido nítrico por macrófagos, o sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais controles (não tratados) e tratados com diferentes concentrações dos EMs foram testados através do método reagente de Griess. Através da reação de Griess, o nitrito presente na amostra reage em meio ácido com uma amina aromática (sulfanilamida), produzindo um sal diazônico. Este reagirá com a *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamina dihydrochlorreto formando um complexo de coloração rósea.

100 µL do sobrenadante da cultura de macrófagos tratados ou não com os extratos, por 48 horas, foram incubados com 100 µL do reagente Griess (1% sulfanilamida e 0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamina dihydrochlorreto/2.5% H₃PO₄) à temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida com um filtro de 540 nm no leitor de ELISA Benchmark Plus. A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio. Macrófagos não tratados foram utilizados como controle.

5.7 Análise ultraestrutural

Formas promastigotas *L. amazonensis* controles e tratadas com concentrações da IC₅₀ e 2x IC₅₀ dos EMs por 72h, foram lavadas e fixadas por 60 min. em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) e pós-fixada por uma hora em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄), 0,8% ferricianeto de potássio, 5 mM CaCl₂ em tampão cacodilato 0,1M. Após esta etapa, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, infiltradas e incluídas em epon (Fluka Analytical). Cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm de espessura, obtidos em ultramicrotomo (Leica EMUC6), foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados através do microscópio de transmissão Zeiss EM109B. Para a microscopia eletrônica de varredura, promastigotas tratadas e controles foram fixadas como descrito acima e colocadas para aderir em lamínulas previamente revestidas com poly-lysina. Após 20 min. as lamínulas foram lavadas com PBS para retirada das células não aderidas e pós-fixadas como descrito para microscopia de transmissão. Em seguida as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, desidratadas em séries crescentes de etanol e submetidas à secagem através do ponto crítico no Critical Point dryer HCP-2 (Hitachi), metalizadas com 20 nm de ouro no metalizador JFC-1100 (Jeol) e visualizadas através do microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200.

5.8 Análises por citometria de fluxo e microscopia confocal

Para análise do possível efeito dos extratos sobre a membrana plasmática e a mitocôndria dos protozoários foram utilizados os seguintes marcadores: (a) iodeto de propídio, para monitorar possível permeabilização de membrana plasmática e (b) rodamina 123, para análise do potencial de membrana mitocondrial. Formas promastigotas de *L. amazonensis* (1 x 10⁶ células/ mL) foram tratadas com a IC₅₀ e 2x IC₅₀ por 72 horas. Após o tratamento os parasitas tratados e controles foram incubados com 30µg/mL iodeto de propídio ou 10 µg/mL rodamina 123 por 15min. Como controles para o iodeto, nós tratamos as células com etanol P.A e com metanol P.A para a rodamina por 15min. Células não tratadas também foram avaliadas. Ao final do tempo de incubação com os marcadores, as amostras foram colocadas em tubos apropriados para as análises no citômetro. A obtenção e análise dos resultados foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA) , equipado com o software Cell Quest, utilizando o canal FL2-H para o iodeto e

para a rodamina o canal FL1-H. Análises posteriores foram realizadas também no software WinMDI2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Diego, EUA). Foram analisados 10.000 eventos por amostra. Os resultados da marcação com iodeto de propídio foram expressos como porcentagem de células marcadas em cada situação testada. Alterações na polarização da membrana mitocôndria foram medidas através do índice de variação (IV) obtido pela equação $(MT-MC) / MC$, onde MC é a mediana de intensidade de fluorescência do controle e MT a mediana de fluorescência das células tratadas. Valores negativos de IV correspondem à despolarização da membrana mitocondrial (FONSECA-SILVA et al., 2011). Amostras obtidas como descrito acima foram também analisadas por microscopia confocal a laser (Leica SP2 AOBS). Ao final do tempo de incubação, as amostras foram colocadas em micro-placas (Mattek Co., USA) no momento da visualização das células ao microscópio. As imagens foram adquiridas usando os lasers 488 nm (iodeto de propídio) e 543 nm (rodamina 123).

5.9 Análise estatística

As análises de regresso linear foram feitas no programa SPSS 8.(IBM Co., Nova Iorque, EUA) para Windows e as análises de significância, considerando significativo valores $p < 0.05$, foram realizadas através do teste ANOVA utilizando o programa GraphPad Prism 5.(GraphPad, Califrnia, EUA) para Windows.

6 RESULTADOS

6.1 Coleta das amostras e obtenção dos extratos

A coleta das algas foi realizada ao longo do litoral sul pernambucano. A obtenção dos extratos foi realizada pelo departamento de química fundamental, pelo grupo de pesquisas do prof. Dr. Everson Bianco. A tabela 2 mostra os rendimentos dos extratos obtidos a partir de uma massa seca de 20 g. *Dictyota mertensii* foi a que apresentou maior rendimento entre todos os extratos com 3,09 g de extrato, ou 15% da massa seca da alga. Por outro lado, *Hypnea musciformis* foi a que apresentou menor rendimento com 0,24g.

Tabela 2- Rendimentos dos extratos brutos obtidos a partir de 20g uma massa seca das algas.

Espécies	Massa extrato (g)
<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	1,33
<i>Dictyota mertensii</i>	3,09
<i>Padina gymnospora</i>	1,99
<i>Sargassum vulgare</i> var. <i>nanun</i>	1,13
<i>Sargassum vulgare</i> var. <i>vulgari</i>	1,16
<i>Digenia simplex</i>	0,89
<i>Laurencia dendroidea</i>	1,81
<i>Hypnea musciformis</i>	0,24
<i>Chaetomorpha antennina</i>	0,71
<i>Caulerpa racemosa</i> var. <i>racemosa</i>	2,13

Fonte: Bianco (2010)

6.2 Atividade biológica e análise de citotoxicidade dos EMs

Com o objetivo de identificarmos os extratos das algas mais promissoras contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, inicialmente foi realizado um *screening* com os dez extratos de macroalgas, sendo cinco desses extratos pertencentes às algas pardas, três as vermelhas e dois as algas verdes.

Nossos dados mostram que todos os extratos inibiram o crescimento de formas promastigotas com valores de IC₅₀ variando entre 51 – 160 µg/mL. Os extratos que apresentaram melhor atividade, i.e, uma IC₅₀ mais baixa, foram *C. cervicornis* (49,45 ± 13,1 µg/mL), *D. mertensii* (71,60 ± 9,29 µg/mL) e *L. dendroidea* (51,35 ± 4,0 µg/mL), enquanto as

menos efetivas foram a *D. simplex*, *H. musciformis*, *C. antennina* com IC₅₀ de aproximadamente 156,39; 159,61 e 159,49 µg/mL, respectivamente. *P. gymnospora*, *S. vulgare nanun*, *S. vulgare vulgari* e *Caulerpa racemosa* apresentaram atividade intermediária com valores de IC₅₀ variando de 110-147 µg/mL (**Tabela 3**).

Tabela 3- Efeito dos extratos sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* e sobre macrófagos.

Espécies	µg/mL		ISe _{PRO}
	IC ₅₀	CC ₅₀	
<i>C. cervicornis</i>	49,45 ± 13,1	276,82 ± 30,58	5,59
<i>D. mertensii</i>	71,60 ± 9,29	233,10 ± 25,5	3,25
<i>P. gymnospora</i>	127,30 ± 1,4	242,40 ± 19,0	1,90
<i>S. vulgare nanun</i>	147,00 ± 23,9	189,99 ± 19,42	1,29
<i>S. vulgare vulgari</i>	110,30 ± 21,0	267,12 ± 9,63	2,42
<i>D. simplex</i>	156,39 ± 28,5	510,64 ± 14,48	3,26
<i>L. dendroidea</i>	51,35 ± 4,0	318,22 ± 17,5	6,19
<i>H. musciformis</i>	159,61 ± 13,80	307,40 ± 19,98	1,92
<i>C. antennina</i>	159,49 ± 35,41	199,22 ± 21,94	1,24
<i>C. racemosa</i>	118,0 ± 24,3	286,85 ± 19,74	2,43

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: IC₅₀– Concentração que inibe em 50% do crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*

CC₅₀ – Concentração capaz de causar efeitos citotóxicos em 50% dos macrófagos

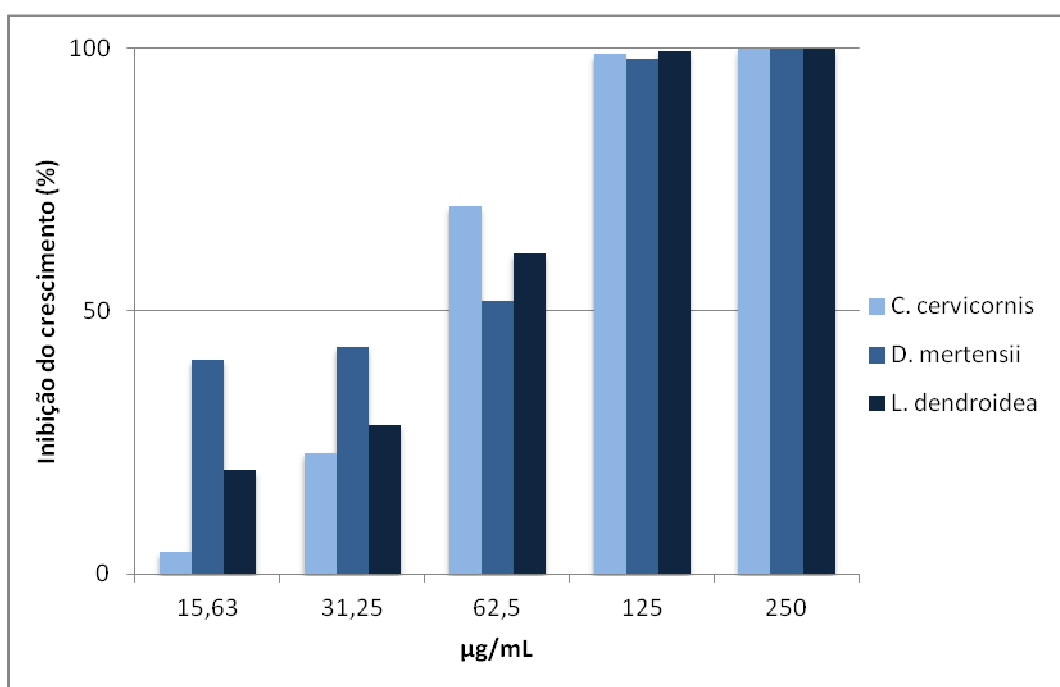
ISe_{PRO} (Índice de Seletividade) = CC₅₀ Macrófagos/ IC₅₀ Promastigotas

Um importante critério na prospecção de novos compostos com ação leishmanicida é que eles não sejam tóxicos às células de mamíferos e, portanto não só o efeito dos extratos sobre o crescimento foi considerado como também foi avaliado o potencial citotóxico destes extratos sobre células de mamífero através do método do MTT. Todos os extratos apresentaram baixa citotoxicidade para células de mamífero com valores de CC₅₀ variando entre 189,99 a 510,64 µg/ml (**Tabela 3**). Os valores das CC₅₀ dos macrófagos peritoneais foram comparados com os valores de IC₅₀ para formas promastigotas, permitindo a determinação do índice de seletividade (ISe), que informa quanto o extrato é seletivo para o parasita em relação às células de mamífero. A análise de ISe demonstrou que todos os extratos foram mais seletivos para o parasita do que para as células de mamífero. Curiosamente, os extratos de *C. cervicornis* (CC), *D. mertensii* (DM) e *L. dendroidea* (LD) os quais tiveram os menores valores de IC₅₀ para formas promastigotas foram também os mais

seletivos para estas formas do que para as células de mamífero com IS correspondentes a 5,59; 3,25 e 6,19, respectivamente (**Tabela 3**).

O efeito dos extratos de CC, DM e LD sobre o crescimento de formas promastigotas pode ser melhor evidenciado no gráfico 2. Nossos resultados demonstraram uma ação dose-dependente com uma inibição próxima ou igual a 100% nas concentrações de 125 e 250 $\mu\text{g/ml}$ para estes três extratos. Na concentração de 62,5 $\mu\text{g/ml}$ todos os extratos foram capazes de atingir 50% de inibição do crescimento como demonstrado através das IC_{50} obtidas através de análise de regressão para estes extratos.

Gráfico 2- Inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*



Fonte: Elaborado pela autora

Tendo em vista, que os extratos de CC, DM e LD foram os que apresentaram os valores mais baixos de IC_{50} ($< 100 \mu\text{g/mL}$) para formas promastigotas e os índices de seletividade (ISe) superiores a três, estes extratos foram selecionados para os testes biológicos com as formas intracelulares amastigota, as quais são as mais relevantes para a patologia das leishmanioses. Inicialmente foi determinada a concentração capaz de inibir em 50% a infecção de macrófagos. Nossos dados mostraram que todos os extratos foram mais efetivos contra as formas amastigotas do que para formas promastigotas com IC_{50} , após 18 horas de tratamento com os extratos, de aproximadamente 37,4; 35,8 e 34,5 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos de CC, DM e LD respectivamente. Embora os extratos tenham apresentado atividade similar

contra formas amastigotas, estes variaram consideravelmente com relação aos índices de seletividade com valores entre 6.5 a 9.2 (**Tabela 4**).

Tabela 4- Efeitos dos extratos de CC, DM e LD sobre formas amastigotas de *L. amazonensis*.

Filo/ Espécies	IC ₅₀ AMA	CC ₅₀	ISe _{AMA}
<i>C. cervicornis</i>	37,4 ± 6,7	276,82 ± 30,58	7,40
<i>Dictyota mertensii</i>	35,8 ± 3,7	233,10 ± 25,5	6,50
<i>L. dendroidea</i>	34,5 ± 7,3	318,22 ± 17,5	9,22

Fonte: Elaborado pela autora

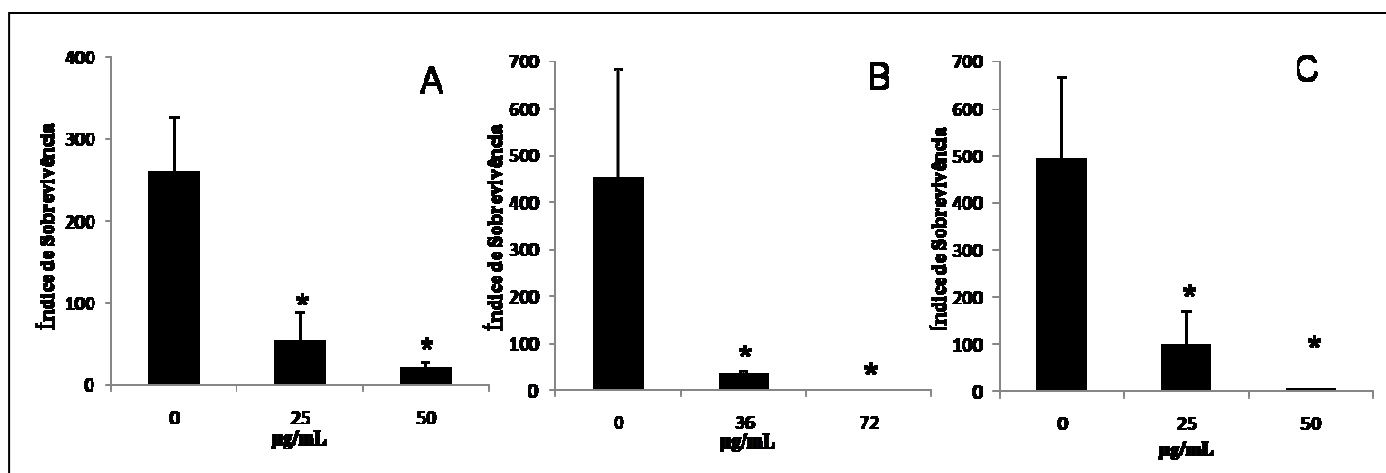
Legenda: IC₅₀ AMA – Concentração que inibe em 50% a infecção dos macrófagos por amastigotas de *L. amazonensis*

CC₅₀ – Concentração capaz de causar efeitos citotóxicos em 50% dos macrófagos

ISe_{AMA} – Índice de seletividade = CC₅₀/IC₅₀

Para ambas as concentrações dos extratos testadas, as quais correspondem aproximadamente aos valores de 1/2 da IC₅₀ e a IC₅₀ de promastigotas, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do índice de sobrevivência (ISO) dos parasitas no interior do macrófago quando comparados com os as células não tratadas (**Gráfico 3**).

Gráfico 3- Índice de sobrevivência das amastigotas no interior dos macrófagos após tratamento com os extratos por 18 horas.



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: A- *Canistrocarpus cervicornis*, B- *Dictyota mertensii* e C- *Laurencia dendroidea*

Nota: Os asterísticos correspondem a valores significativos ($p < 0,05$)

6.3 Produção de óxido nítrico

Com objetivo de verificarmos se os extratos CC, DM e LD podem induzir um aumento na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos foi utilizado o reagente de Griess. Todos os extratos foram capazes de aumentar a produção de NO sendo estas diferenças

consideradas significativas em relação ao controle ($p < 0,05$) nas concentrações de 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$ dos extratos de CC e DM e apenas na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de LD. Nas células tratadas com concentrações inferiores a 125 $\mu\text{g/mL}$ não houve produção significativa de NO em relação às células controles (**Tabela 5**).

Tabela 5- Efeito dos extratos CC, DM e LD na produção de Óxido Nítrico (μM) por macrófagos

Espécies	$\mu\text{g/mL}$					
	0	250	125	62,5	31,2	15,1
<i>C. cervicornis</i>	3,50 \pm 0,00	4,00 \pm 0,16*	4,07 \pm 0,49*	3,66 \pm 0,03	3,60 \pm 0,03	3,53 \pm 0,02
<i>D. mertensii</i>	3,83 \pm 0,48	5,04 \pm 0,53*	4,34 \pm 0,39*	4,17 \pm 0,28	3,89 \pm 0,28	3,81 \pm 0,44
<i>L. dendroidea</i>	3,95 \pm 0,63	4,60 \pm 0,62*	4,25 \pm 0,47	4,06 \pm 0,52	4,12 \pm 0,45	4,02 \pm 0,35

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Os asterísticos correspondem a diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$), ANOVA teste de Dunnett.

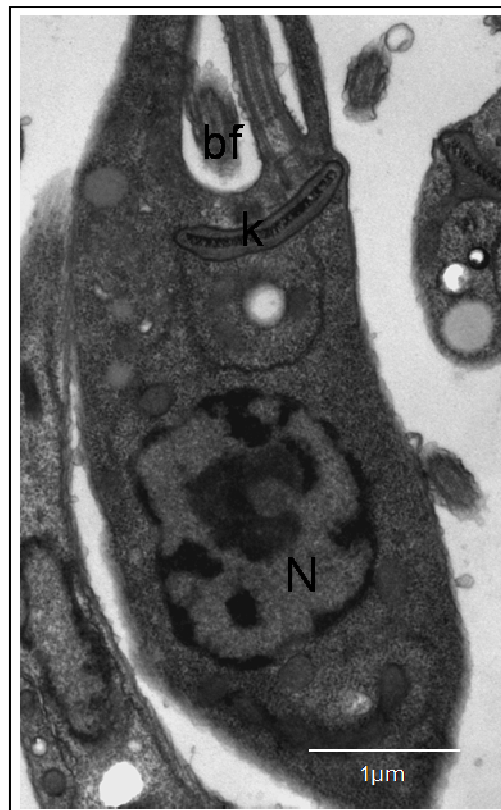
6.4 Análise ultraestrutural

Com o objetivo de verificar possíveis alvos intracelulares de ação dos extratos, formas promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas em presença dos extratos nas concentrações correspondentes a 1 e 2x IC_{50} /72 horas e então processadas como de rotina para microscopia eletrônica de transmissão. A figura 13 mostra a fotomicrografia de uma forma promastigota controle apresentando morfologia alongada, citoplasma homogêneo. O núcleo apresenta morfologia bem preservada, com nucléolo evidente e cromatina localizada na periferia do núcleo. Perfis da mitocôndria e do retículo endoplasmático também podem ser observados. O cinetoplasto, região da mitocôndria onde se concentra o DNA mitocondrial é encontrado na base da bolsa flagelar onde o flagelo emerge.

Células tratadas com os diferentes extratos apresentaram alterações drásticas na sua morfologia, com os efeitos tendendo a serem mais severos nas concentrações correspondentes a 2 x IC_{50} . Células tratadas com o extrato de CC (**Figura 14 A-14 B**) apresentaram alterações significativas na mitocôndria (**Figura 14 A**), intensa desorganização celular com deslocamento do núcleo para a periferia da célula e aparecimento de grandes espaços eletróluscentes no citoplasma (**Figura 14 B**). Promastigotas tratadas com o extrato DM (**Figura 14 C-14 D**) e LD (**Figura 14 E-14 F**) apresentaram alterações semelhantes às encontradas em células tratadas com CC, tais como: condensação da cromatina (**Figura 14 C-**

14 D), aparecimento de células com o citoplasma esvaziado e organelas rompidas (**Figura 14 D-14 E**) e inchaço da mitocôndria e do cinetoplasto com aparecimento de perfis membranares no interior da matriz mitocondrial (**Figura 14 F**). A presença de células com alterações na permeabilidade também pôde ser observada nas células tratadas com LD (**Figura 13 E**). Todas estas alterações são compatíveis com a perda da viabilidade e morte celular do parasita.

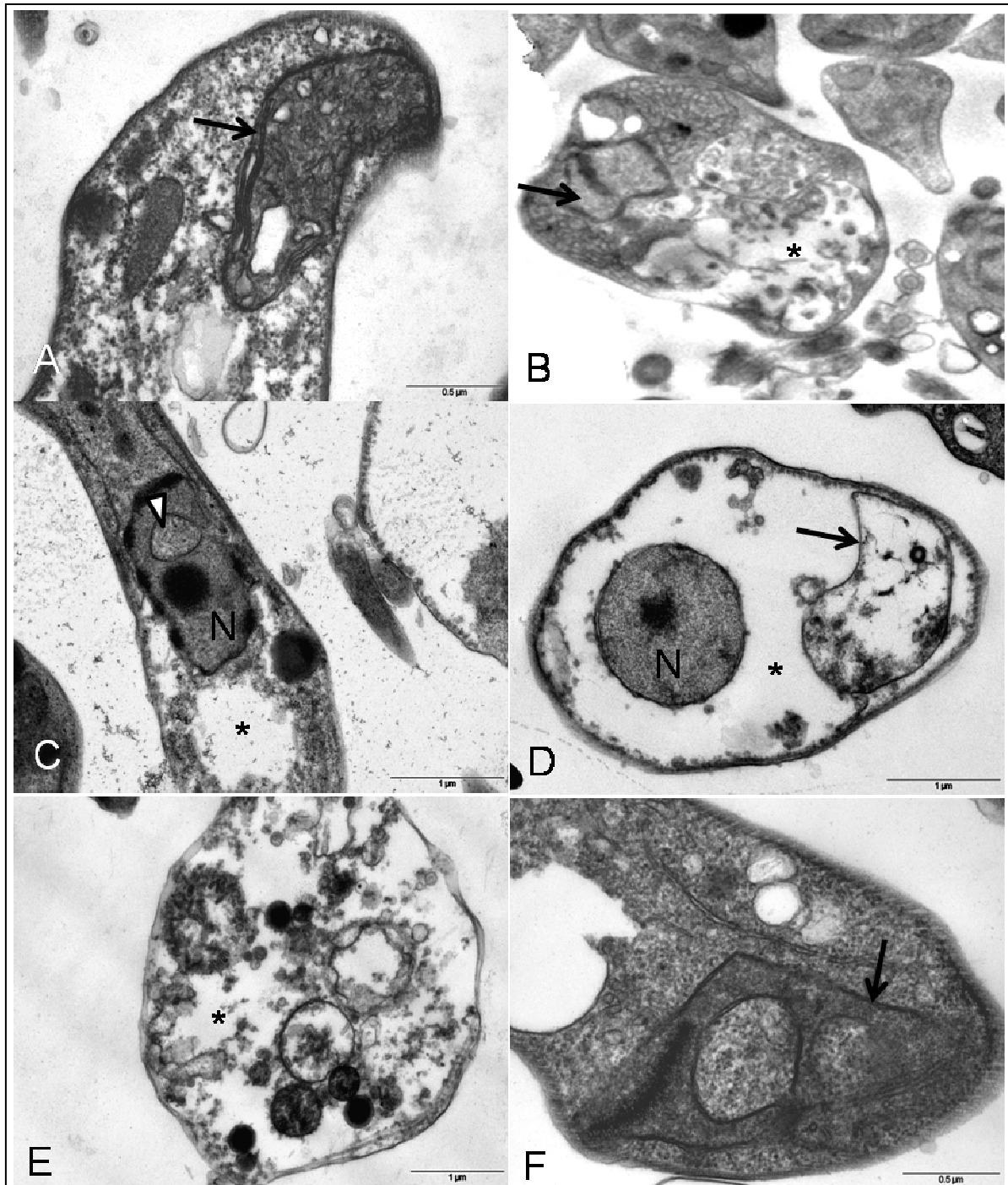
Figura 13- Ultraestrutura da forma promastigota



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Núcleo (N), cinetoplasto (K) e mitocôndria bem preservados.

Nota: Forma promastigota controle mostrando corpo alongado e citoplasma homogêneo.

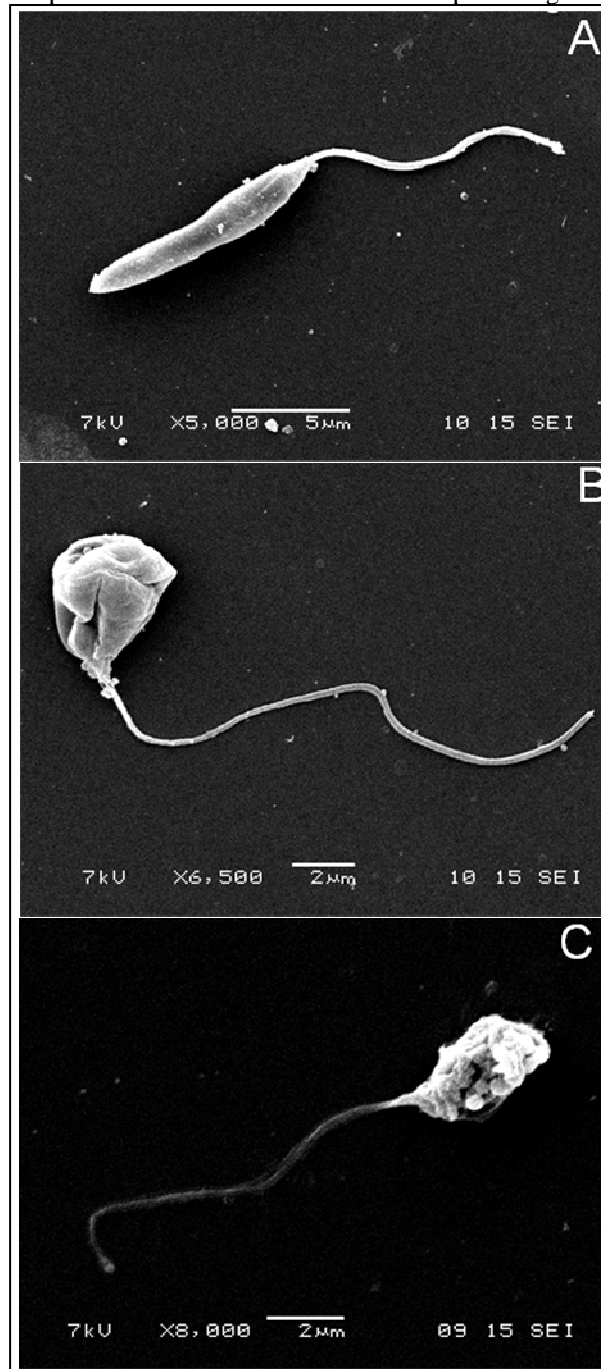
Figura 14- Efeito dos extratos de CC, DM e LD sobre a ultraestrutura de *L. amazonensis*.

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: A- célula tratada com a IC₅₀ do extrato de CC mostrando em detalhe o inchaço e com desestruturação das cristas mitocondriais. B- célula tratada com 2x a IC₅₀ de CC mostrando completa desorganização interna com deslocamento de núcleo para periferia celular e aparecimento de espaços eletrólucos no citoplasma (seta). C- célula tratada com a IC₅₀ de DM mostrando núcleo com cromatina condensada e a presença de vesículas no nucleoplasma (cabeça de seta). Note a presença de grande espaço eletrólucos no citoplasma da célula (asterisco). D- Célula drasticamente afetada pelo tratamento com extrato de DM na concentração 2x a IC₅₀, onde apenas resquícios do núcleo (N) e do cinetoplasto (seta) podem ser observados. E- Detalhe de uma promastigota tratada com a IC₅₀ do extrato de LD, onde a perda de material citoplasmático já é evidente (asterisco). F- Célula tratada 2x a IC₅₀ de LD, mostrando um detalhe de uma mitocôndria (seta) com volume aumentado apresentando vesículas com material granular no seu interior.

A análise através da microscopia eletrônica de varredura de células tratadas com 2 x IC₅₀ dos extratos de DM e LD mostram perda da forma alongada e alterações drásticas na membrana dos parasitas (**Figura 15 B- 15 C**) em relação ao controle (**Figura 15 A**) com enrugamento do corpo celular do parasita e sinais claros de perda da integridade da membrana com exposição do material citoplasmático (**Figura 15 C**).

Figura 15- Microscopia eletrônica de varredura de formas promastigotas de *L. amazonensis*



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: A- Controle; B- Parasita tratado com 2x a IC₅₀ do extrato *D. mertensii*; C- Parasita tratado com 2x a IC₅₀ do extrato *L. dendroidea*.

6.5 Análises por citometria de fluxo

Tendo em vista que tanto a integridade da membrana quanto as mitocôndrias parecem estar comprometidas pelo tratamento com os diferentes extratos, nós posteriormente analisamos estes parâmetros através do uso do iodeto de propídio (IP), o qual é um corante impermeável às células cujas membranas estejam intactas, e a rodamina 123 (Rho), a qual marca a mitocôndria em células viáveis, para quantificar esses efeitos após o tratamento com os extratos de DM e LD. Para tal, formas promastigotas foram tratadas com a IC_{50} e $2x$ a IC_{50} dos extratos e incubadas com o iodeto de propídio ou rodamina 123. A análise das células tratadas e marcadas com iodeto de propídio por citometria de fluxo permitiu quantificar a porcentagem de células marcadas com IP (IP+) na população. Como era de se esperar células controles apresentavam uma baixa proporção (4,11%) de células IP+ em relação às células tratadas com etanol (91,40%), o qual foi utilizado como controle, por causar permeabilização das membranas. Nas células tratadas com a IC_{50} dos extratos foi notado um discreto aumento na proporção de células marcadas com 5,91 e 4,34 % das células apresentando-se positivas para o iodeto de propídio em células tratadas com os extratos de DM e LD respectivamente. O tratamento das células na concentração correspondente a $2x$ IC_{50} destes extratos mostrou um aumento na proporção de células marcadas com 14,83% das células tratadas com extrato de DM e 18,23 % das células tratadas com LD apresentando-se positivas para o marcador. No entanto, para ambas as espécies a proporção de células IP+ não ultrapassa os 20% do total de células. (**Tabela 6**). As diferenças no padrão de marcação com IP também podem ser visualizadas através dos histogramas, onde M1 corresponde às células não marcadas e M2 as células marcadas com IP (**Gráfico 4**).

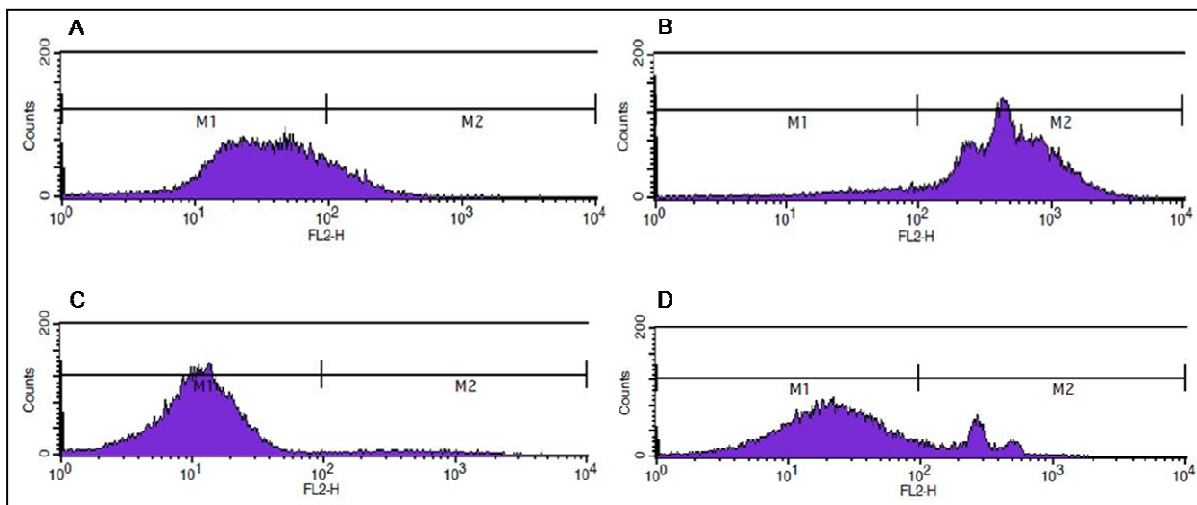
Tabela 6- Porcentagem de promastigotas marcadas com Iodeto de propídio

Tratamento	IP+ (%)
Etanol	91,40
Controle	4,11
DM 1x IC_{50}	5,91
DM 2x IC_{50}	14,83
LD 1x IC_{50}	4,34
LD 2x IC_{50}	18,23

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: PI+ - Porcentagem de células positivas para iodeto de propídio

Gráfico 4- Histogramas representativos do efeito do tratamento de promastigotas com os extratos de macroalgas sobre a permeabilidade da membrana.



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: A- Controle negativo, B- Formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com etanol por 15 minutos, C- Tratamento com 2x a IC_{50} de *D. mertensii* e D- Tratamento com 2x a IC_{50} de *L. dendroidea*.

Para verificarmos possíveis alterações na polarização da membrana mitocondrial das formas promastigotas tratadas com os extratos de DM e LD nós utilizamos o índice de variação (IV) conforme descrito anteriormente na sessão de materiais e métodos. Valores de IV negativo representam diminuição do potencial de membrana, enquanto IV positivos podem indicar uma hiperpolarização desta organela. Tanto o extrato de DM quanto o extrato de LD causaram alterações drásticas na mitocôndria. Células tratadas com extrato de DM mostraram um valor de -0,95 (1x IC_{50}) e -0,97 (2x IC_{50}). Já, o tratamento com LD causou uma hiperpolarização considerável da membrana evidenciada pelo valor de IV positivo (+0,53) e pelo aumento na intensidade de fluorescência para rodamina 123. No entanto, o tratamento com 2x IC_{50} deste mesmo extrato reverte o potencial da membrana causando uma despolarização considerável da membrana mitocondrial com um IV de -0,82 (**Tabela 7, gráfico 5**).

Tabela 7- Efeito dos extratos de DM e LD sobre o potencial de membrana mitocondrial.

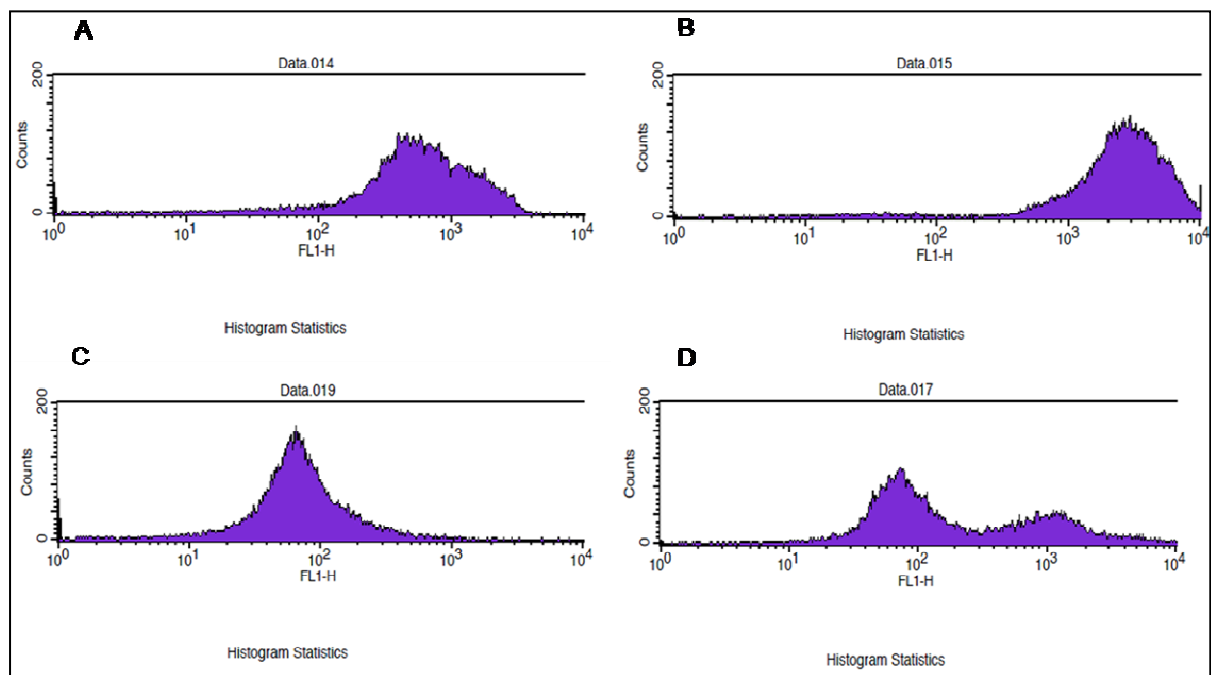
Tratamento	Rho 123**	IV
Controle	3000,70	0
Metanol	755,27	- 0,74
DM 1x IC ₅₀	140,58	- 0,95
DM 2x IC ₅₀	90,45	- 0,97
LD 1x IC ₅₀	4604,54	+ 0,53
LD 2x IC ₅₀	522,20	- 0,82

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: IV- Índice de variação calculado pela fórmula $MT-MC/MC$, onde MT é a intensidade média de fluorescência das células tratadas; MC é a média de fluorescência das células não tratadas.

Nota: ** Mediana da intensidade de fluorescência para rodamina 123.

Gráfico 5- Histograma representativo do efeito dos extratos de DM e LD sobre a polarização da membrana mitocondrial



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: A- Formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com metanol por 15 minutos, B- Controle, C- Tratamento com 2x a IC₅₀ do extrato de *D. mertensii* e D- Tratamento com 2x a IC₅₀ do extrato de *L. dendroidea*

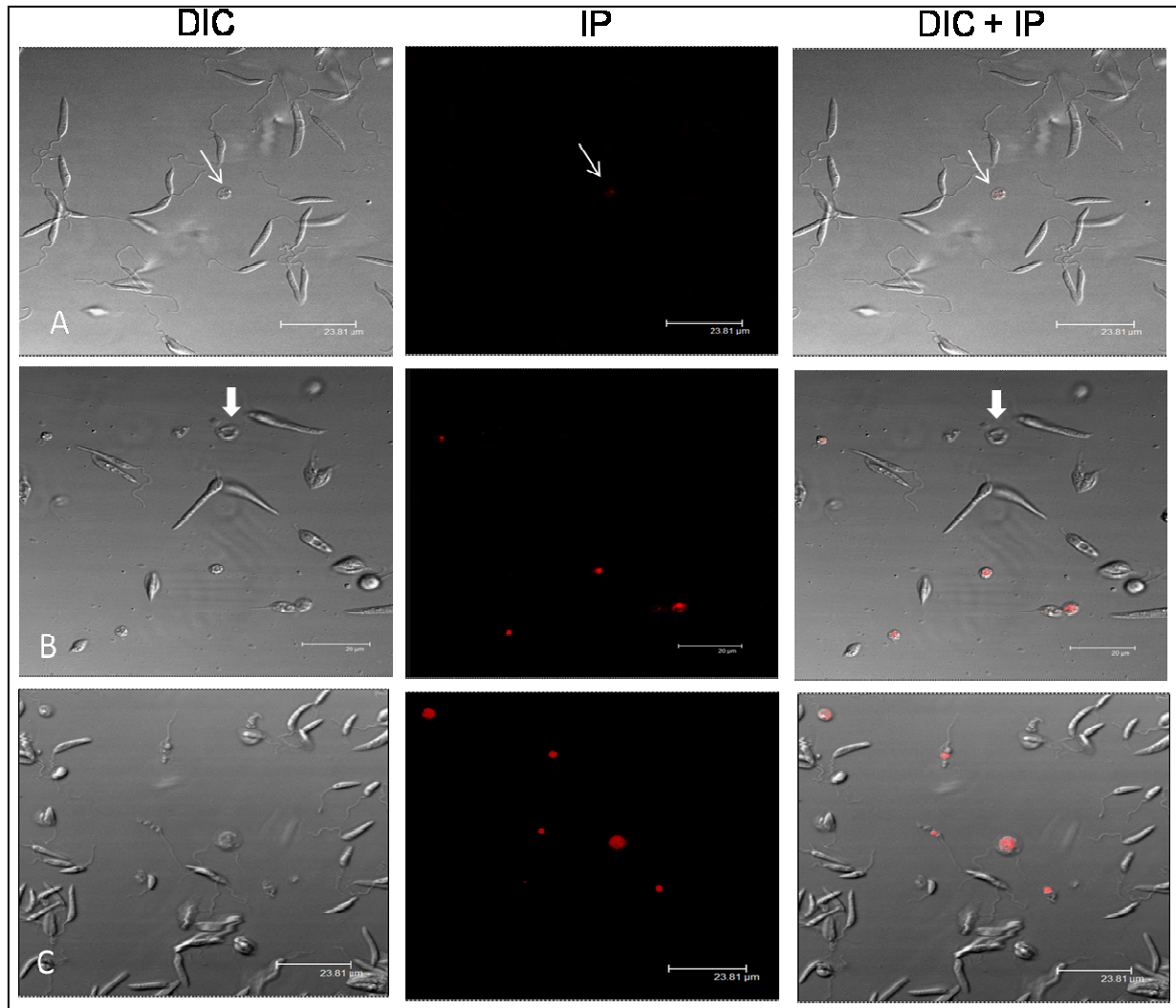
6.6 Análises por microscopia confocal

As análises através da microscopia confocal a laser das amostras tratadas e controles incubadas com IP e Rho 123 corroboram os dados obtidos pela citometria de fluxo bem como permite acompanhar com maior detalhe e em tempo real as alterações morfológicas e fisiológicas ocorridas durante o tratamento.

Nas células controles podemos observar através do contraste interferencial (DIC-Differential Interference Contrast) sua morfologia alongada. As poucas células marcadas com IP quando presentes no controle apresentavam morfologia arredondada e aumento de volume (**Figura 16A**). Um leve aumento no número de células marcadas com IP pode ser observado em células apresentando arredondamento do corpo celular e aumento de volume tanto em células tratadas com DM (**Figura 16 B**) quanto nas tratadas com LD (**Figura 16 C**). É importante ressaltar que algumas células com a morfologia drasticamente alterada apresentavam-se negativas para o IP (**Figura 16 B**), ou seja, conservaram a membrana plasmática íntegra.

A integridade da membrana mitocondrial das formas promastigotas tratadas com os extratos de DM e LD e os controles foi avaliada pela incorporação da sonda fluorescente rodamina 123 em mitocôndrias viáveis (**Figura 17**). A maioria das células controles apresentou marcação positiva para rodamina (**Figura 17 A**). Células tratadas com metanol, por sua vez, apresentaram apenas uma fraca marcação residual (**Figura 17 B**). Uma drástica alteração do padrão de marcação pode ser observada nas células tratadas com 2 xIC₅₀ de DM e LD (**Figura 17 C- 17 D**) com diminuição não só do número de células marcadas como também da intensidade de fluorescência nas células que ainda apresentavam marcação (**Figura 17 C- 17 D**). Nas células tratadas com os extratos e marcadas com IP ou rodamina, foi observado drásticas alterações morfológicas, com aparecimento de uma população de células pequenas e outra apresentando aumento de volume, ambas populações apresentando pouca ou nenhuma marcação para rodamina (**Figura 17 C- 17 D**).

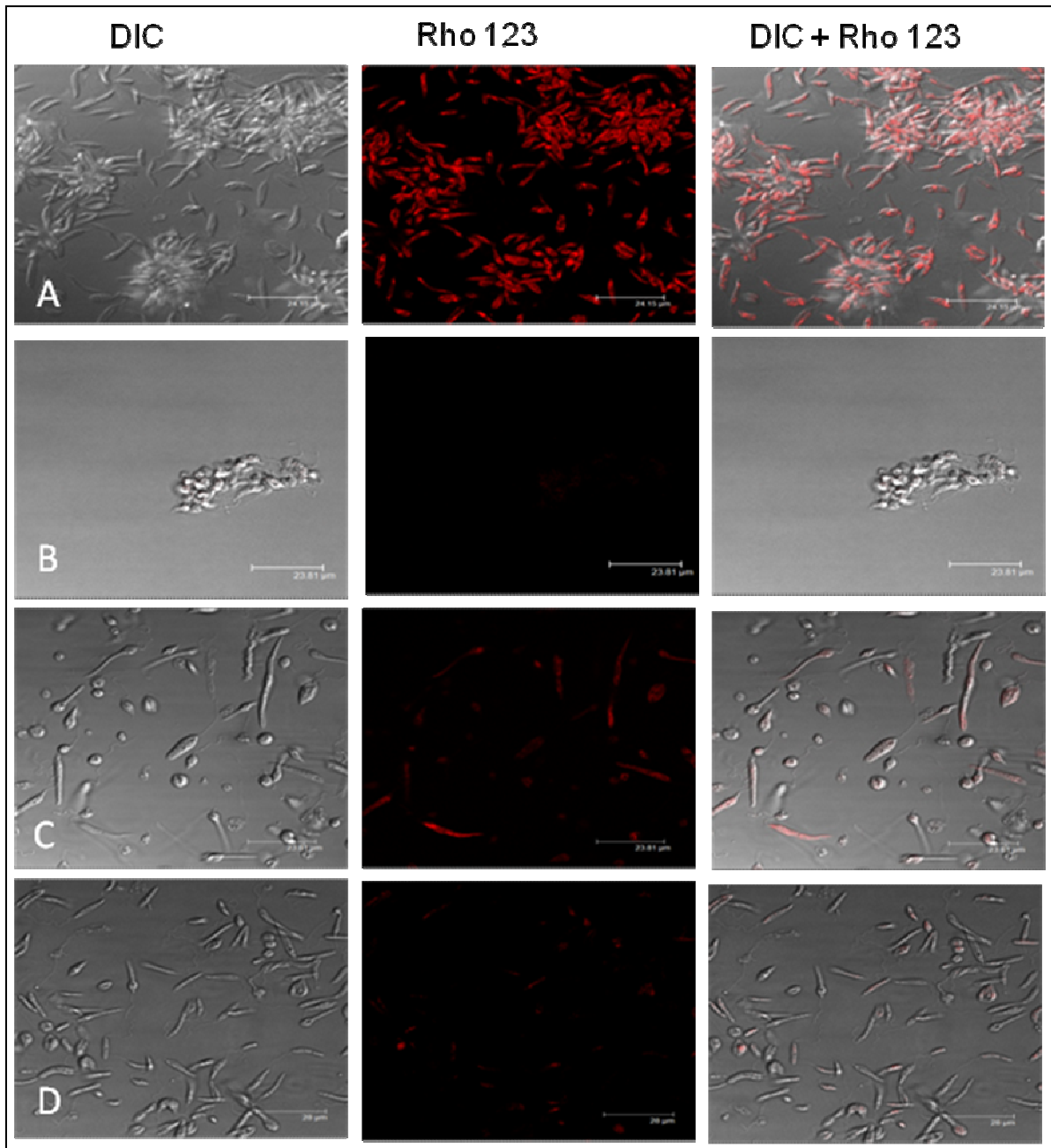
Figura 16- Microscopia confocal de células controles e tratadas com o extrato de *D. mertensii* e *L. dendroidea* submetidas à marcação com iodeto de propídio



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: A- Células controle, B- Células tratadas com 2x IC₅₀ do extrato DM, C- Células tratadas com 2x IC₅₀ do extrato LD. Note em (A) a presença de uma célula com morfologia alterada positiva para IP (seta branca) e em (B) a presença de células com morfologia alterada, mas negativas para IP (seta larga). DIC – Contraste diferencial de interferência; IP- Imagem obtida no canal correspondente a emissão de fluorescência do Iodeto de Propídio (580nm); DIC + IP – sobreposição das imagens.

Figuras 17- Microscopia confocal de células controles e tratadas com o extrato de *D. mertensii* e *L. dendroidea* submetidas a marcação com rodamina 123



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: A- células controles, B- células tratadas com metanol, C- células tratadas com DM, D- células tratadas com LD. Note em (C e D) a presença de células arredondadas pequenas e grandes com fraca ou nenhuma marcação para rodamina. DIC – Contraste interferencial; Rho 123 – Marcação com Rodamina 123 e DIC + Rho – Sobreposição das duas imagens.

7 DISCUSSÃO

A leishmaniose cutânea, causada pelo protozoário *Leishmania amazonensis* geralmente é uma doença debilitante que causa segregação social com maiores impactos principalmente nas populações menos favorecidas economicamente onde a desnutrição e as condições socioambientais contribuem para um aumento na mortalidade e morbidade associado a esta doença. Além destes agravos a co-infecção com o vírus da Imunodeficiência torna a Leishmaniose uma das doenças mais de grande interesse para a saúde pública mundial (BRASIL, 2007). Nenhuma vacina está disponível para o tratamento desta doença e a quimioterapia baseada em compostos pentavalentes causam sérios efeitos colaterais além de relatos de resistência ao tratamento. Nestes casos, Anfotericina B e Pentamidina têm sido utilizadas, mas novamente os severos efeitos colaterais e o alto custo do tratamento ainda são fatores altamente limitantes a eficácia do tratamento (AMATO et al., 2008). Dentro deste panorama a prospecção de novos agentes quimioterápicos ainda se faz necessário.

As algas Marinhas têm sido utilizadas na medicina tradicional e como fonte alimentar pela cultura oriental por milhares de anos, possuindo uma série de compostos bioativos derivados do seu metabolismo secundário (KANG et al., 2008). Neste sentido, os produtos derivados de plantas, notavelmente os extraídos de algas marinhas, constituem uma importante fonte alternativa no tratamento das mais diversas doenças, especialmente nos países em desenvolvimento.

No presente trabalho nós realizamos um *screening* da atividade biológica de extratos de macroalgas encontradas no litoral pernambucano sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Todas as algas foram capazes de inibir o crescimento dos parasitas, embora de maneira distinta. Dentre estas algas, a *Canistrocarpus cervicornis*, *Dictyota mertensii* e a *Laurencia dendroidea* foram as mais eficazes devido aos baixos valores de IC₅₀ (<100 µg/mL) e os altos índices de seletividade encontrados (IS > 2). Vale ressaltar que todos os extratos testados apresentaram baixa atividade citotóxica para células de mamífero, apresentando valores de CC₅₀ variando de 189,99 a 510,64 µg/ml. A baixa toxicidade dos extratos em relação às células de mamíferos teve um reflexo direto nos valores de IS, os quais foram sempre mais seletivos para os parasitas do que para as células de mamífero (IS>1). Embora a maioria das algas tenha apresentado valores altos de IC₅₀ para formas promastigotas não se pode descartar a possibilidade de que estas apresentem uma maior efetividade contra formas intracelulares de *L. amazonensis*. Além do mais, é possível que a ação de compostos biologicamente ativos presentes nestas algas possam de alguma forma estar interagindo com

outras moléculas tendo assim o seu efeito atenuado por essas interações. De fato, estudo sobre a atividade leishmanicida de *Canistrocarpus cervicornis*, utilizando extratos brutos obtidos através da extração com Diclorometano (DCM), metanol ou acetato de etila, frações isoladas, além do diterpeno 4-acetoxidolastano purificado desta alga, mostraram que este último possui uma atividade pelo menos 10 vezes superior ao extrato de melhor atividade (diclorometano) e 4 vezes superior a fração. Em razão inversa, o composto isolado mostrou ser menos tóxico do que os extratos brutos (SANTOS et al., 2011). Assim, um estudo mais aprofundado da atividade biológica de compostos isolados a partir deste extrato contra as diferentes formas evolutivas de *L. amazonensis* deve ser realizado.

Em nossos ensaios nós selecionamos as algas *C. cervicornis* (CC), *D. mertensii* (DM) e *L. dendroidea* (LD) por terem sido as algas que apresentaram maior atividade contra formas promastigotas com baixa citotoxicidade para os macrófagos, para dar prosseguimento as nossas análises.

Inicialmente, nós testamos estes extratos sob as formas intracelulares amastigotas de *L. amazonensis*. Todos os extratos testados apresentaram uma atividade superior contra formas amastigotas intracelulares quando comparadas com as formas promastigotas. Nossos dados também revelaram que houve redução significativa ($p < 0,05$) no índice de sobrevivência das amastigotas no interior dos macrófagos. Isso é particularmente encorajador uma vez que esta forma é a responsável pelas manifestações clínicas das leishmanioses (BRASIL, 2007). Tendo em vista que para ter acesso às amastigotas intracelulares os extratos têm que atravessar a membrana da célula hospedeira e a do parasita, uma maior atividade nas formas amastigotas quando comparadas as promastigotas extracelulares parece ser contraditória. No entanto, é possível que os extratos possam estar agindo sobre as células hospedeiras tornando-as mais competente para combater a infecção.

O óxido nítrico é uma importante molécula efetora de uma variedade de funções biológicas, que incluem a agregação plaquetária, a neurotransmissão, citotoxicidade e a defesa contra parasitas (LIEW; WEI; PROUDFOOT, 1997). Esta molécula é usualmente mensurada pelos seus produtos oxidados, nitrito ou nitrato, em sobrenadante de cultura ou soro (LIEW et al., 1997). A produção de óxido nítrico (NO) se dá após a ativação da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que está pouco expressa em macrófagos não ativados (KORHONEN et al., 2005). Os macrófagos utilizam essa via para eliminar microorganismos fagocitados, em especial parasitas, como a *Leishmania* (BOGDAN, 2001; KORHONEN et al., 2005). Com o objetivo de avaliar se a morte das amastigotas intracelulares está relacionada à ativação dos macrófagos, mensuramos a produção de NO por estas células.

Todos os extratos induzem a um aumento na produção de NO quando comparado com o controle, principalmente nas maiores concentrações onde as diferenças entre as células controles e tratadas passam a ser significativas ($p < 0,05$). Esse aumento na produção de NO nas células poderia explicar a maior susceptibilidade das formas intracelulares de *L. amazonensis* e aponta para um papel adicional imunomodulatório dos extratos testados. Estudos prévios realizados com extratos e com sesquiterpenos isolados de *L. dendroidea* coletadas no sudeste do Brasil falharam em identificar um aumento na produção de óxido nítrico por macrófagos (MACHADO et al., 2011). Esta aparente controvérsia pode ser devido a diferenças existentes entre algas presentes no litoral do sudeste e as utilizadas em nosso estudo com relação à sua composição de compostos secundários.

Na investigação de prováveis alvos intracelulares de ação dos extratos nós realizamos a análise ultraestrutural das células controles e tratadas. Nossas observações mostraram que todos os extratos causaram alterações drásticas nos parasitas de maneira dose-dependente. As análises das células tratadas, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), mostraram uma ação semelhante entre os extratos tais como o inchaço da mitocôndria, desorganização celular e alterações nucleares significativas. Nas células mais drasticamente afetadas, sobretudo nas tratadas com $2 \times IC_{50}$, pôde-se observar esvaziamento do citoplasma, e comprometimento da membrana celular. Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) os efeitos sobre a forma e integridade da membrana do parasita puderam ser melhor observados. Nota-se nas células tratadas um enrugamento da membrana plasmática, diminuição do flagelo e alguns casos comprometimento da membrana com exposição do material citoplasmático. Todos estes efeitos são indicativos da perda da viabilidade e morte celular, principalmente por necrose, uma vez que algumas das células apresentavam perda da integridade da membrana característico deste tipo de morte celular (MENNA-BARRETO, 2009). No entanto, outros tipos de morte celular programada como a apoptose não devem ser descartados.

Os tripanosomatídeos como o *Trypanosoma cruzi* e as diversas espécies de *Leishmania* possuem uma mitocôndria única com características bastante divergentes em relação às células de mamíferos superiores (FIDALGO; GILLE, 2011). Estas características tornam estas organelas importantes alvos para potenciais quimioterápicos. Alterações na mitocôndria de tripanosomatídeos causadas por drogas são comumente relatadas na literatura, mostrando que esta organela é particularmente sensível a ação de quimioterápicos (SANTA-RITA et al., 2006).

Nossos resultados apontam a mitocôndria como principal alvo de ação dos extratos de CC e de LD. Estudos prévios sobre a atividade do elatol, um sesquiterpeno isolado de *L. dendroidea* e o 4-actoxydolastane, um diterpeno encontrado em *C. cervicornis*, sobre *L. amazonensis* também apontam a mitocôndria como principal alvo destes compostos (SANTOS et al., 2010 e 2011).

Para melhor elucidar o efeito dos diferentes extratos sobre a fisiologia da mitocôndria células tratadas com os extratos de LD e DM foram submetidas a marcação com rodamina 123 e analisadas por citometria de fluxo para detectar possíveis alterações no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Em células normais, o gradiente eletroquímico é mantido pelo bombeamento ativo de H^+ durante a transferência de elétrons ao longo da cadeia respiratória. Neste sentido, o potencial eletroquímico gerado mantém a integridade e função das mitocôndrias (SHANG et al., 2009). Perturbações neste potencial podem levar ao decréscimo de ATP, redução na transcrição e tradução de genes mitocondriais, os quais podem resultar na morte da célula tanto por apoptose quanto por necrose (SHANG et al., 2009). Os valores negativos encontrados para IV nas células tratadas indicam uma considerável perda do potencial de membrana após o tratamento com DM. No entanto, o comportamento das células tratadas com $1 \times IC_{50}$ do extrato LD leva a uma hiperpolarização da membrana conforme indicado pelo valor positivo de IV (+0.53). O rompimento do potencial de membrana tem sido proposto como um ponto sem volta na sinalização apoptótica. Por outro lado, tem sido demonstrado para células de eucariotos superiores, que a hiperpolarização da mitocôndria ocorre nas primeiras fases da apoptose precedendo a externalização da fosfatidilserina e a perda do $\Delta\psi_m$ (BANKI et al., 1999; GERGELY et al., 2002). Normalmente a hiperpolarização leva também a produção de radicais de oxigênio (ROS) levando a um estresse oxidativo resultando na morte do parasita. Estudo sobre a atividade leishmanicida de *C. cervicornis* mostrou que o composto 4-Acetoxydelastane isolado desta alga também causa uma progressiva perda do potencial de membrana nos parasitas tratados (SANTOS et al., 2011).

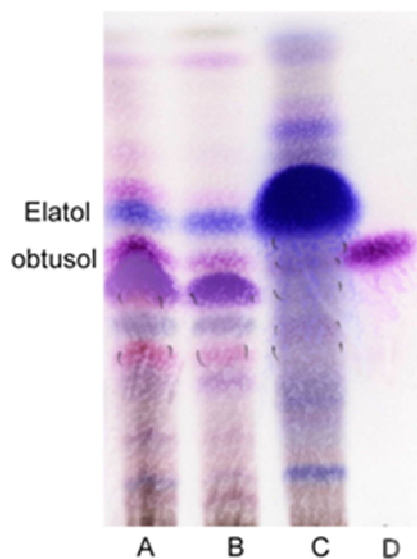
Para avaliarmos a extensão dos danos causados a membrana na população de parasitas após o tratamento com os extratos de DM e LD nós utilizamos o iodeto de propídio, o qual é um corante com afinidade por ácidos nucleicos, impermeável as células íntegras. Ao contrário do que apontou as nossas observações ultraestruturais, apenas uma pequena proporção de células, não mais que 20%, apresentaram marcação positiva para IP indicando um comprometimento da integridade da membrana característica da morte celular por necrose. Esses dados indicam que a necrose não é a principal via de morte celular lícitada pela

ação dos extratos. É importante ter em mente, que os processos de morte celular programada tais como a apoptose e necrose são altamente dinâmicos envolvendo várias etapas que podem se sobrepôr nas células (MENNA-BARRETO et al., 2009; SANDES et al., 2010). Assim as disparidades encontradas entre os dados da citometria de fluxo e os achados da microscopia eletrônica podem ser devidas ao caráter estático das análises meramente morfológicas realizadas através microscopia eletrônica, as quais podem levar a interpretações equivocadas (ZONG; THOMPSON, 2006).

Embora a composição química dos nossos extratos ainda não tenha sido elucidada vários relatos da literatura têm demonstrado que as algas utilizadas em nossos estudos são ricas em compostos halogenados como os terpenos/terpenóides. Estes compostos são reconhecidos por possuírem importantes atividades biológicas contra microrganismos incluindo tripanosomatídeos (OTOGURO et al., 2011). As algas vermelhas são reconhecidamente as maiores produtoras de substâncias halogenadas no meio marinho, tendo o gênero *Laurencia* Lamouroux (Rhodomelaceae, Ceramiales) destaque como uma fonte fascinante de novos produtos naturais com atividade biológica. Os estudos sobre os constituintes químicos deste gênero mostraram que as diversas espécies de *Laurencia* são capazes de sintetizar diferentes classes de substâncias, como sesquiterpenos halogenados ou não, diterpenos, triterpenos, e acetogeninas, totalizando mais de quinhentos metabólitos secundários (KLADI et al., 2004; GRESSLER et al., 2009). A análise por separação cromatográfica dos extratos diclorometano-metano de duas populações *L. dendroidea* coletadas no litoral da região Sudeste permitiram a identificação de 5 sesquiterpenos: obtusano, triquinane, elatol, obtusol e cartilagenol em sua composição. Destes, o elatol, obtusano e triquinano foram efetivos contra forma promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (MACHADO et al., 2011). O elatol foi testado com esta mesma espécie por dos Santos e et al. (2010) mostrando um potente agente anti-proliferativo contra estes parasitas e levando a significativas alterações na sua ultraestrutura. Este composto também foi testado contra formas epimastigotas e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* apresentando uma IC₅₀ de 45,4 µM e 1,38 µM (VEIGA-SANTOS et al., 2010). Embora a atividade de *L. dendroidea* e *C. cervicornis* contra *L. amazonensis*, tenha sido explorada por vários grupos, incluindo o presente trabalho, é preciso ter em mente que as mesmas espécies coletadas em locais diferentes podem estar sujeitas a pressões seletivas distintas resultando em variações na quantidade e na composição de seus constituintes. Pequenas diferenças na composição química das algas podem ter impacto direto sobre a atividade tripanocida e leishmanicida. Além do mais o método de extração também pode ser fundamental para atividade biológica

destas algas. Consistentemente, Santos e et al. demonstraram que diferentes extratos de *C. cervicornis* possuem atividade distinta contra *Leishmania amazonensis*. O perfil cromatográfico representado na figura 18 abaixo ilustra bem as diferenças entre os constituintes químicos da *L. dendroidea* utilizada em nossos estudos (LDPE) (Figura 18 A e B) e a uma amostra de *L. dendroidea* coletada no Rio de Janeiro (LDRJ). Podemos observar que apenas uma pequena quantidade de elatol é encontrada em nossas amostras (Figura 18 A-B), enquanto que na amostra de LDRJ este composto é o majoritário (Figura 18C). Por outro lado, bandas presentes em nossos extratos estão ausentes nas amostras do Rio de Janeiro. O obtusol (Figura 18D) está presente nas amostras de LDPE, mas não é evidente nas amostras de LDRJ. Além das diferenças dos locais de coleta, os solventes utilizados na extração dos extratos também variaram. Nossas amostras foram extraídas com uma mistura de DCM/Metanol, enquanto na amostra LDRJ foi utilizado n-hexano/DCM com solvente para extração. A mistura DCM/Metanol permite a extração de compostos mais polares, enquanto a mistura n-hexano/DCM é um solvente de baixa polaridade, privilegiando a extração de compostos pouco polares. Assim fica claro, que vários quimiotipos podem estar presentes em uma mesma espécie, a depender das condições abióticas e bióticas e o tipo de solvente utilizado na extração (VALLIM; TEIXEIRA; PEREIRA, 2007).

Figura 18– Cromatografia de camada delgada dos extratos de *L. dendroidea* coletadas em diferentes localidades e extraídos com solventes distintos



Fonte: Bianco (2010)

Legenda: (A e B) Extrato DCM/Metanol de *Laurencia dendroidea* coletada no litoral pernambucano; (C) Extrato n-hexano/DCM de *Laurencia dendroidea* coletada no litoral do Rio de Janeiro (D) padrão de obtusol.

O gênero *Dictyota* é uma fonte reconhecida de uma série de diterpenos os quais são responsáveis por diversos tipos de mediações com defesa contra herbívoros, particularmente o dictyol (guaiano prenilado) (BLUNT et al., 2006). O dictyol H e o epoxipachydictyol A foram os compostos majoritários isolados de frações (separadas por cromatografia) do extrato bruto da *D. mertensii* de duas localidades distintas, Rio de Janeiro e Fernando de Noronha, respectivamente (VALLIM; TEIXEIRA; PEREIRA, 2007). Em outro trabalho, foram identificados quatro diterpenos (pachydictyol, isopachydictyol, dictyóxido e o dictyol C) e um esterol (fucosterol) da *D. mertensii* do Estado do Rio Grande do Norte (FREITAS et al., 2004). Estudos biológicos têm mostrado que um número significativo de metabólitos secundários de *Dictyota* possuem efeitos citotóxicos, bactericida além de conferir proteção contra herbívoros (KÖNIG et al., 1994; BARBOSA et al., 2004; PAUL; CRUZ-RIVERA; THACKER, 2001). No entanto poucos são os estudos que exploram o potencial desses como agentes quimioterápicos contra doenças parasitárias. Dessa maneira, o nosso estudo foi o pioneiro na avaliação da atividade leishmanicida do extrato de *D. mertensii*, revelando que essa alga foi eficiente na inibição de crescimento das formas promastigotas ($IC_{50} 71,60 \pm 9,29$), possuindo baixa citotoxicidade as células de mamíferos, sendo cerca de três vezes mais seletiva as formas promastigotas, além de apresentar um efeito considerável sobre formas amastigotas ($IC_{50} 35,8 \pm 3,7$) com o maior índice de seletividade contra estas formas entre as três algas mais efetivas testadas em nosso estudo (IS= 6,5).

Embora, estudos posteriores visando uma caracterização precisa dos constituintes químicos das algas *C. cervicornis*, *L. dendroidea* e *D. mertensii* coletadas no litoral Pernambucano, bem como o isolamento de seus componentes para testes *in vitro* e *in vivo* ainda sejam necessários, nossos resultados sugerem fortemente a utilização destes extratos no tratamento da Leishmaniose cutânea. Estes estudos se justificam pela baixa toxicidade destas algas frente às células de mamífero e uma atividade significativa dos extratos sobre as formas promastigotas e amastigotas do parasita.

8 CONCLUSÕES

- a) Todos os extratos testados foram capazes de inibir o crescimento dos parasitas, embora de maneira distintas;
- b) O ISe encontrado para os extratos analisados demonstra a baixa toxicidade destes em relação às células de mamíferos;
- c) Todos os extratos apresentaram uma atividade superior contra formas amastigotas intracelulares quando comparadas com as formas promastigotas. O aumento na produção de NO pelos macrófagos poderia explicar a maior susceptibilidade das formas intracelulares de *L. amazonensis* e aponta para um papel adicional imunomodulatório dos extratos testados;
- d) Os extratos causaram alterações ultraestruturais semelhantes, demonstrando efeitos indicativos da perda da viabilidade e morte celular;
- e) As alterações ultraestruturais apontam a mitocôndria como principal alvo de ação dos extratos;
- f) Os dados indicam que a necrose não é a principal via de morte celular lícitada pela ação dos extratos;
- g) Pequenas diferenças na composição química das algas podem ter impacto direto sobre a atividade leishmanicida. Além do mais o método de extração também pode ser fundamental para atividade biológica destas algas;
- h) O nosso estudo foi o pioneiro na avaliação da atividade leishmanicida do extrato de *D. mertensii*, revelando que esta alga foi eficiente na inibição de crescimento das formas promastigotas, além de apresentar um maior efeito sobre as amastigotas;
- i) Os resultados sugerem fortemente a utilização dos extratos de CC, DM e LD no tratamento da Leishmaniose Cutânea, porém pesquisas futuras são necessárias para a investigação da atividade em infecções *in vivo*, assim como o fracionamento dos

extratos e isolamento de metabólitos secundários destes extratos, a fim de identificar os componentes ativos responsáveis pela ação encontrada contra *Leishmania amazonensis*.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, I.R. et al. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. Brazilian journal of medical and biological research, Ribeirao Preto, v. 37, p. 167-171, 2004.
- ANDRADE, M.S. et al. Novo surto de leishmaniose tegumentar Americana, na em área de treinamento militar na Zona da Mata norte do Estado de Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 42, n. 5, p. 594-596, 2009.
- AMATO, V. S. et. al. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. Acta tropica, Basel, v. 105, n. 1, p. 1-9, 2008.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. International Journal for Parasitology, New York, v.30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.
- BANKI, K. et al. Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling. Journal of immunology, Baltimore, v.1, n. 162, p. 1466-1479, 1999.
- BASSO, L.A. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases--a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 100, p. 475-506, 2005.
- BARBOSA, J. P. et al In vitro antiviral diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota paffii*. Planta medica, Stuttgart, v. 70, n.9, p. 856-860, 2004.
- BARRAL , A et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.
- BARRAL-NETTO, M. et al. Human leishmaniasis. Brazilian journal of medical and biological research, Ribeirão Preto, v. 31, p. 149-155, 1998.
- BIANCO, E. M. Lista das macroalgas. [Mensagem pessoal]. Mensagem recebida por amanda.alianca@yahoo.com.br em 20 de maio de 2010.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. Natural product reports, London, v. 23, n.1, p. 26-78, 2006.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. Natural product reports, London, v. 28, n.2, p. 196-268, 2011.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological Surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis northeast Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 93, n. 5, p. 488-494, 1999.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília Ministério da Sade. Brasília, 2009.

BOGDAN, C. Nitric oxid and the immune response. Nature immunology, New York, v. 2, p. 907-916, 2001.

BOUKAI, L. K. et al. Trafficking of cysteine proteinase to Leishmania lysosomes: lack of involvement of glycosylation. Molecular Biochemical Parasitology, Amsterdam, v.107, n. 2, p. 321-325, 2000.

CARVALHO, P.B; ARRIBAS, M.A.G.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? Revista brasileira de ciências farmacêuticas, São Paulo, v. 36, p. 69-96, 2000.

CHRISTOPHER, L. K.; AUWAERTER, P. G.; MAYER K. H. Coinfection with HIV and Tropical Infectious Diseases: Protozoal Pathogens. Clinical Infectious Disease, Arlington, v.45, n.9, p.1208-1213, 2007.

COSTA et al. BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production. PloS neglected tropical diseases, San Francisco, v.5, n. 3, p. 965, 2011.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v.19, n.1, p.111-126, 2006.

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

DESJEUX, P. The increase in risk factor for Leishmaniasis worldwide. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 95, p. 239-243, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Nature reviews microbiology, London, v. 2, n.9, p. 692 - 693, 2004.

DESJEUX, P. Visceral form. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html>. Acesso em: 15 nov 2011.

DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes- conserved from bacteria to man. Nature Reviews Microbiology, London, v. 3, p. 251-261, 2005.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. Current Pharmaceutical Design, Shipho, v.14, n.9, p.882-888, 2008.

ENGEL, S.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Chemical ecology of marine microbial defense. Journal of chemical ecology, New York, v.28, p. 1971-1985, 2002.

FAULKER, D.J. Marine natural products. Natural Product Reports, London, v. 19, n.1, p. 1-48, 2002.

FREILE-PELEGRIN, Y. et al. Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. Fitoterapia, Milano, v. 79, p. 374-377, 2008.

FIDALGO, L.M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. Pharmaceutical Research, New York, v. 28, n.11, p. 2758-2770, 2011.

FONSECA-SILCA, F. et al. Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in *Leishmania amazonensis*. PLoS One, San Francisco, v. 8, n. 6, p. 1- 7, 2011.

GENOVESE, G.; TEDONE, L.; HAMANN, T. M.; MORABITO, M. The Mediterranean Red Alga *Asparagopsis*: A Source of Compounds against *Leishmania*. Marine Drugs, Basel, v.7, p. 361-366, 2009.

GERGELY, P. JR. et al. Persistent mitochondrial hyperpolarization, increased reactive oxygen intermediate production, and cytoplasmic alkalinization characterize altered IL-10 signaling in patients with systemic lupus erythematosus. Journal of immunology, Baltimore, v. 5, n. 169, p. 1092-1101, 2002.

GIL, E. S. et al. Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares. Vita et Sanitas, Trindade, v. 1, n . 01, 2007.

GOLLOB, K. J. et al. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. International Immunopharmacology, Amsterdam, v. 8, n.10, p. 1338-1343, 2008.

GOTTLIEB, O. R.; MORS, W. B. Potential utilization of Brazilian wood extractives. Journal of Agricultural Food Chemistry, Washington, v. 28, n. 2, p. 96-215, 1980.

GRESSLER et al. Sesquiterpenes from the essential oil of *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta): isolation, biological activities and distribution among seaweeds. Revista Brasileira de Farmacognosia, Curitiba, v. 21, n .2, p. 248-254, 2011.

HAEFNER, B. Drugs form the deep: marine natural products as drug candidates. Drugs Discovery Today, Kidlington, v. 8, p. 536-544, 2003.

HAMMARTON, T.C.; MOTTRAM, J.C.; DOERING, C. The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. Progress in cell cycle research. New York, v. 5, p. 91-1001, 2003.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. Advances in Parasitology, London, v.44, p.1-39, 2000.

HARHAY, M. O. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. Trends in parasitology, Oxford, v. 27, n.9, p. 403-409, 2011.

HEUSER, J. E. A critical comparison between the two current methods of viewing frozen, live cells in the electron microscope: cryoelectron microscopic tomography versus “deep-etch” electron microscopy. Biomedical Reviews, Warsaw, n.12, p.11-29, 2001.

HOARE, C. A., WALLACE, F. C. Developmental stages of tipanosomatid flagellates: a new terminology. Nature, London v. 212, p. 1358-1386, 1996.

KANG, J.Y. et al. Antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory activities of the seaweed *Sargassum fulvellum* and *Sargassum thunbergii* in mice. Journal of ethnopharmacology, Limerick, v. 116, p. 187-90, 2008.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nature Reviews Microbiology, London, v. 11, n. 9, p.604-615, 2011.

KARABAY-YAVASOGLU, N. U. et al. Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga *Jania rubens*. Phytotherapy Research, London, v. 21, n. 2, p. 153–156, 2007.

KLADI, M.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Volatile halogenated metabolites from marine red algae. Phytochemistry Reviews, London, v.3, n.3, p.337-366, 2004.

KÖNIG, G. M. et al. Biological activities of selected marine natural products. Planta Medica, Stuttgart, v. 60, p. 532-537, 1994.

KORHONEN, R. Nitric oxide production and signaling in inflammation. Current drug targets. Inflammation and allergy, San Francisco, v. 4, n. 4, p. 471-479, 2005.

KUMARI, S.; RAM, V. J. Visceral Leishmaniasis: Clinical Features, Pathology, Diagnosis and Chemotherapeutic Developments. Drug News Perspect, Kidlington, v. 15, n.2, p. 417, 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. New World leishmaniasis. The neoptical Leismania species. In: _____. Microbiology and Microbial Infectuous Disease. London9nd ed, Arnold, 1998.

LERNER, E.A.; SHOEMAKER, C. B. Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v.15, n. 267, p. 1062-1006, 1992.

LIEW, F. Y.; WEI, X.Q.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, London, v. 29, n. 352, p. 1311-1315, 1997.

LOCKSLEY, R. M. Cutaneous host defense in leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. Infection and Immunity, Washington, v. 56, n. 2, p. 336-342, 1988.

MACHADO, F.L.S. et al. Antileishmanial Sesquiterpenes from the Brazilian Red Alga *Laurencia dendroidea*. Planta Medica, Stuttgart, v. 77, n. 7, p. 733-735, 2011.

MAGALHAES, K. D. et al. Anticoagulant, Antioxidant and Antitumor Activities of Heterofucans from the Seaweed *Dictyopteria delicatula*. International Journal of Molecular Sciences, Postfach, v. 12, n.5, p. 3352-3365, 2011.

MAIA-ELKHOURY, A. N. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 24, n.12, p. 2941-2947, 2008.

MANIVANNAN, G. et al. Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Beijing, v. 1, n.2, p.114–120, 2011.

MARCA MÉDICA. Evaporador rotativo. Disponível em: <<http://marcamedica.com.br/>> Acesso em: 15 out. 2011.

MARINE LIFE PHOTOGRAPHY. *Hypnea musciformis*. Disponível em: <<http://www.marinelifephotography.com>> Acesso em: 7 out. 2011.

MARINE LIFE PHOTOGRAPHY. *Chaetomorpha antennina*. Disponível em: <<http://www.marinelifephotography.com>> Acesso em: 7 out. 2011.

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escobel, 1911). Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene, Baltimore, v. 80, p. 859-876, 1986.

MEHTA, A.; SHAHA, C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v.279, n. 12, p.798-813, 2004.

MENNA- BARRETO, R. F. et al.

Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. Micron, Oxford, v. 40, n. 2, p. 157-168, 2009.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, London, v. 403, p. 853-858, 2000.

MICHELS, P. A. et al. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v.1763, n.12, p.1463–1477, 2006.

MOLYNEUX, D. H.; KILLICK-KENDRICK, R. Morphology, ultratutural and life cycles. In “The leishmaniasis in Biology and Medicine”. Academic Press, London, vol 1, p. 121-176, 1987.

MOO-PUC, R.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRIN, Y. Evaluation of selected tropical seaweeds for in vitro anti-trichomonas activity. Journal of ethnopharmacology, Limerick, v. 120, p. 92-97, 2008.

MURRY, H.W. Clinical and Experimental advances in treatment of visceral Leishmaniasis. Antimicrobial agents and chemotherapy. Washigton, v. 45, p. 2185-2197, 2001.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. Lancet. London, v. 4, n. 366(9496), p. 1561-1577, 2005.

NATEGHI, R. M. et al. Differential in vitro CD4+/CD8+ T-cell response to live vs. killed *Leishmania major*. Parasite Immunology, Oxford, v. 32, n. 2, p. 101-110, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. Journal of natural products. Cincinnati, v. 66, p.1022-1037, 2003.

NUESTRO MAR. Laurencia dendroidea (2009). Disponível em: <<http://www.nuestromar.org/node/22291/print>> Acesso em: 6 out. 2011.

OLIVEIRA, E.; ÖSTERLUND, K.; MTOLERA, M.S.P. Canistrocarpus cervicornis (2005). Disponível em: < <http://www.algaebase.org>>. Acesso em: 6 out. 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SADE. Of the Scientific Working Group meeting on Leishmaniasis. Geneve, 2004. Disponível em<http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/swg-report-leishmaniasis/pdf/swg_leish>. Acesso em: 3 nov. 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. The 17th Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/ WHO. Special Programme for Research Training in Tropical Diseases. Geneve, 2006. Disponível em<<http://www.who.int/tdr/leishmaniasis.htm>>. Acesso em: 15 dez. 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. The use of visceral leishmaniasis rapid diagnostic tests. Geneve, 2008. Disponível em: < www.who.int/entity/tdr/publications/year/2008/en/ > Acesso em: 7 nov. 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leishmaniasis. Geneve, 2010. Disponível em: < http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em: 2 dez. 2011.

ORHAN, I. et al. Turkish freshwater and marine macrophyte extracts show in vitro antiprotozoal activity and inhibit FabI, a key enzyme of Plasmodium falciparum fatty acid biosynthesis. Phytomedicine. Stuttgart, v. 13, p. 388-393, 2006.

OTOGURO, K. et al. In vitro antitrypanosomal activity of plant terpenes against *Trypanosoma brucei*. Phytochemistry. New York, v. 72, n. 16, p. 2024-2030, 2011.

PASSERO, L. F. et al. Exacerbation of *Leishmania* (Viannia) shawi infection in BALB/c mice after immunization with soluble antigen from amastigote forms. APMIS: Acta pathologica microbiologica et immunologica scandinavica, Copenhagen, v.118, n.12, p. 973-981, 2010.

PAUL, V. J.; CRUZ-RIVERA, R.; THACKER, R. Q. Chemical mediation of macroalgal herbivore interactions: ecological and evolutionary perspectives. Marine chemical ecology, p. 227-265, 2001.

PEREIRA, R.C.; CAVALCANTI, D. N.; TEIXEIRA, V. L. Effects of secondary metabolites from the tropical Brazilian Brown alga *Dictyota menstrualis* on the amphipod *Parhyale hawaiiensis*. Marine Ecology Progress Series, Halstenbek, v. 205, p. 95-100, 2000.

PEREIRA, R. C.; DA GAMA, B. A. P. Macroalgal Chemical Defenses and Their Roles in Structuring Tropical Marine Communities. Algal Chemical Ecology, p. 25-55, 2008.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Sade. Leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco. Boletim Epidemiológico, Recife, ano 1, n. 3, 2002.

PETERS, E. A. et al. Specific inhibition of lymphocyte-proliferation responses by adherent suppressor cells in diffuse cutaneous leishmaniasis. New England journal of medicine. Boston, v.306, p. 387-392, 1982.

PINHEIRO, R. O. et al. The T-cell anergy induced by *Leishmania amazonensis* antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. Anais da Academia Brasileira Ciência, Rio de Janeiro, v. 76, p. 519-527, 2004.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Química Nova, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. Química nova, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infectious Diseases, New York, v.7, n. 9, p. 581-596, 2007.

REY, L. O complexo Leishmania brasiliensis e a leishmaniose tegumentar americana. In: _____. Parasitologia. 3 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan 2001. p. 182-192.

ROBERTS, L.; JANOVY, J. Jr. Foundations of Parasitology. 6 ed. MAMcgraw-Hill Higher Education, 2000.

ROCHA, F.D. et al. Potential cytotoxic activity of some Brazilian seaweeds on human melanoma cells. Phytotherapy Resarch, London, v. 21, p. 170-175, 2007.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nature Reviews Immunology, London, v. 2, p. 845-858, 2002.

SANDES, J. M. et al. 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile): A new highly active compound against epimastigote and trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. Bioorg Chem, Oxford, v. 38, n. 5, p. 190-195, 2010.

SANTA-RITA, R. M et al. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. J Antimicrob Chemother, v. 54, n. 4, p.n 704-710, 2004.

SANTOS, A. O. et al. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. Marine Drugs, Postfach, v. 29, n. 8, p. 2733-2743, 2010.

SANTOS, A.O. et al. 4-Acetoxydolastane diterpene from the Brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis* as antileishmanial agent. Marine Drugs, Postfach, v. 9, n.11, p. 2369-2383, 2011.

SCHWARTZ, E.; HATZ, C.; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. Lancet infectious diseases, New York, v. 6, n. 6, p. 342-349, 2006.

SERES VIVOS DO RN. Alga verde *Caulerpa racemosa* (Natal, 2010). Disponível em: <<http://seresvivosdorn.blogspot.com.br>> Acesso em: 8 out 2011.

SHANG, X. L. et al. Procyanidin induces apoptosis and necrosis of prostate cancer cell line PC-3 in a mitochondrion-dependent manner. Journal Andrology, Philadelphia, v. 30, p. 122-126, 2009.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v.49, p.117-143, 1995.

SILVA, T.M. et al. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. Brazilian Journal of Mededical and Biological Research, Ribeirão Preto, v. 38, p. 523-533, 2005.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (Brasil). Leishmaniose Tegumentar Americana. Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>>. Acesso em: 4 nov. 2011.

SMITHSONIAN TROPICAL RESEARCH INSTITUTE. *Dictyota mertensii*. Disponível em: <<http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/dfm/>>. Acesso em: 19 out 2011.

SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.103, n.4, p.313-325, 2008.

SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Oxford, v.41, n.10, p.2069-2080, 2009.

TEIXEIRA, V.L.; KELECOM. A. Produtos naturais de algas marinhas. Química Nova, São Paulo, v.14, p. 83-90, 1991.

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

UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. Comparative analysis of megasomes in members of the *Leishmania mexicana* complex. Research in Microbiology, Paris, v.158, p.456-462, 2007.

VAIRAPPAN, C.S. et al. Antibacterial activity of halogenated sesquiterpenes from Malaysian *Laurencia* spp. Phytochemistry, New York, v. 69, p. 2490-2494, 2008.

VALLIM, M.A.; TEIXEIRA, V. L.; PEREIRA, R. C. Feeding-deterrent properties diterpenes of *Dictyota mertensii*. Brazilian Journal of Oceanography, v. 55, n. 3, p. 223- 229, 2007.

VANNIER-SANTOS, M. A. et al. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. Current Pharmaceutic Design, Schiphol, v. 8, n. 4, p. 297-318, 2002.

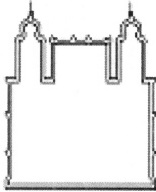
VEIGA- SANTOS, P. et al. *In vitro* anti-trypanosomal activity of elatol islated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. Parasitology, Cambridge, v.137, p. 1661- 1670, 2010.

VELOZO, D. et al. Leishmaniose mucosa fatal em criança. Anais brasileiros de dermatologia, Rio de Janeiro, v. 81, n. 3, p. 255-259, 2006.

VOULDOUKIS, I. et al. Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v.135, n. 2, p. 137-146, 2006.

WANG, H.; OOI, E. V.; ANG, P. O. JR. Antiviral activities of extracts from Hong Kong seaweeds. Journal of Zhejiang University. Science. B., Hanzhoul, v. 9, p. 969-976, 2008.

ZONG, W.X; THOMPSON, C.B. Necrotic death as a cell fate. Genes Devr, Cold Spring Harbor NY, v.20, p.1-17, 2006.

Anexo A- Parecer do CEUA/CPqAM

MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

" *Estudo dos efeitos de compostos naturais e sintéticos sobre tripanosomatídeos.* "

número P-427/07, proposto por Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo, foi licenciado pelo Nº L-001/08.

Sua licença de Nº L-001/08 autoriza o uso anual de :

- 2 *Oryctolagus cuniculus*

- 400 *Mus musculus*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 19 de fevereiro de 2012 .

Rio de Janeiro, 24/09/2008

Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ