

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

SIMONE KATZ

**EFEITO DO VENENO DE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* E
SUAS FRAÇÕES SOBRE MACRÓFAGOS MURINOS
INFECTADOS COM *LEISHMANIA (LEISHMANIA)
AMAZONENSIS***

SÃO PAULO

2015

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

SIMONE KATZ

**EFEITO DO VENENO DE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* E SUAS
FRAÇÕES SOBRE MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS COM
*LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Mestrado em Medicina da
Universidade Nove de Julho.

Orientadora: Profa. Dra. Stella Regina
Zamuner.

Coorientadora: Profa. Dra. Clara Lúcia
Barbiéri Mestriner

São Paulo

2015

Katz, Simone

EFEITO DO VENENO DE *CROTALUS DURISSUS*
TERRIFICUS E SUAS FRAÇÕES SOBRE
MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS COM
LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS.

Dissertação (Mestrado) UNINOVE, 2015.

São Paulo, 24 de novembro de 2015.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: **Simone Katz**

Título da Dissertação: **"Efeito do veneno de *Crotalus Durissus Terrificus* e suas frações sobre macrófagos murinos infectados com *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*".**

Presidente: Profa. Dra. Stella Regina Zamuner



Membro: Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel



Membro: Prof. Dr. Humberto Dellê



“Renda-se como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.”

(Clarice Lispector)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Alice e Salomon pelo amor, educação recebida, incentivo e apoio constante.

Ao meu marido, companheiro e amigo, Jairo, pelo amor incondicional durante nossos 13 anos juntos.

Aos meus filhos Rosana e Gustavo, alegrias da minha vida, por todo amor e compreensão pelas ausências constantes durante esse período.

O meu muito obrigada! Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força e persistência e em seguida à toda minha família pelo constante incentivo.

À Prof^a. Dra. Stella Zamuner pela sua orientação, tranquilidade e atenção durante esse período de convivência. Agradeço pela amizade e por ter acreditado em mim e no meu trabalho.

À Prof^a. Dra. Clara Lúcia Mestriner, exemplo de competência e profissionalismo, pelos conhecimentos transmitidos e pelo apoio que recebi durante esse período.

A todos os professores pela excelência das aulas, pela dedicação e pelos conhecimentos transmitidos.

Às minhas queridas colegas do laboratório de parasitologia da UNIFESP, Danielle, Priscila e Isabela pela inestimável amizade, carinho e auxílio mesmo nas horas mais difíceis. Vocês foram fundamentais!

Ao meu amigo D^r. Gerson Salay pelas inúmeras conversas e explicações científicas.

À minha grande amiga Dra. Marjorie Marini pela competência, sugestões e críticas construtivas ao meu trabalho.

Às minhas amigas do laboratório de Pós-Graduação da Uninove, Luciana, Anna e Evela pela amizade, alegria, paciência e excelente convívio durante as aulas e fora delas também.

Aos meus colegas e amigos da UNIFESP, Henrique, Solange, Cris, Sandra, Regiane, Mércia, Adilson, Silene e Cidinha que tanto me apoiaram.

À Vera que aguçou minha curiosidade para fazer mestrado e me incentivou durante toda essa jornada.

Enfim a todos que direta e indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada

RESUMO

As leishmanioses cutâneas são doenças causadas por parasitas do gênero *Leishmania* que ocorrem frequentemente em países das regiões tropicais e subtropicais. Caracterizam-se por lesões de pele que podem evoluir para um estágio mais avançado e em alguns casos adquirir um aspecto desfigurante. O tratamento dessas parasitoses é feito tradicionalmente com antimoniais pentavalentes que além de apresentarem efeitos colaterais importantes, muitas vezes são ineficazes devido à aquisição de resistência pelos parasitas. Dessa maneira, buscam-se formas alternativas de tratamento dessas doenças. Estudos anteriores já demonstraram que componentes isolados de venenos de algumas espécies de serpentes inibem o crescimento de certos parasitas incluindo o gênero *Leishmania*. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos *in vitro* de frações do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* sobre as formas amastigotas intracelulares de uma das espécies causadoras de leishmaniose cutânea no Brasil, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Essas frações foram testadas em macrófagos de medula óssea de camundongos BALB/c infectados, tendo sido avaliadas duas concentrações dessas frações (25 e 50 µg/mL) e determinando-se a sua concentração inibitória de 50% (IC50) sobre os parasitas. Testes de citotoxicidade sobre os macrófagos também foram feitos pelo método do MTT. Além disso, a concentração da citocina TGF-β, implicada na infecção por *Leishmania*, foi avaliada no sobrenadante das culturas de macrófagos infectados com a *L. (L.) amazonensis* e tratados com as frações do veneno, assim como a secreção de óxido nítrico. Os resultados demonstraram que todas as frações do veneno utilizadas, exceto a fração convulxina à concentração de 25 µg/mL, apresentaram diminuição significativa do índice de infecção das culturas, enquanto que nenhuma delas apresentou citotoxicidade aos macrófagos. Entre as frações testadas, a crotamina apresentou a atividade leishmanicida mais eficaz. Houve diminuição da concentração do TGF-β nos macrófagos infectados e tratados com todas as frações crotálicas comparada à do grupo controle. Por outro lado, nenhuma das frações utilizadas levou à produção de óxido nítrico nos macrófagos tratados.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que as frações do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* apresentaram significativa atividade contra a infecção causada pela *L. (L.) amazonensis in vitro* e induziram um ambiente inflamatório, indicando o seu potencial para o tratamento da leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: *L. (L.) amazonensis*, macrófagos, frações do veneno *Crotallus durissus terrificus*.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis are a group of diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* which often occurs in countries from tropical and subtropical regions. These parasitic diseases are characterized by skin lesions that may progress to a more advanced stage leading to a disfiguring appearance. Treatment of these diseases is traditionally performed with pentavalent antimony that besides having significant side effects are often ineffective due to the acquisition of resistance by parasites. In this way, the search for alternative treatment for these diseases is imperative. Previous studies have shown that isolated venom components of some snake species exhibited growth inhibition of certain parasites including some species of *Leishmania*. The aim of the present study was to evaluate the *in vitro* effects of fractions from *Crotalus durissus terrificus* snake venom on intracellular forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. These fractions were tested at two concentrations (25 and 50 mg/mL) for determination of their 50% inhibitory concentration on the parasites (IC₅₀). The assays were carried out on bone marrow derived macrophages infected with *L. (L.) amazonensis* and results are expressed as the infection index of macrophage cultures, whereas the cytotoxicity tests were performed by the MTT method. Furthermore, secretion of TGF- β , a cytokine implicated in *Leishmania* infection, as well as nitric oxide, were measured in the supernatants from *L. (L.) amazonensis*-infected macrophages treated with the venom fractions. The results showed that all fractions, except convulxin at 25 μ g/mL, exhibited a significant leishmanicidal activity, while there was no viability loss of macrophages in the presence of all fractions until 50 μ g/mL. The crotamine fraction displayed the most effective leishmanicidal effect. There was a decrease of TGF- β concentration in the presence of all fractions tested compared to that observed in control group and any of the fractions led to the secretion of nitric oxide in treated cultures.

The present results showed the significant leishmanicidal activity of all fractions from *Crotalus durissus terrificus* venom on *L. (L.) amazonensis in vitro* with the generation of an inflammatory environment, supporting the potential use of these fractions as an alternative choice for the chemotherapy of cutaneous leishmaniasis.

Key words: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, macrophage, *Crotalus durissus terrificus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Aspectos gerais das leishmanioses.....	16
1.2. Tratamento das leishmanioses.....	17
1.3. Ação do veneno de serpentes sobre <i>Leishmania</i>	19
1.4. A serpente <i>Crotallus durissus</i> e seu veneno.....	19
1.5. Frações do veneno.....	20
1.6. Macrófagos.....	21
1.7. Citocina TGF- β	22
1.8. Óxido nítrico.....	23
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. Veneno crotálico.....	25
3.2. Obtenção das formas amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	25
3.3. Cultivo de macrófagos de medula óssea de camundongos e infecção com amastigotas da <i>L. (L.) amazonensis</i>	25
3.4. Tratamento dos macrófagos infectados com a <i>L. (L.) amazonensis</i> com o veneno crotálico e suas frações.....	26
3.5. Teste de citotoxicidade in vitro.....	27
3.6. Análise da citocina TGF- β presente nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados com <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e tratados com o veneno crotálico.....	27
3.7. Dosagem de óxido nítrico.....	27
3.8. Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Citotoxicidade.....	29
4.2. Determinação da atividade leishmanicida das frações crotálicas sobre macrófagos infectados com a <i>L. (L.) amazonensis</i>	30
4.3. Cálculo do IC-50.....	32
4.4. Porcentagem de inibição do índice de infecção em relação ao controle com as duas concentrações das frações e do veneno bruto.....	33
4.5. Dosagem da citocina TGF- β	34
4.6. Dosagem do óxido nítrico.....	35
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	16
Figura 2: A serpente <i>Crotalus durissus</i>	16
Figura 3: Viabilidade dos macrófagos quando submetidos ao tratamento com o veneno bruto de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e frações crotálicas.....	28
Figura 4: Determinação dos índices de infecção de macrófagos infectados com <i>L.(L.)amazonensis</i> e tratados com as frações crotálicas por 48 horas.....	29
Figura 5: Imagem de macrófagos infectados obtida no microscópio óptico no aumento de 1000x.	30
Figura 6: Porcentagem de inibição do índice de infecção em relação ao grupo controle utilizando as frações crotálicas e o veneno bruto nas concentrações de 25 e 50µg/ml.	32
Figura 7 : Concentração da citocina TGF-β nos sobrenadantes das culturas de macrófagos nos grupos tratados com as frações crotálicas.	33
Figura 8 : Concentração de NO nos sobrenadantes de culturas de macrófagos infectados com <i>L.(L.) amazonensis</i> e tratados com as frações do veneno crotálico.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: IC-50 das frações crotálicas	31
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO- dimetilsulfóxido

IC-50- concentração de fração crotálica capaz de eliminar 50% dos parasitas

I.I. - índice de infecção

IFN- γ - Interferon gama

mM- milimolar

MTT- (3-[4, 5-Dimethylthiazol-2yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue)

nm- nanômetro

PBS- tampão fosfato salina (Phosphate Buffered Saline)

rpm- rotações por minuto

RPMI- Meio de cultura sintético complexo criado pelo Roswell Park Memorial Institute

R 10- meio RPMI suplementado com 10% de soro de cavalo

TGF- β - fator de crescimento transformador

xg - força gravitacional

μ g/mL- microgramas por mililitro

μ M- micromolar

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses compreendem um grupo de parasitoses causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Estima-se que existam atualmente 12 milhões de casos de leishmanioses, com mortalidade anual de aproximadamente 60.000. Segundo a Organização Mundial de Saúde, 350 milhões de pessoas encontram-se sob o risco de adquirir alguma forma de leishmaniose. Anualmente surgem dois milhões de novos casos da doença, sendo as alterações ambientais, como migrações humanas intensas, urbanização e desmatamento, os principais fatores de risco envolvidos na ocorrência desses novos casos (WHO, 2010). A coinfeção *Leishmania*/HIV agrava ainda mais esse quadro, considerando-se o número de pessoas HIV positiva.

O gênero *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e compreende parasitas digenéticos que se desenvolvem alternadamente em hospedeiros vertebrados que podem ser mamíferos ou répteis e insetos vetores. Nos hospedeiros mamíferos, entre eles o homem, os parasitas assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente no interior de células do sistema monocítico fagocitário dentro de um vacúolo parasitóforo. À medida que os amastigotas se multiplicam por divisão binária os macrófagos se rompem liberando os parasitas que são fagocitados por outros macrófagos. Os vetores são insetos dípteros da subfamília Phlebotominae e gênero *Lutzomyia* nas Américas e são denominados genericamente de flebótomos. Nos vetores os parasitas vivem no trato digestivo onde as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em promastigotas, formas alongadas, móveis e flageladas que são regurgitadas durante a picada na pele dos mamíferos, completando o ciclo (Figura 1).

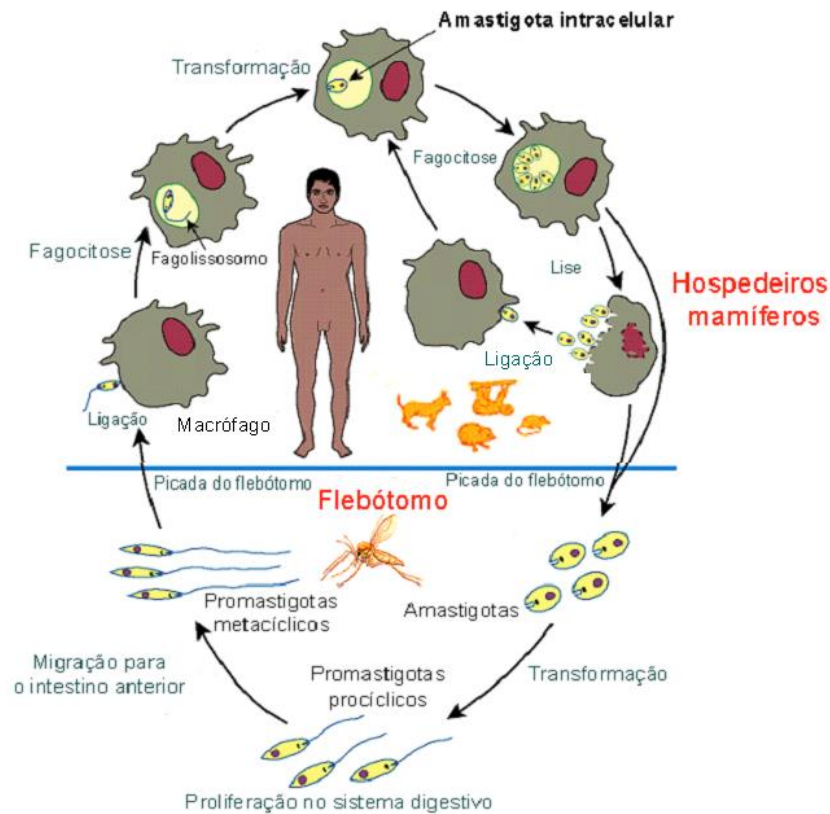


Figura 1: Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Entre os hospedeiros mamíferos, destaca-se o homem e os vários reservatórios das leishmanioses (adaptado de HANDMAN, 2001).

Existem mais de 20 espécies de *Leishmania* capazes de infectar o homem e as várias formas de leishmanioses são: a cutânea caracterizada por lesões fechadas e auto-curáveis; a cutânea difusa que apresenta lesões crônicas e disseminadas (no Brasil ambas são causadas pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis*); a mucocutânea que se caracteriza pela formação de úlceras, no Brasil causada pela *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, e a visceral, também conhecida como calazar, nas Américas causada pela *L. (L.) infantum chagasi*.

1.2. Tratamento das leishmanioses

A droga mais efetiva utilizada para o tratamento das leishmanioses cutânea e visceral é o antimonial pentavalente existente sob duas formas: o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime) e o estibogluconato de sódio (Pentostan), dos quais o mais utilizado no Brasil é o Glucantime. Esses

compostos são utilizados há aproximadamente 60 anos, sendo eficazes em cerca de 80% dos pacientes. Os principais problemas com os antimoniais são a toxicidade, a administração parenteral por mais de 30 dias e o fato de não apresentarem boa atividade em pacientes imunossuprimidos, como é o caso de pacientes coinfectados com o vírus HIV (GAZANION ET AL., 2011; GONÇALVES ET AL., 2005). Nos casos de resistência aos antimoniais, outras drogas como a anfotericina B e a pentamidina são utilizadas como tratamento de segunda linha (GOTO AND LINDOSO, 2010). A anfotericina B é hoje a segunda opção mais adotada no tratamento da leishmaniose visceral (LV) quando não há resposta à terapia com antimonial. Originalmente desenvolvida como um antifúngico sistêmico mostrou uma grande eficiência no combate às leishmanioses, porém deve ser cuidadosamente administrada devido à sua toxicidade (MEYERHOFF, 1999; ROBINSON AND NAHATA, 1999). A pentamidina, uma diamina aromática, tem sido utilizada nos casos de LV resistentes ao tratamento com antimoniais. Entretanto, recentemente a resistência à pentamidina foi também descrita e ela não é rotineiramente utilizada para o tratamento da LV na Índia (BRAY ET AL., 2003; SUNDAR, 2001). A miltefosina, inicialmente desenvolvida como uma droga antitumoral mostrou grande eficácia para o tratamento da LV na Índia e a leishmaniose cutânea na Colômbia (SOTO et al., 2004; SUNDAR et al., 2002), apresentando, porém, teratogenicidade e indução de resistência dos parasitas após um longo tempo de exposição à droga, o que limita muito a sua utilização (CROFT e COOMBS, 2003). A paramomicina é outra droga que se encontra em testes clínicos, estando os ensaios em Fase III na Índia e África Oriental. Ela é efetiva no tratamento da leishmaniose cutânea e visceral, mas apresenta grande variação de sensibilidade dependendo da espécie do parasita (THAKUR, 2000). A sitamaquina, outra droga oral que possui ação contra a LV, é derivada de oito aminoquinolinas e os testes da fase II na Índia demonstraram a sua eficácia contra a LV, porém alguns efeitos colaterais foram observados após a sua administração (JHA et al., 2005).

Nas últimas décadas muita ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para as leishmanioses, incluindo a identificação de compostos para o tratamento tópico da forma cutânea (MIGUEL et al., 2009; REIMÃO et al., 2010; SANTOS et al., 2008; SOTO et al., 1998). Esse tipo de

tratamento pode ser eficaz nos casos da doença não disseminada, oferecendo vantagens tais como a fácil administração, menor custo e a redução de possíveis efeitos colaterais (GONÇALVES et al., 2005).

1.3. Ação do veneno de serpentes sobre *Leishmania*

A ação leishmanicida de venenos de serpentes foi previamente demonstrada como o da atividade *in vitro* do veneno da *Bothrops moojeni* sobre promastigotas de várias espécies de *Leishmania* (TEMPONE et al., 2001). Também foi descrito o efeito inibitório dos venenos de serpentes dos gêneros *Cerastes*, *Vipera* e *Naja* sobre a *L. (L.) infantum* (FERNANDEZ-GOMEZ et al. 1994). A atividade leishmanicida do veneno de *Crotalus durissus* (PASSERO et al. 2007), assim como o de cinco espécies de serpentes da América do Sul sobre a *L. (L.) major* também foi reportada (PEICHOTO et al., 2011). O veneno de *Bungarus caeruleus* apresentou efeito leishmanicida *in vitro* sobre promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) donovani* e *in vivo* em camundongos infectados com esse parasita (BHATTACHARYA et al., 2013). A ação do veneno bruto e de três frações purificadas do veneno de *Bothrops mattogrossensis* sobre os promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi também demonstrada (MOURA et al., 2014).

1.4. A serpente *Crotalus durissus* e seu veneno

Crotalus é um gênero de serpentes da família Viperidae. São terrestres, com bote veloz e alcance de um terço do seu comprimento. São ovovíparas ou ovíparas, possuem cauda com guizo, cabeça triangular, fosseta loreal e presas que inoculam veneno. Tem cor de fundo castanho claro, de tonalidades diferentes, mas se destaca uma linha de manchas losangulares marrons, mais ou menos escuras, marginadas por branco ou amarelo no dorso (Fig. 2). O gênero *Crotalus* está representado no Brasil por uma única espécie, *Crotalus durissus* (nome popular: cascavel), que tem uma ampla distribuição geográfica (CARDOSO, 2003).



Figura 2: A serpente *Crotalus durissus*

É responsável por cerca de 7,7% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil, podendo representar até 30% dos acidentes em algumas regiões. Apresenta o maior coeficiente de letalidade devido à frequência com que os pacientes que sofrem esses acidentes ofídicos evoluem para injúria renal aguda (IRA).

1.5. Frações do veneno

O veneno das cascáveis sul americanas (*Crotalus durissus* ssp) contém muitas proteínas com efeitos biológicos como a giroxina, crotamina, convulxina e a crotoxina. A giroxina foi caracterizada como a principal fração proteolítica. A crotamina é um polipeptídeo de menor peso molecular presente no veneno bruto, este polipeptídeo produz ação analgésica. A convulxina é uma glicoproteína, com efeito, neurotóxico e a crotoxina é considerada a fração mais tóxica do veneno e consiste numa associação entre a crotapotina e a fosfolipase A₂ (PLA₂) (PASSERO et al, 2007).

A crotoxina pode levar à alteração nos canais de sódio da membrana plasmática das células musculares com consequente elevação de níveis de sódio intracelular. A ação miotóxica sistêmica caracteriza-se pela liberação da mioglobina no sangue e sistema linfático aumentando os níveis da creatinofosfoquinase (CPK), desidrogenase láctica (DHL) e aspartato amino transferase (TGP) (SILVEIRA et al, 1992).

As frações responsáveis pela ação tóxica em neurônios são: crotoxina, convulxina e giroxina sendo a primeira de maior poder lesivo. Sua principal

ação é o bloqueio da ação sináptica. As manifestações clínicas mais evidentes são: alterações neuromusculares, convulsões, perturbações respiratórias e circulatórias.

Alterações glomerulares e na ultraestrutura das células dos túbulos proximais e obstrução da luz tubular levam à injúria renal aguda (IRA) por necrose tubular aguda. (CLARK et al, 1997).

A ação da peçonha é multifatorial, sendo dividida em três principais:

1- Ação neurotóxica

Causada principalmente pela fração crotoxina, que atua nas junções pré-sinápticas tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico. Inibe a liberação de acetilcolina, sendo esse o fator de maior participação no bloqueio neuromuscular, causando paralisia motora ou respiratória no paciente. Já as frações convulxina e a giroxina contribuem para o surgimento de convulsões e alterações circulatórias e respiratórias (VITAL et al 1980).

2-Ação miotóxica

Responsável por lesões nas fibras musculares esqueléticas, podendo causar rabdomiólise intensa, com liberação de enzimas e mioglobina para o soro, seguida de excreção urinária desse pigmento. As frações responsáveis por esse efeito são a crotoxina e a crotamina (PINHO et al; 2000).

3-Ação anticoagulante

Em 40% das vítimas ocorrem distúrbios de coagulação (SILVEIRA et al, 1992). Geralmente não há redução do número de plaquetas, ocorre devido à conversão do fibrinogênio diretamente em fibrina. O consumo do fibrinogênio pode levar a uma incoagulabilidade sanguínea completa ou parcial.

1.6. Macrófagos

Estas células desempenham papel central na defesa do hospedeiro, apresentação de antígenos, inflamação e reparo tecidual (NAITO, 1993). Eles constituem uma das primeiras linhas de defesa do hospedeiro e estão presentes em diversos tecidos, sendo a fagocitose o primeiro passo no

processo de defesa. A fagocitose inicia-se com a interação dos receptores de superfície dos fagócitos com os ligantes presentes nos microrganismos que são fagocitados. Durante esse processo, sabe-se que há aumento do consumo de oxigênio pelos macrófagos que leva à formação de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Essas espécies reativas de oxigênio são utilizadas pelos fagócitos para eliminar os microrganismos fagocitados, sendo componentes essenciais do sistema imune inato. Concomitantemente, há a liberação de vários mediadores, desde enzimas hidrolíticas até fatores de crescimento. Todos esses produtos são cruciais para a defesa do hospedeiro uma vez que eliminam o microrganismo, porém podem causar danos nos tecidos adjacentes devido à liberação de mediadores inflamatórios (BABIOR, 1999, 2004; FORMAN E TORRES, 2002; NAITO, 1993).

1.7. Citocina TGF- β

A TGF- β é uma citocina que possui uma potente função imunossupressora que desempenha um papel determinante no estabelecimento da infecção experimental por *Leishmania* (BARRAL et al., 1992). Essa citocina é sintetizada como um precursor biologicamente inativo que após a clivagem transforma-se em sua forma madura ativa.

Tem sido reconhecida atualmente como um importante imunorregulador na leishmaniose murina e o aumento da produção da mesma significa uma maior suscetibilidade à doença.

As infecções por *Leishmania* levam a ativação específica da resposta imunológica por parte do hospedeiro. Há uma expansão de vários tipos de células, que pode ser caracterizada pelo aumento de células T CD4, apresentando um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (REIS et al., 2006). Se a resposta for do tipo Th1, citocinas como IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12 serão produzidas, ativando os macrófagos e, conseqüentemente, levando à destruição dos parasitas. Mas se a resposta for do tipo Th2 serão produzidos IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β , que inibem a ativação macrofágica aumentando a infecção.

1.8. Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais. Atualmente, o NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. Este radical é produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima NO-sintase constitutiva (c-NOS) e induzível (i-NOS). O NO apresenta um papel dúbio, às vezes benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo. Está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo. Constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Possui, ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o NO é potencialmente tóxico, em situações de inflamação. A toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (JAMES, 1995; MONCADA et al, 1991).

A participação do NO na destruição de amastigotas de *Leishmania* é controversa; foi comprovada na infecção por *L.donovani* (Murray e Nathan, 1999) e também na infecção inicial cutânea causada por *L. mexicana*. No entanto, estudos feitos com macrófagos de linhagem tumoral (J-774-G8) e infectados com promastigotas de *L.(L.) amazonensis* indicaram um aumento da citocina TGF- β e uma diminuição na síntese de NO e na atividade da iNOS em culturas ativadas com LPS e infectadas com promastigotas, os autores sugeriram que provavelmente os parasitas possam causar uma modulação negativa na ativação do macrófago e na produção de NO pelo mesmo (PERRELA-BALESTIERI, 2002). Entretanto para espécie utilizada no nosso estudo e com a cultura feita a partir da medula óssea de BALB/c não há evidências na literatura de uma modulação na produção de óxido nítrico.

2. OBJETIVOS

Baseando-se na necessidade de desenvolver novas alternativas para a terapêutica das leishmanioses e nas evidências da literatura sobre a atividade leishmanicida de venenos de serpentes, o objetivo do presente projeto é analisar a ação do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e suas frações sobre os amastigotas da *L. (L.) amazonensis* mantidos em culturas de macrófagos de camundongos BALB/c.

Dentro desse enfoque, os principais parâmetros estudados foram:

- 1) Determinação da concentração do veneno e das frações crotálicas que causa diminuição da viabilidade da célula hospedeira.
- 2) Determinação da concentração do veneno capaz de inibir 50% da proliferação dos amastigotas da *L. (L.) amazonensis* (IC50) em macrófagos infectados.
- 3) Análise da citocina TGF- β presente nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados com a *L. (L.) amazonensis* e tratados com o veneno e suas frações.
- 4) Análise do óxido nítrico nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados com a *L. (L.) amazonensis* e tratados com o veneno e suas frações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Veneno crotálico

Veneno total liofilizado de *Crotalus durissus terrificus* e as frações giroxina, convulxina, crotoxina, crotamina e PLA2 foram doadas liofilizadas pelo professor Dr. Andreimar Soares da FioCruz de Rondônia (mantidos a -5°C) e preparadas em solução estéril em meio RPMI numa concentração de 1mg-mL aliquotadas e mantidas a -70°C.

3.2. Obtenção das formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

A cepa MHOM/BR/1973/M2269 de *L. (L.) amazonensis* utilizada foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Jeffrey J. Shaw do Instituto Evandro Chagas (Belém, PA, Brasil).

As formas amastigotas da *L. (L.) amazonensis* foram isoladas de lesão de pata de hamsters previamente infectados (4×10^7 parasitas nas patas traseiras). As lesões obtidas após 6 a 8 semanas foram retiradas e raspadas com um bisturi, colocadas em PBS e centrifugadas a $1910 \times g$ por 5 minutos. A seguir o precipitado foi ressuspenso em PBS e submetido à homogeneização utilizando um pistilo e a seguir centrifugado a $39 \times g$. O sobrenadante foi recolhido e o número de amastigotas foi avaliado por contagem em câmara de Neubauer. Esses amastigotas foram utilizados para infecção das culturas de macrófagos, foram utilizados por lamínula 1×10^6 amastigotas.

3.3. Cultivo de macrófagos de medula óssea de camundongos e infecção com amastigotas da *L. (L.) amazonensis*

Os macrófagos foram isolados dos fêmures de camundongos BALB/c. Após a dissecação das patas traseiras e isolamento dos ossos, as extremidades dos mesmos foram cortadas, colocando-os em placa de Petri estéril contendo

PBS. Cerca de 2 mL de RPMI 1640 contendo 10% de soro de cavalo previamente inativado a 56°C (R10) foram injetados com seringa no fêmur isolado, pressionando-se o meio no interior do osso para a obtenção de todo o conteúdo da medula. Foi feito um *pool* das células isoladas da medula do qual foi separada uma alíquota de 1 mL e centrifugada a 2140 x g por 5 minutos. O precipitado foi ressuspensão em 1 mL de ACK (cloreto de amônio 155 mM, bicarbonato de potássio 10 mM e EDTA 100 µM), incubado à temperatura ambiente durante 7 minutos e novamente centrifugado a 2140 g por 5 minutos. O precipitado obtido foi então ressuspensão em 1 mL de PBS e após diluição apropriada em cristal violeta (200 µl das células + 50 µl de cristal violeta 1 mg/ml em ácido acético 30%), as células foram contadas em câmara de Neubauer. Foram utilizadas 1×10^6 células por lamínula de 13 mm de diâmetro inseridas em placas de 24 cavidades, utilizando-se por cavidade 500 µl de RPMI 1640 contendo HEPES 15 mM, bicarbonato de sódio 20 mM, L-glutamina 1 mM, soro de cavalo 10% e meio condicionado de células L929 20%. A diferenciação das células em macrófagos ocorre após 3-5 dias, incubando-se as culturas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. Após a diferenciação os macrófagos foram infectados com as formas amastigotas da *L. (L.) amazonensis* na proporção de um macrófago para um amastigota.

3.4. Tratamento dos macrófagos infectados com a *L. (L.) amazonensis* com o veneno crotálico e suas frações

Após 24 horas da infecção dos macrófagos com a *L. (L.) amazonensis* as culturas foram incubadas com o veneno crotálico e suas frações nas concentrações de 5, 10, 15, 25 e 50 µg/mL. Após o término do tratamento as lamínulas foram fixadas durante 10 minutos com metanol e coradas por 10 minutos com o corante Giemsa (Amersham). Após a secagem, as lamínulas foram fixadas com Entellan (Amersham) em lâminas de vidro e visualizadas ao microscópio óptico com aumento de 1.000 vezes. A infecção foi avaliada pelo índice de infecção (IF) que é calculado multiplicando-se a porcentagem de macrófagos infectados pelo número médio de amastigotas por macrófago

infectado, sendo contados no mínimo 200 macrófagos por lamínula em triplicatas para cada concentração do veneno crotálico ou sua fração.

3.5. Teste de citotoxicidade in vitro

A viabilidade dos macrófagos expostos ao veneno foi avaliada pelo método do MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)] segundo o protocolo de Dutta et al., 2005. Após a exposição, as culturas de macrófagos foram incubadas com o MTT 0,5 mg/mL durante 4 horas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Após esse período o meio de cultura contendo o MTT foi retirado, acrescentando-se 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) para a solubilização total do formazan, o produto colorido resultante da clivagem do MTT catalisada pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (sendo essa conversão realizada somente pelas células viáveis) (Mosmann, 1983). Após a solubilização, todo o volume foi transferido para placa de 96 cavidades para a leitura da absorbância a 540 nm em microleitor de ELISA.

3.6. Análise da citocina TGF-β presente nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e tratados com o veneno crotálico

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados e tratados foram retirados e utilizados para a dosagem de TGF-β pelo método de ELISA de captura (kit eBioscience).

3.7. Dosagem de óxido nítrico

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* na presença das frações do veneno foram analisados quanto à produção de nitrito pela reação de Griess (GREEN et al., 1982). As alíquotas de 100µl das amostras e o mesmo volume do Reagente de Griess (Sulfanilamida 1%, N-naphthylediamine 0,1% em 2.5% de H₃PO₄) à

temperatura ambiente por 10 minutos e a leitura é realizada em leitor de Elisa a 540 nm.

3.8. Análise estatística

Para avaliar a significância dos resultados foi feita a análise estatística de todos experimentos pelos testes ANOVA disponíveis no programa GraphPad Prism versão 5.01.

4. RESULTADOS

4.1. Citotoxicidade

A viabilidade das células hospedeiras foi testada pelo método do MTT e representada na Figura 3. A análise do gráfico mostra que nenhuma das frações crotálicas causou efeito citotóxico nas concentrações estudadas. Entretanto, o veneno bruto causou significativo efeito citotóxico nas doses de 40 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mostrando que apesar de o veneno total ter exercido efeito leishmanicida, ele leva à diminuição da viabilidade da célula hospedeira, inviabilizando-o como alternativa de tratamento.

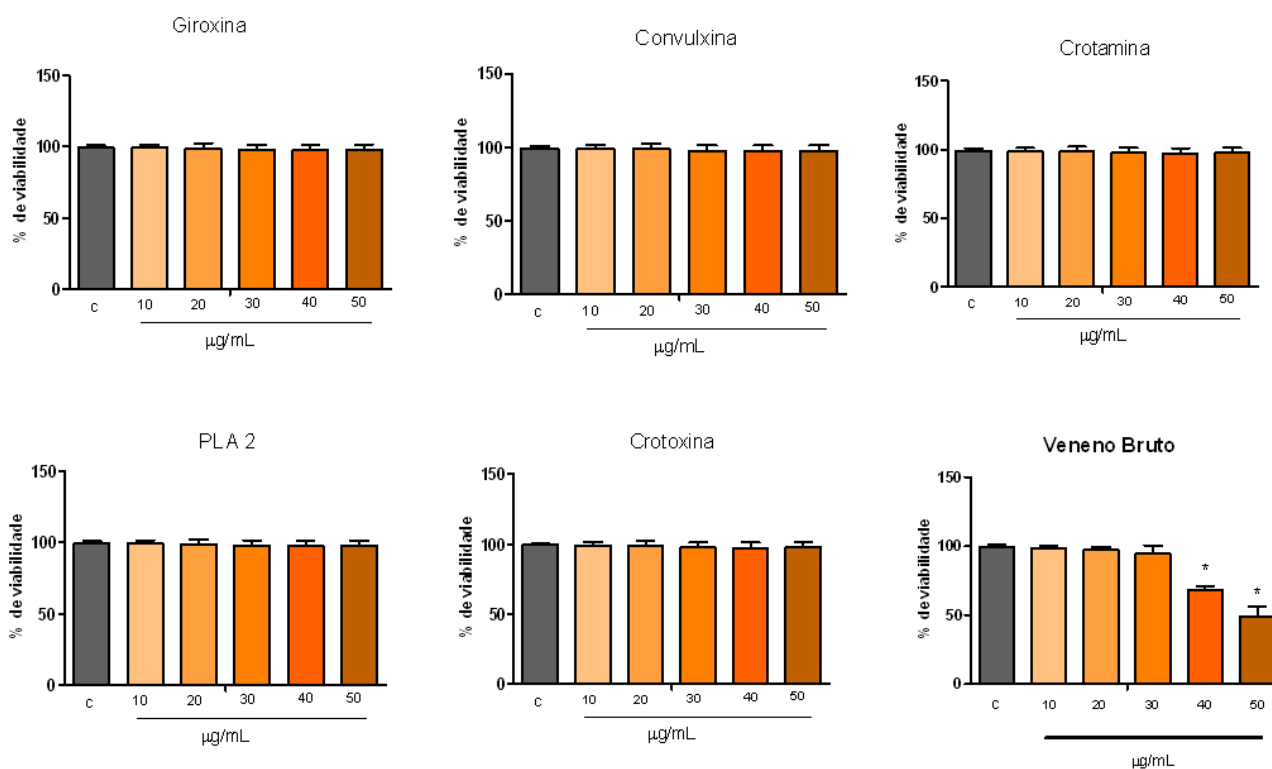


Figura 3: Viabilidade de macrófagos submetidos à ação do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* e suas frações. Os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços. Diferentes concentrações (10, 20, 30, 40 ou 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do veneno bruto ou das frações crotálicas (gioxina, convulxina, crotamina, PLA2 e crotoxina) foram adicionadas aos poços e incubadas por 48 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT. * $p < 0.05$ em relação ao controle.

4.2. Determinação da atividade leishmanicida das frações crotálicas sobre macrófagos infectados com a *L. (L.) amazonensis*

Inicialmente as concentrações de giroxina, convulxina, crotamina, crotoxina e PLA₂ com atividade leishmanicida foram testadas com base na literatura (Passero et al, 2007; Passero et al, 2008 e Bhattacharya et al, 2013) e em dados prévios do nosso laboratório. Concluiu-se que as melhores concentrações que apresentaram ação sobre os amastigotas intracelulares estavam na faixa de 25 e 50 µg/mL.

Observa-se na figura 4 uma diminuição significativa no índice de infecção em todas as frações, exceto na fração convulxina na concentração de 25 µg/mL. A fração crotamina teve a ação leishmanicida mais eficaz tanto na concentração de 25 como na de 50 µg/mL.

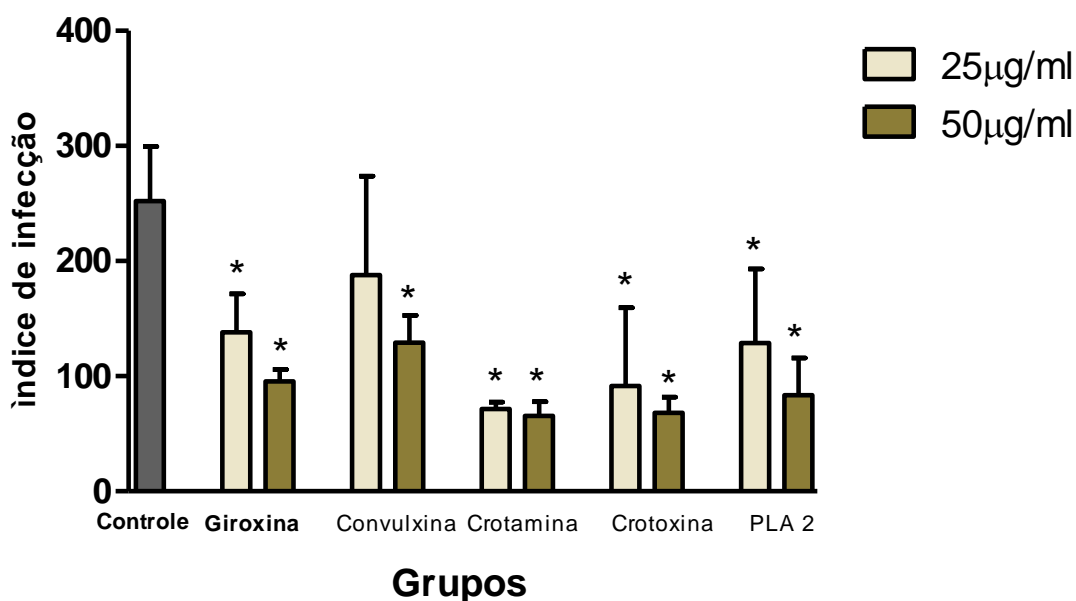


Figura 4: Determinação dos índices de infecção de macrófagos infectados com *L.(L.) amazonensis* e tratados com as frações crotálicas. As culturas de macrófagos extraídos da medula óssea de camundongos BALB/c foram infectadas na proporção de 1:1 (macrófago: amastigota de *L. (L.) amazonensis*). Após 24 h da infecção, os macrófagos foram incubados com o veneno ou as frações por 48 horas. * $P < 0.05$ em relação ao controle.

A figura 5 ilustra o que é observado no microscópio óptico no aumento de 1000x, exemplificando com a fração crotamina na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Verifica-se que a cultura tratada (B) apresenta uma menor proporção, em relação ao controle (A), de macrófagos infectados.

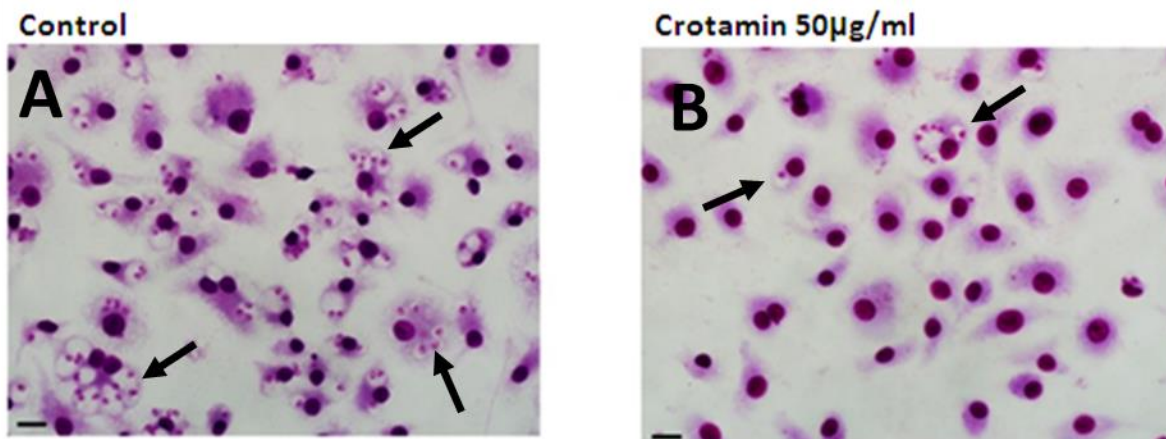


Figura 5: Fotomicrografia de macrófagos incubados com a fração crotamina. Os macrófagos foram plaqueados em placas de 96 poços e colocadas para aderir. A fração crotamina foi adicionada (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas por 48 horas. A seguir a placa foi fotografada em microscópio óptico. (A) controle; (B) Crotamina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Macrófagos infectados (setas) aumento de 100x.. Escala: 10 μm

4.3. Cálculo do IC-50

Para o cálculo do número do IC-50 foi utilizado o programa GraphPad Prisma 5.0, onde o Log da concentração das frações crotálicas fica no eixo das abscissas e a porcentagem de morte dos parasitas no eixo das ordenadas. O IC-50 (representado no programa Prisma pela sigla ECF) é a concentração da fração crotálica que consegue eliminar 50% dos amastigotas de *L.(L.) amazonensis*.

Na tabela 1 verifica-se que o IC-50 da fração crotamina foi de 25,65 µg/mL (menor IC-50) e a fração convulxina (52,7 µg/mL) apresentou o maior IC-50, denotando a menor eficiência leishmanicida.

Tabela 1: IC-50 das frações crotálicas

Frações do veneno crotálico	IC 50 (µg/mL)
Convulxina	52,7
Crotamina	25,65
Crotoxina	28,15
Giroxina	31,35
PLA ₂	29,90

4.4. Porcentagem de inibição do índice de infecção em relação ao controle com as duas concentrações das frações e do veneno bruto

Foi calculada a porcentagem de inibição do índice de infecção em relação ao grupo controle considerando as duas concentrações das frações e também do veneno bruto utilizadas no experimento. Observa-se na figura 6 a eficácia das frações giroxina, crotamina, e crotoxina na concentração de 25 µg/mL e as frações crotoxina, convulxina e crotamina foram mais eficientes na concentração de 50 µg/mL. O veneno bruto foi parcialmente eficaz.

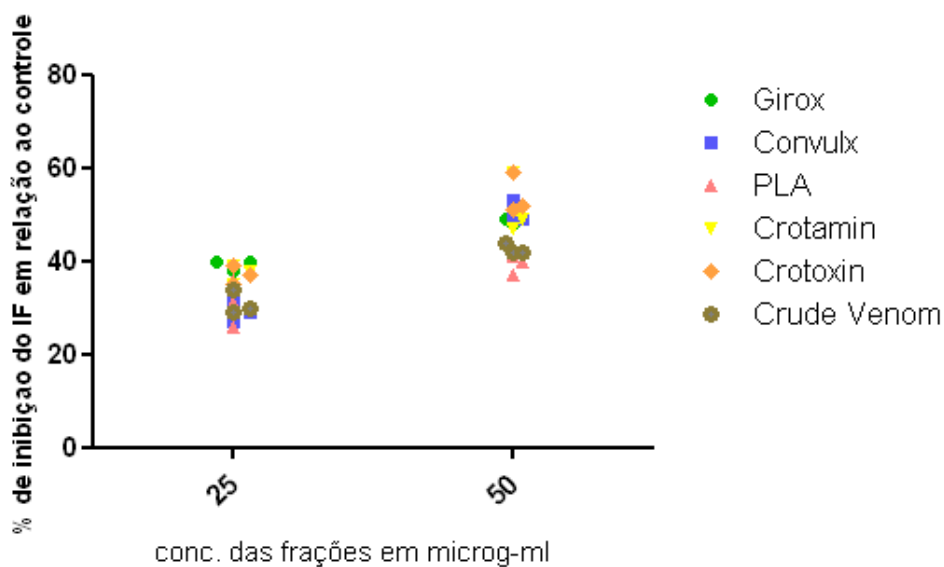


Figura 6: Porcentagem de inibição do índice de infecção de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com o veneno de *C. d. terrificus* ou suas frações. A porcentagem de inibição do índice de infecção foi realizada utilizando o veneno bruto e as frações crotálicas nas concentrações de 25 e 50 µg/mL em relação ao grupo controle.

4.5. Dosagem da citocina TGF- β

Ao analisar a figura 7 verifica-se uma diminuição significativa do TGF- β ativo das frações crotálicas nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ em relação controle. Apenas a fração crotoxina na menor concentração não se mostrou efetiva, as frações crotamina e convulxina na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ obtiveram maior diminuição do TGF ativo em relação ao grupo controle.

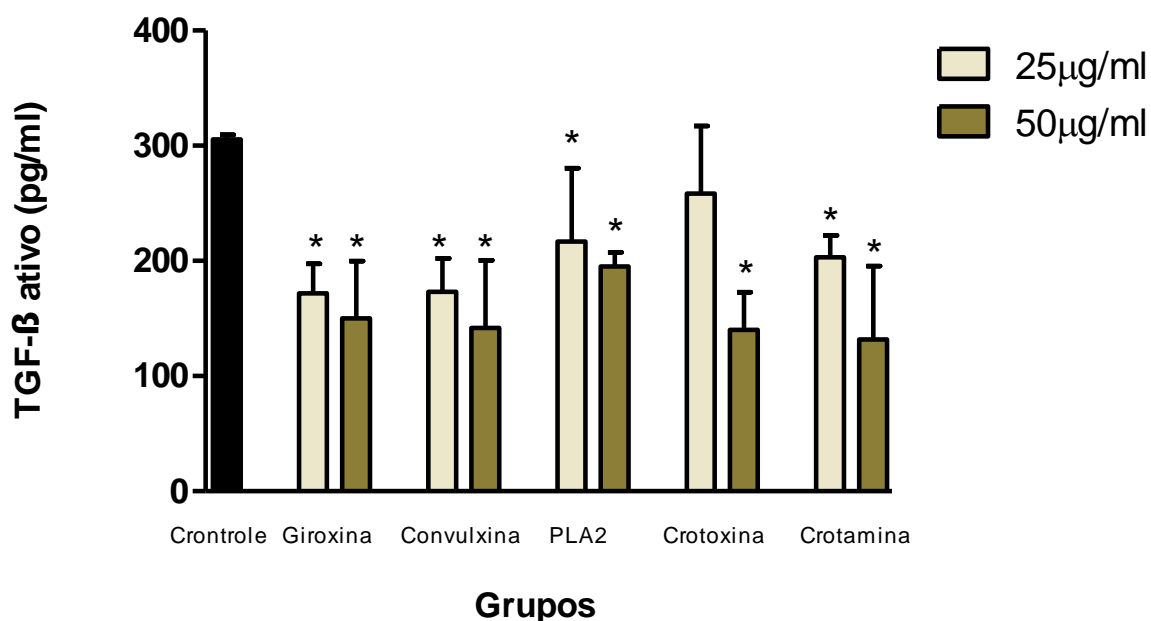


Figura 7: Determinação dos níveis de TGF- β em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com as frações. A dosagem da citocina TGF- β foi feita pelo método de Elisa de captura nos sobredanantes das culturas de macrófagos infectadas com *L.(L.) amazonensis* e tratadas com as frações crotálicas. * $p < 0.05$ em relação ao controle.

4.6. Dosagem do óxido nítrico

Para avaliar uma possível atividade imunomoduladora das frações crotálicas sobre os macrófagos infectados mensurou-se o nível de óxido nítrico presente nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados e tratados com as frações.

Na figura 8 está demonstrado o resultado para produção de NO em sobrenadantes destas culturas infectadas e tratadas com as duas concentrações de frações crotálicas (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$). Não foi observada uma indução na produção de NO nas culturas tratadas em relação aos controles com nenhuma das frações estudadas.

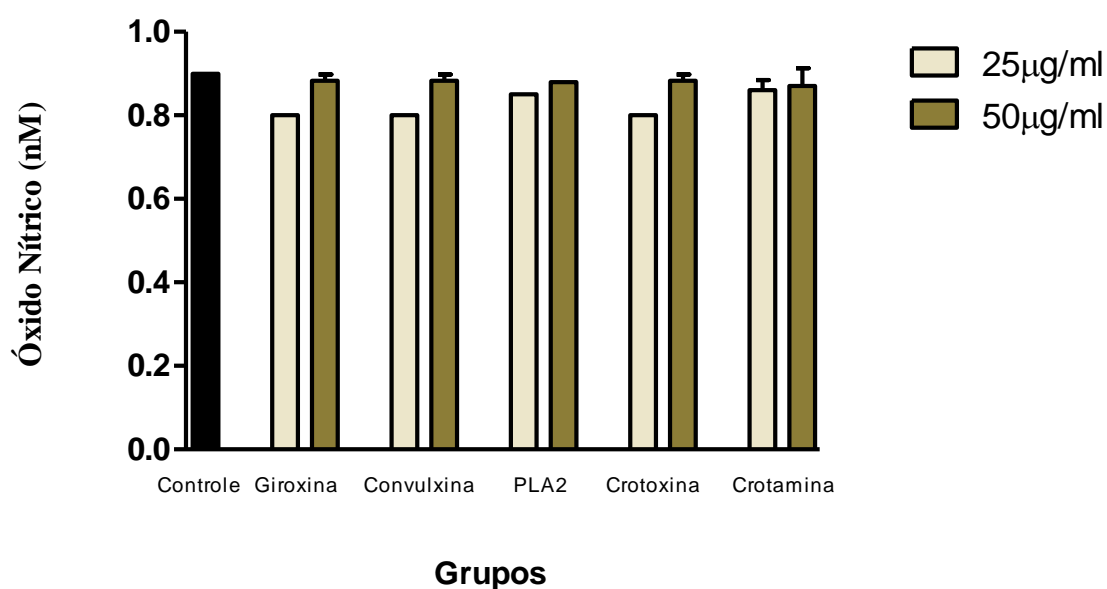


Figura 8: Determinação dos níveis de NO em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com as frações. A dosagem do óxido nítrico foi feita pelo método de Griess no sobrenadante das culturas de macrófagos infectadas com *L. (L.) amazonensis* e tratadas com as frações crotálicas (giroxina, convulxina, PLA, crotoxina e crotamina) por 48 horas. * $p < 0.05$ em relação ao controle.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a capacidade inibitória do veneno de *C. d. terrificus* e suas frações sobre a proliferação das formas amastigotas intracelulares da *L. (L.) amazonensis* em macrófagos primários murinos.

Inicialmente foi testado o veneno bruto da *C. d. terrificus*, verificando-se que ele resultou na destruição significativa dos amastigotas intracelulares da *L. (L.) amazonensis*. Entretanto, nos testes de viabilidade dos macrófagos, foi demonstrado que o veneno bruto destruiu 40% dos macrófagos, inviabilizando a sua utilização como composto leishmanicida. Por outro lado, foi observado que nenhuma das frações crotálicas utilizadas nesse estudo causou efeito citotóxico nos macrófagos de medula óssea dos camundongos BALB/c. Resultado semelhante foi observado por Passero et al (2008) estudando a citotoxicidade de macrófagos peritoneais na presença da fração PLA2 de outra espécie de serpente do gênero *Crotalus* (*C. d. collilineatus*). Uma vez observado que as frações crotálicas não causaram diminuição da viabilidade dos macrófagos avaliamos se as mesmas seriam capazes de inibir a multiplicação da forma amastigota no interior dos macrófagos. Os resultados demonstraram um significativo decréscimo do índice de infecção dos macrófagos infectados com amastigotas da *L. (L.) amazonensis* tratados com as frações giroxina, convulxina, crotamina, crotoxina e PLA2. Em estudo realizado por Passero et al (2007) foi avaliado o efeito do veneno bruto das serpentes *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella* e *C. d. collilineatus* quanto à ação leishmanicida, tendo sido observado que o veneno da *C. d. terrificus* foi o que exerceu o maior efeito sobre as formas promastigotas da *L. (L.) amazonensis* (IC-50 de 4,7 µg/mL). Nesse mesmo estudo foram utilizadas as frações giroxina e crotamina isoladas da *C. d. cascavella*, sendo que ambas diminuíram significativamente a sobrevivência das formas promastigotas, não diminuindo a viabilidade celular. No entanto, o teste de citotoxicidade foi realizado em células de linhagem tumoral (J-774) na qual a padronização da infecção é imprecisa devido à divisão dessas células concomitantemente à proliferação dos amastigotas de *Leishmania*.

Em estudo feito por Tempone et al (2001) foi demonstrado que o veneno bruto de *Bothrops moojeni* tem ação sobre promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) panamensis* tendo sido constatada que a atividade leishmanicida é dependente da enzima L-amino oxidase presente em apenas 1,5% do veneno bruto, entretanto não houve efeito sobre as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Uma vez demonstrada a ação leishmanicida das várias frações crotálicas, foi dosada a secreção do TGF- β no sobrenadante dos macrófagos infectados e tratados. Os resultados mostraram a diminuição significativa dos níveis dessa citocina em relação aos controles nas culturas tratadas com todas as frações avaliadas. O TGF- β é uma potente citocina imunossupressora que desempenha importante papel no estabelecimento da infecção por *Leishmania*. Ele atua suprimindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, levando ao desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th2 e à exacerbação da doença nos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* (Barral-Netto et al., 1992). Culturas de macrófagos humanos e de camundongos infectadas com esse parasita e tratadas com TGF- β recombinante apresentam aumento da replicação dos amastigotas no interior dessas células. Da mesma maneira, a administração de TGF- β exógeno *in vivo* promove a exacerbação da infecção pela *L. (L.) amazonensis*, tendo este um importante papel na modulação da resposta imune tanto no homem como em camundongos e sendo provavelmente o seu aumento um importante mecanismo de escape do parasita (Barral-Netto et al; 1992). Bhattacharya et al (2013) demonstraram *in vivo* a diminuição do TGF- β em macrófagos do baço infectados com *Leishmania (Leishmania) donovani* e tratadas com o veneno bruto de *Bungarus caeruleus*. A diminuição dos níveis do TGF- β dos macrófagos infectados após o tratamento com as frações crotálicas indicam o predomínio de um ambiente inflamatório após a destruição da *L. (L.) amazonensis*.

A possibilidade de as frações crotálicas exercerem efeito ativador sobre os macrófagos infectados e tratados foi avaliada pela dosagem de óxido nítrico (NO) no sobrenadante dessas culturas. Nossos resultados mostraram que não houve produção de NO nos macrófagos tratados. Várias evidências da literatura mostram que o controle do crescimento intracelular de muitas espécies de *Leishmania* em macrófagos ativados depende da ação do NO

sintetizado a partir da L-arginina pela ação da NO-sintase (INOS), sendo essa produção ativada principalmente por INF- γ e TNF- α (Liew e O'Donnel, 1993). A produção do NO e a concomitante destruição dos amastigotas intracelulares foi demonstrada em macrófagos infectados com *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani* e ativados (Liew and Millott, 1990; Murray, 1990). Por outro lado, resultados prévios do nosso laboratório demonstraram a resistência da *L. (L.) amazonensis* à ação do NO em macrófagos ativados com TNF- α e LPS em comparação à suscetibilidade da *L. (L.) chagasi* (Carmo et al, 2010), corroborando os resultados do presente estudo de que mesmo em ausência do NO houve destruição efetiva dos amastigotas da *L. (L.) amazonensis* na presença das frações crotálicas e indicando que o mecanismo leishmanicida de ação dessas frações não se deve à ativação do macrófago.

Os achados do presente trabalho abrem várias perspectivas para a continuidade do estudo da ação leishmanicida das frações crotálicas, por exemplo, a extensão do tratamento *in vivo*, a exploração dos possíveis mecanismos de ação dessas frações na destruição da *L. (L.) amazonensis* e os ensaios contra outras espécies de *Leishmania*, com ênfase na *L. (L.) infantum chagasi*, importante agente da leishmaniose visceral.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* levou à diminuição da viabilidade dos macrófagos nas concentrações de 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$.
- ✓ As frações crotálicas utilizadas não foram citotóxicas para o macrófago em nenhuma das concentrações estudadas.
- ✓ Todas as frações crotálicas apresentaram atividade leishmanicida à concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$.
- ✓ A fração crotamina foi a que apresentou o menor IC50 (25,65 $\mu\text{g/mL}$).
- ✓ Todas as frações crotálicas resultaram no decréscimo dos níveis de TGF- β secretado.
- ✓ O tratamento com as frações crotálicas não induziu a liberação de NO pelos macrófagos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABIOR, BM (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464-1476.

BHATTACHARYA, S.,GHOSH,P.,GOMES,A.,GOMES, A., DUNGDUNG,S.R., (2013) *In vivo* and *In vitro* antileishmanial activity of *Bungarus caeruleus* snake venom through alteration of immunomodulatory activity, *Experimental Parasitology* p 126-133

BARRAL-NETO M, BARRAL A, BROWNELL CE, SKEIKY YA, ELLINGSWORTH LR, et al (1992), Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism, *Science* 257: 542-548

BORGES, A., SILVA, S., VELASCO, E., ALVAREZ,M., ALFONZO,M.M., SOUSA,L.D., DELGADO,O.,(2006) ,*In vitro* leishmanicidal activity of *Tityus discrepans* scorpion venom, *Parasitol, Res* 99, 399-410.

BRAY, PG, BARRET, MP, WARD, AS, KONING, HP.(2003). Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol.*19: 232-239.

CARDOSO, JLC, et al. (2003). *Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier.

CLARK, RF, WILLIAMS, SR, NORDT, SP, BOYER-HASSEN, LV,(1997) Successful treatment of crotalid-induced neurotoxicity with a new polyspecific crotalid Fab antivenom. *Ann Emerg Med*, 1997 Jul; 30 (1): 54-7

CARMO, EVS, KATZ S, BARBIÉRI CL (2010) Neutrophils Reduce the Parasite Burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-Infected Macrophages. *PLoS ONE* 5(11): e13815. doi:10.1371/journal.pone.0013815

CROFT SL, COOMBS GH (2003). Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 19: 502-508.

DIAZ,N.L et al (2003). Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis, *Clin. Exp.Dermatol*, v-28, p-288-93.

DUTTA, A, BANDYOPADHYAY, S, MANDAL, C, CHATTERJEE, M. (2005). Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitol. Int.* 54: 119-122.

FERNANDEZ-GOMEZ, R., HALIM, Z., SEBTI, F., LOYENS, M., BENSLIMANE, A., OUAISSI, M.A.,(1994), Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasites, *Toxicon* 32 ,875-882.

FORMAN, HJ, TORRES, M (2000). Reactive oxygen species and cell signaling: Respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 166, S4-S8.

GAZANION E, VERGNES B, SEVENO M, GARCIA D, OURY B, et al. (2011). *In vitro* activity of nicotinamide/antileishmanial drug combinations. *Parasitol Int* 60: 19-24.

GONÇALVES GS, FERNANDES AP, SOUZA RC, CARDOSO JE, DE OLIVEIRA-SILVA F, et al. (2005). Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Trop* 93: 161-167.

GOTO H, LINDOSO JA (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 419-433.

GREEN, L.C; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J; SKIPPER, P.L. and TANNENBAUM, S.R.(1982) Analysis of nitrate, nitrite in biological fluids, Analytical Biochemistry, v.126, p 131-138.

HANDMAN E (2001). Leishmaniasis: current status of vaccine development. Clin Microbiol Review 14: 229-243.

HOMSI-BRANDERBURGO, MI, QUEIROZ, LS, SANTO-NETO, H, RODRIGUES-SIMIONI, L, GIGLIO, JR (1988). Fractionation of Bothrops jararacussu snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. Toxicon. 26(7): 615-27.

JAMES, S.L. (1995). Role of nitric oxide in parasitic infections. Microbiol. Rev, 59(4): 533-47

JHA, TK, SUNDAR, S, THAKUR, CP, FELTON, JM, SABIN, AJ, HORTON, J. (2005). A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. Am. J. Trop. Med. Hyg. 73: 1005-1011.

LIEW, FY, O'DONNELL, CA (1993) Immunology of leishmaniasis, Adv. Parasitolol., v32, p 161-259.

LIEW FY, LI Y, MILLOTT S (1990) Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. J Immunol 145: 4306-4310.

MEYERHOFF A (1999). U. S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. Clin Infect Dis 28: 42-51.

MIGUEL DC, ZAULI-NASCIMENTO RC, YOKOYAMA-YASUNAKA JK, KATZ S, BARBIÉRI CL, ULIANA SR (2009). Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. J Antimicrob Chemother 63: 365-368.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2010). Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª Edição.

MONCADA, S et al. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol. Reviews, 43(2): 109-42.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65: 55-63.

MOURA, A.A, KAYANO, A.M, OLIVEIRA, G.A, SETUBAL, S.S, RIBEIRO, J.G, CALDERON, L.A (2014). Purification and Biochemical Characterization of Three Myotoxins from *Bothrops* Snake Venom with Toxicity against *Leishmania* and Tumor Cells, biomed Research Internacional, volume 2014, article ID 195356.

MURRAY, HW (1982) Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. J Immunol 129: 351–357.

MURRAY,HW, NATHAN, CF (1999) Macrophage microbicidal mechanisms in vivo, reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral L.donovani, J. Exp. Med, v-189, p 741-6

NAITO, M (1993). Macrophage heterogeneity in development and differentiation. Arch Histl Cytol. 56, 331-351.

NUNES, D.C.O., FIGUEIRA, M.N.R., LOPES, D.S., SOUZA, D.L.N., IZIDORO, L.F.M., FERRO, E.A.V., RODRIGUES, V.M., YONEYAMA, K.A.G.(2013) BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Parasitology*, 140, 844-854.

PASSERO, L.F.D., TOMOKANE, T.Y., CORBETT, C.E.P., LAURENTI, M.D., TOYAMA, M.H.(2007), Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. Venoms, *Parasitol Res* 101: 1365-1371.

PASSERO, LFD, LAURENTI, MD, TOMOKANE TY, CORBETT CE, TOYAMA MH,(2008) The effect os phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection, *Parasitol Res* 102: 1025-1033.

PEICHOTO, M.E, TAVARES, F.L., DEKREY, G., MASKESSY, S.P., (2011), A comparative study of the effects of venoms from five rear-fanged snake species on the growth of *Leishmania major* : identification of a protein with inhibitory activity against the parasite, *Toxicon* 58, 28-34.

PERRELA-BALESTIERIF.M., QUEIROZ, A.R.P.,SCAVONE,C.,BARRAL-NETO, M, ABRAHAMSOHN, I.A.,(2002), *Leishmania(L.) amazonensis*- induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages, *Microbes and Infection*, V 4, 23-29.

PINHO, F.O.;VIDAL, E.C. E BURDMANN, E.A.,(2007) Atualização em Insuficiência Renal Aguda: Insuficiência renal aguda após acidente crotálico, *J. Bras. Nefrologia*, 22 (3), 162- 168.

REIMÃO JQ, TANIWAKI NN, TEMPONE AG (2010). Furazolidone is a selective *in vitro* candidate against *Leishmania (L.) chagasi*: an ultrastructural study. *Parasitol Res* 106: 1465-1469.

REIS, L.C., et al , (2006) ,Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana, Revista de Patologia Tropical, São Paulo, v-35, p103-105.

ROBINSON RF, NAHATA MC (1999). A comparative review of conventional and lipid formulations of amphotericin B. J Clin Pharm Ther 24: 249-257.

SANTOS DO, COUTINHO CE, MADEIRA MF, BOTTINO CG, VIEIRA RT, ET AL. (2008). Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. Parasitol Res 103: 1-10.

SANCHEZ, EF, FREITAS, TV, FERREIRA-ALVEZ, DL, VELAVERDE, DT, DINIZ, MT, CORDEIRO, MN, AGOSTINI-COTTA, G (1992). Biological activities of venoms from South American snakes. Toxicon. 30(1):95-103.

SETUBAL,S.S., PONTES,A. S.,FURTADO,J L, XAVIER,C V,SILVA, KAYANO A M , IZIDORO, LFM, SOARES, AM, CALDERON ,LA,STABELI, RG AND ZULIANI JP (2013). Action of Two Phospholipases A₂ Purified from Bothrops alternates Snake Venom on Macrophages,Biochemistry, Vol 78, 264-275.

SILVEIRA, PVP, NISHEOKA AS,(1992) South America rattlesnake bite in brazilian teaching hospital. Clinical and epidemiological study of 87 cases, with analysis of factors of renal failure. Trans R Trop Med Hyg 1992; 86: 562-4.

STÄGER, S, AND RAFATI, S. (2012). CD8⁺ T cells in *Leishmania* infections: friends or foes? Front Immunol 3: 5.Epub 2012 Jan 24.

SOTO, J, ARANA, BA, TOLEDO, J, RIZZO, N, VEJA, JC ET AL. (2004). Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. Clin Infect Dis 38: 1266-1272.

SUNDAR S. (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. Trop. Med. Int. Health 6: 849-854.

SUNDAR, S, JHA, TK, THAKUR, CP, ENGEL, J, SINDERMAN, H, ET AL. (2002). Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med.* 347: 1739-1746.

TEMPONE, A.G., ANDRADE, H.F., SPENCER, P.J., LOURENÇO, C.O., ROGERO, J.R., NASCIMENTO, N.,(2001) *Bothrops moojeni* Venom kills *Leishmania* spp. With Hydrogen Peroxide Generated by its I-Amino Acid Oxidase, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280, 620-624.

THAKUR, CP, KANYOK, TP, PANDEY, AK, SINHA, GP, ZANIEWSKI, AE, HOULIHAN, HH, AND OLLIARO, P A. (2000). Prospective randomized, comparative, open-label trial of the safety and efficacy of paromomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94: 429-431.

TONELLO, F, SIMONATO, M, AITA, A, PIZZO, P, FERNÁNDEZ, J, LOMONTE, B, GUTIÉRREZ, JM, MONTECUCCO C (2012). A Lys49-PLA₂ myotoxin of *Bothrops asper* triggers a rapid death of macrophage that involves autocrine purinergic receptor signaling. *Cell Death and Disease* 3: e343.

VITAL, B.O., *Venenos Ofídicos Neurotóxicos*, *Ass. Med. Bras.*, 26: 212-8, 1980

WHO (2010) Control of leishmaniasis. Report of the Expert Committee. World Health Organization. *Tech Rep Ser* 949: 1-186.

ZULIANI, JP, GUTIÉRREZ, JM, CASAS E SILVA, LL, SAMPAIO, SC, LOMONTE, B, TEIXEIRA, CFP (2005). Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A₂. *Toxicon* 46: 523-32.