

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia

Diogo Garcia Valadares

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO VENENO DE *TITYUS SERRULATUS* E
TRATAMENTO IN VITRO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS**

Outubro de 2009
Belo Horizonte

Diogo Garcia Valadares

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO VENENO DE *TITYUS SERRULATUS* E
TRATAMENTO IN VITRO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia, do Departamento de Bioquímica e Imunologia Do Instituto de Ciências Biológicas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Carlos Chávez Olórtegui

Coorientador: Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Belo Horizonte

2009

043 Valadares, Diogo Garcia.
Atividade leishmanicida do veneno de *tityus serrulatus* e tratamento in vitro de macrófagos infectados [manuscrito] / Diogo Garcia Valadares. – 2009.
90 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Chávez Olórtgui. Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Venenos de Escorpião. 3. Leishmania. 4. Macrófagos. 5. Doenças Parasitárias. I. Olórtgui, Carlos Chávez. II. Coelho, Eduardo Antonio Ferraz. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais -
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
 31270-901 - Belo Horizonte - MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE DIOGO GARCIA VALADARES. Aos quinze dias do mês de outubro de 2009 às 9:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “*Atividade leishmanicida do veneno de Tityus serrulatus e tratamento in vitro de macrófagos infectados*” requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão Prof. Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho, co-orientador, do Colégio Técnico da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui, orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo tratar o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 15 de outubro de 2009.

Applacede
 Profa. Andréa Mara Macedo
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em
 Bioquímica e Imunologia
 Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Adriano Monteiro de Castro Pimenta
 Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta – UFMG

Carlos Alberto Pereira Tavares
 Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares - UFMG

Eduardo Antonio Ferraz Coelho
 Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho – Co-orientador - COLTEC - UFMG

Carlos Delfin Chavez Olortegui
 Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui – Orientador - UFMG

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Chávez pelo acolhimento em sua segunda casa, pela paciência com a orientação, pelos conselhos, muitas vezes de pai, e pela liberdade que sempre me proporcionou.

Ao professor Dr. Eduardo Coelho pela confiança, constante estímulo, mas também pela amizade e companheirismo que se firmou ao longo desse trabalho.

A minha família, que sempre acreditou em mim, mesmo desconhecendo partes experimentais, e me apoiaram na realização do Mestrado.

Aos Colegas de Laboratório, pelas idéias, cumplicidades e apoio.

A todos os Professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia pelos esclarecimentos e ensinamentos.

Ao todos os Colaboradores do Laboratório de Imunoquímica, em principalmente à equipe do Laboratório da prof. Patiu (em especial à Jarina, Luciana e Nati), do Laboratório da prof. Elizete Rizzo (em especial à Paula e ao Roberto), do Laboratório do prof. Alfredo (em especial à Cíntia, Alessandra e Bete), do Laboratório da prof. Sílvia Guatimosin (em especial ao Enéas) e do Laboratório da prof. Santuza Teixeira.

Ao pesquisador e amigo Jamil.

Ao Centro de Biomoléculas.

Aos meus Amigos de Abaeté.

A todos os meus Amigos.

E a todos os não citados, mas que de alguma forma contribuíram não só para realização desse trabalho, mas para meu desenvolvimento pessoal.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. O tratamento das leishmanioses é limitado por fatores como toxicidade, efeitos colaterais e custo. O veneno de escorpião *Tityus serrulatus* é um composto complexo que contém uma variedade de proteínas, peptídeos e outros compostos bioativos. Estudos anteriores mostraram que o veneno de *T. serrulatus* tem atividade antimicrobiana contra uma variedade de bactérias, fungos e protozoários. Neste estudo, avaliamos a atividade leishmanicida do veneno total de *T. serrulatus* contra três espécies de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*. Os resultados mostraram que o veneno total de *T. serrulatus* foi eficaz na morte de todas as três espécies de *Leishmania*, tanto nas formas promastigotas em fase estacionária de crescimento quanto nas formas like-amastigotas. Além disso, o veneno total de *T. serrulatus* foi capaz de reduzir a adesão de *Leishmania* em macrófagos peritoniais, o que também pode contribuir para o seu efeito leishmanicida. Para investigar os mecanismos de ação do veneno de *T. serrulatus*, realizamos uma purificação do veneno e analisamos as suas frações. Os resultados mostraram que a fração FG50 foi a mais ativa contra *Leishmania*, e que ela induziu a ativação de macrófagos via expressão da enzima iNOS. A ativação de macrófagos é um processo importante na defesa contra infecções parasitárias, e a sua indução pela fração FG50 pode contribuir para o seu efeito leishmanicida. Os resultados deste estudo sugerem que o veneno de *T. serrulatus* é uma nova e promissora terapia para as leishmanioses.

Palavras chaves: *Tityus serrulatus*, veneno, atividade leishmanicida.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of infectious diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The treatment of leishmaniasis is limited by factors such as toxicity, side effects and cost. *Tityus serrulatus* scorpion venom is a complex compound that contains a variety of proteins, peptides and other bioactive compounds. Previous studies have shown that *T. serrulatus* venom has antimicrobial activity against a variety of bacteria, fungi and protozoa. In this study, we evaluated the leishmanicidal activity of the total venom of *T. serrulatus* against three species of *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. chagasi* and *L. major*. The results showed that the total venom of *T. serrulatus* was effective in killing all three species of *Leishmania*, both in the promastigote forms in the stationary growth phase and in the amastigote-like forms. Furthermore, the total venom of *T. serrulatus* was able to reduce *Leishmania* adhesion in peritoneal macrophages, which may also contribute to its leishmanicidal effect. To investigate the mechanisms of action of *T. serrulatus* venom, we purified the venom and analyzed its fractions. The results showed that the FG50 fraction was the most active against *Leishmania*, and that it induced the activation of macrophages via expression of the iNOS enzyme. Macrophage activation is an important process in the defense against parasitic infections, and its induction by the FG50 fraction may contribute to its leishmanicidal effect. The results of this study suggest that *T. serrulatus* venom is a promising new therapy for leishmaniasis.

Key words: *Tityus serrulatus*, venom, leishmanicidal activity.

Lista de Figuras	Página
1 - Estrutura corporal de um escorpião	2
2 - Escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	3
3 - Árvore Filogenética de toxinas escorpiônicas	8
4 - Ultraestrutura de Parasitas	10
5 - Distribuição no velho mundo e novo mundo de leishmanioses cutânea e visceral	11
6 - Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp. causando Leishmaniose	13
7 - Atividade Leishmanicida de VTs em promastigotas	29
8 - Conversão <i>in vitro</i> de Promastigotas em Amastigotas	31
9 - : Atividade Leishmanicidade de VTs em Amastigotas	33
10 - Alteração da Morfologia de Promastigotas Tratadas	35
11 - Redução da capacidade infecciosa de promastigotas tratados com VTs	37
12 - Redução da capacidade infecciosa de amastigotas tratadas com VTs	39
13 - Purificação de 80 mg de veneno de <i>T. serrulatus</i> em Sephadex G50	41
14 - Espectro de Massas por MALDI-TOF da fração correspondente a F2	42
15 - Espectro de Massas por MALDI-TOF da fração correspondente a F4	43
16 - Atividade leishmanicidade de Frações purificadas por Sephadex G50 do veneno de <i>T. serrulatus</i>	45
17 - Citotoxicidade em macrófagos de Frações purificadas de VTs por Sephadex G50	46
18 - Avaliação da ativação de macrófagos tratados com FG50	48
19 - Avaliação da ativação de macrófagos tratados com F4	50
20 - Marcação com Laranja de Acridina de Macrófagos infectados	54
21 - Marcação com Laranja de Acridina de Macrófagos infectados tratados com FG50	55

22 - Marcação com Laranja de Acridina de Macrófagos infectados tratados com Amphotericina B	56
23 - Marcação com Laranja de Acridina de Macrófagos tratados, ou não, com FG50 ou Amphotericina B	57

Lista de Tabelas**Página**

1 - Manifestações clínicas mais freqüentes nos acidentes escorpiónicos	4
2 - Diferentes tipos de drogas usadas no tratamento de Leishmanioses	15
3 - Porcentagem de Morte de promastigotas tratadas 1 hora com VTs	29
4 - Variação na atividade metabólica de Leishmania sp. Promastigota e Amastigota	32
5 - Porcentagem de morte de Amastigotas tratadas 1 hora com VTs	33
6 - Concentrações efetivas 50% de Leishmania sp. tratadas com VTs	34
7 - Porcentagem de macrófagos infectados, com promastigotas, e número de parasitas/macrófagos	38
8 - Porcentagem de macrófagos infectados, com amastigotas, e número de parasitas/macrófagos	40
9 - Densitometria referente a bandas da imagem de Western Blot da Figura 18	49
10 - Densitometria referente a bandas da imagem de Western Blot da Figura 19	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	- 13 -
1.1 O escorpião.....	-13-
1.2 Envenenamento por escorpiões.....	-15-
1.3 O veneno e sua composição.....	-17-
1.4 Potencial biotecnológico de venenos.....	-20-
1.5 Sobre Leishmania e Leishmanioses.....	-22-
1.6 Ciclo Biológico do Parasita Leishmania.....	-24-
1.7 Tratamento das leishmanioses.....	-26-
2. OBJETIVOS	- 28 -
2.1 Geral.....	-29-
2.2 Específicos.....	-29-
3 MATERIAIS E MÉTODOS	- 30 -
3.1 Animais e venenos.....	-30-
3.2 Parasitas.....	-30-
3.3 Dosagem de Proteínas.....	-31-
3.4 Ensaio de atividade Leishmanicida.....	-31-
3.5 Conversão de formas Promastigotas em Amastigotas (like-Amastigotas)-	32-
3.6 Análise de Morfologia e Motilidade de Parasitas tratados.....	-33-
3.7 Isolamento de macrófagos peritoneais em camundongos.....	-33-
3.8 Infecção in vitro de macrófagos peritoneais com de leishmania.....	-34-
3.9 Avaliação da Infectividade dos parasitas tratados com o veneno total.....	-34-
3.10 Purificação do veneno de T. serrulatus.....	-35-
3.11 Análise de frações purificadas por MALDI-TOF-TOF.....	-35-
3.12 Citotoxicidade em Macrófagos.....	-36-
3.13 Western-blot para avaliar a expressão da enzima iNOs.....	-37-
3.14 Tratamento in vitro de macrófagos infectados e marcação com laranja de acridina.....	-38-
4. RESULTADOS.....	- 39 -

4.1 Atividade Leishmanicida do veneno de <i>T. serrulatus</i> em formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	-40-
4.2 Conversão de formas Promastigotas em like-Amastigotas de <i>Leishmania</i>	-42-
4.3 Atividade Leishmanicida do veneno de <i>T. serrulatus</i> nas formas like-amastigotas de <i>leishmania</i>	-44-
4.4 Análise de Morfologia e Motilidade de Parasitas tratados.....	-46-
4.5 Avaliação da infectividade das formas promastigotas tratadas com o veneto total de <i>T. serrulatus</i>	-47-
4.6 Avaliação da infectividade das formas amastigotas tratadas com o veneto total de <i>T. serrulatus</i>	-50-
4.7 Purificação do veneno de <i>T. serrulatus</i>	-53-
4.8 Análise de frações purificadas por MALDI-TOF-TOF.....	-54-
4.9 Atividade Leishmanicida de frações Purificados do Veneno de <i>T. serrulatus</i>	-56-
4.10 Citotoxicidade em macrófagos de fracoes purificadas.....	-58-
4.11 Western-blot para a detecção da expressão da enzima iNOs em macrófagos tratados.....	-59-
4.12 Tratamento in vitro com FG50 de macrófagos infectados com <i>Leishmania</i> sp.....	-63-
5. DESENVOLVIMENTO.....	- 70 -
6. CONCLUSÃO	- 80 -
7. PERSPECTIVAS	- 82 -
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 83 -

1. INTRODUÇÃO

1.1. O escorpião

Escorpiões são considerados os primeiros aracnídeos a surgirem na natureza. Sua capacidade evolutiva e adaptativa permitiu-lhes sobreviver na superfície da Terra ao longo de cerca de 400 milhões de anos, mantendo a sua morfologia praticamente sem alterações. São encontrados na maioria dos habitats terrestres, como florestas tropicais, pradarias, savanas, florestas temperadas, cavernas e até mesmo montanhas cobertas de neve, devido a uma gama de mecanismos adaptativos, incluindo a baixa perda de água cutânea, atividade noturna e baixa taxa metabólica (Lighton ET AL. 2001).

Escorpiões são artrópodes venenosos da classe Arachnida, ordem Scorpiones. A família Buthidae é considerada a de maior importância clínica e epidemiológica, com mais de 500 espécies distribuídas mundialmente, sendo que, na América do Sul o Gênero *Tityus* é predominante. Esses animais apresentam o corpo formado pelo tronco (prossoma e mesossoma) e pela cauda (metassoma). O prossoma é coberto dorsalmente por uma carapaça onde se articulam quatro pares de pernas, um par de quelíceras e um par de pedipalpos. O mesossoma apresenta sete segmentos dorsais, os tergitos, e cinco ventrais, os esternitos. O metassoma é formada por cinco segmentos e, no final da mesma, situa-se o telson, estrutura formada pela vesícula e pelo acúleo oco. A vesícula contém duas glândulas de veneno e estas se ligam através de dois canais a duas aberturas perto do final do telson, por onde o veneno é excretado e inoculado através do orifício formado pela picada do acúleo (Lutz & Mello, 1922) (Figura 1).

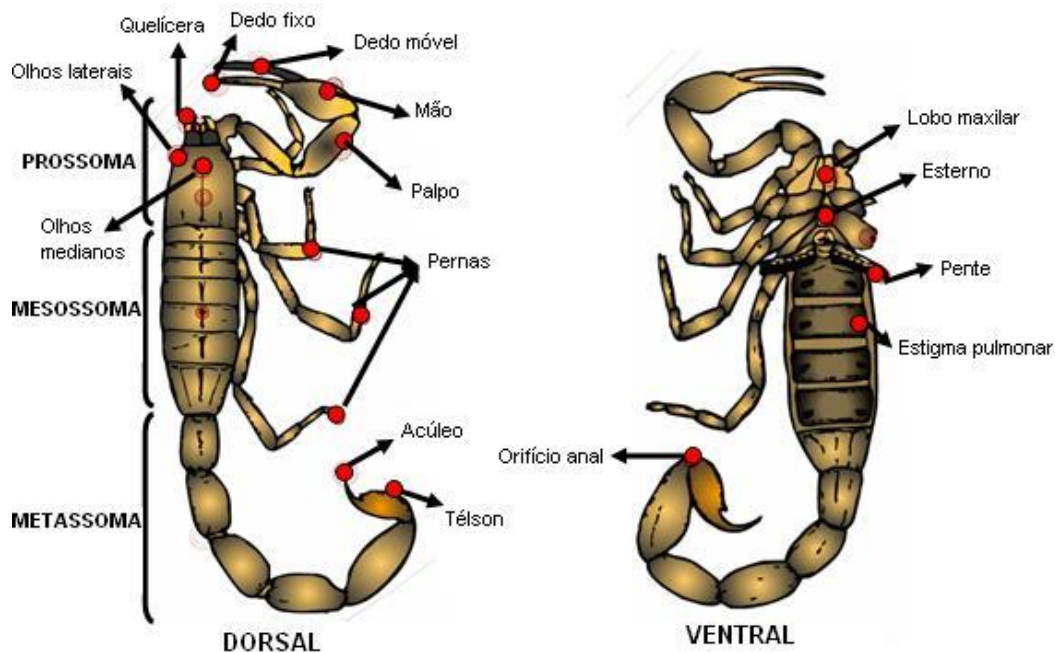


Figura 1: Estrutura corporal de um escorpião. Representação esquemática das estruturas e da divisão corporal do animal em vista dorsal (esquerda) e ventral (direita)

O envenenamento por escorpiões é um importante problema médico-sanitária e tem mostrado um aumento alarmante de casos nos últimos anos em muitos países tropicais e subtropicais. No Brasil, os escorpiões de maior periculosidade pertencem ao gênero *Tityus* e compreendem principalmente as espécies *T. serrulatus* (conhecido como escorpião amarelo), *T. stigmurus* e *T. bahiensis* (conhecido como escorpião marrom). Escorpiões de espécie *T. serrulatus* (Lutz e Mello, 1922) são comuns na região Sudeste do Brasil e são responsáveis pela maioria dos acidentes e também pela maior gravidade de casos. A reprodução desta espécie ocorre por partenogênese o que causou um aumento significativo de sua presença em novas regiões onde o animal ainda não estava presente.

Escorpiões da espécie *T. serrulatus*, na fase adulta, têm de 5 a 7 cm de comprimento e exibem um corpo marrom escuro, com patas, pedipalpos e metassoma amarelos. Possuem uma serrilha ao longo da face dorsal dos segmentos distais 3 e 4 da cauda, como pequenos dentes, o que lhe confere o

nome de "*T. serrulatus*" para a espécie (Figura 2)..



Figura 2: Escorpião *Tityus serrulatus* (Lourenço et al. 1996)

A habilidade de inocular veneno, junto com a ação rápida de suas toxinas, fazem do escorpião um formidável e perigoso predador.

1.2 Envenenamento por escorpiões

A habilidade de inocular veneno, junto com a ação rápida de suas toxinas faz do escorpião um predador perigoso. Os sintomas do escorpionismo alcançam de uma dor local de intensidade leve até reações sistêmicas graves, levando à morte quando não devidamente tratadas. Adicionalmente, a resposta à picada do escorpião varia de acordo com o estado geral de saúde e a idade da vítima, bem como pela sua condição fisiológica e seu estado emocional atuais. Outras variações de sintomas podem ser atribuídas ao local da picada e a quantidade de veneno injetado. O Ministério da Saúde do Brasil, em 2001, relatou uma taxa de mortalidade de 1,77% entre as crianças de 0 a 14 anos por acidentes com escorpiões. As mortes foram associadas, com maior frequência, às picadas da espécie *T. serrulatus*.

De acordo com as manifestações clínicas, os acidentes escorpiônicos são classificados como leves, moderados e graves (Tabela 1). A resposta inicial para a picada compreende uma dor local, imediata e a sensação de queimação. Normalmente, os sintomas ocorrem logo após a picada, porém, podem se manifestar várias horas após a inoculação do veneno. Portanto, as funções vitais dos pacientes com manifestações sistêmicas devem ser

observadas continuamente, para se evitar possíveis complicações futuras.

CLASSIFICAÇÃO	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	SOROTERAPIA (nº de ampolas)
Leve *	Dor e parestesia locais.	-
Moderado	Dor local intensa associada a uma ou mais manifestações, como náuseas, vômitos, sudorese, sialorréia discretos, agitação, taquipnéia e taquicardia.	2 a 3
Grave	Além das citadas na forma moderada, presença de uma ou mais das seguintes manifestações: vômitos profusos e incoercíveis, sudorese profusa, sialorréia intensa, prostração, convulsão, coma, bradicardia, insuficiência cardíaca, edema pulmonar agudo e choque.	4 a 6

Fonte: Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos – Ministério da Saúde

Tabela 1: Manifestações clínicas mais freqüentes nos acidentes escorpiônicos.

Os achados clínicos mais comuns observados em crianças com envenenamentos graves por escorpião, são: dor local intensa, vômitos, taquicardia sinusal, taquipnéia, sudorese, agitação, sonolência, ruídos respiratórios anormais, arritmias cardíacas, hipertermia, desidratação, dispnéia, prostração, insuficiência cardíaca e pulmonar, hipotermia, palidez, tremores, hipertensão, queda da perfusão capilar, confusão mental, parada cardíaca e convulsão (Freire-Maia ET AL. 1989; Freire-Maia ET AL 1994). Os achados na necropsia dos casos fatais demonstram a ocorrência de sinais de edema

cerebral, aumento do volume de pulmão com edema alveolar, hemorragias, aumento de infiltrado inflamatório e alterações fisiológicas no miocárdio (Cupo ET AL. 1994). O edema pulmonar, um sintoma geralmente relacionado com a causa da morte induzida pelo envenenamento por *T. serrulatus*, exhibe dois componentes: um cardiogênico, pela disfunção ventricular esquerda e um não-cardiogênico. Esse parece estar relacionado ao aumento da permeabilidade vascular pulmonar que acompanha a ativação do processo inflamatório (Pessine ET AL. 2003).

Bioquimicamente, os sintomas e sinais clínicos observados nos envenenamentos por escorpiões têm sido atribuídos aos efeitos da interação dos venenos com canais de sódio sensíveis a voltagem das membranas das células excitáveis, induzindo a uma liberação maciça de neurotransmissores (Possani ET AL. 1999).

1.3 O veneno e sua composição

Os venenos escorpiônicos são misturas complexas de substâncias produzidas por glândulas seromucosas e inoculadas por aparato especializado presente no animal peçonhento. Os componentes do veneno têm, portanto, o objetivo de comprometer funções vitais do organismo no qual são inoculados. Essas misturas apresentam as mais diversas biomoléculas, que se encontram em concentrações variadas. Devido a essa grande diversidade de componentes e o difícil isolamento desses mesmos para caracterização, uma parcela muito pequena das biomoléculas integrantes dos venenos foi devidamente estudada (Gazarian et al, 2005).

No veneno do escorpião *T. serrulatus*, cerca de 380 diferentes massas, possivelmente relacionadas com mais de 300 compostos diferentes, foram identificadas por espectrometria de massas em apenas duas das frações purificadas por gel filtração (Pimenta ET AL. 2001). Das 1.500 espécies de escorpião descritas até o momento, apenas 30 delas tiveram as frações de seus venenos amplamente estudados. Tomando-se o número total de espécies

de escorpião estimadas, pode-se prever a existência de mais de 100.000 diferentes compostos nos venenos de escorpiões, dos quais apenas 0,02% já foram identificados e caracterizados (Possani ET AL. 2000). Além da diversidade estimada, indivíduos de uma mesma espécie podem apresentar composição bioquímica diferente no veneno, de acordo com seu tipo de alimentação, idade, habitat e com o momento da inoculação, o que pode aumentar ainda mais a diversidade dos compostos presentes (Inceoglu ET AL. 2003; Kalapothakis & Chavez-Olórtegui, 1997).

Dentre os compostos já identificados como componentes do veneno estão a histamina, serotonina, peptídeos, nucleotídeos, aminoácidos, enzimas, inibidores de enzimas e neurotoxinas (Diniz 1978; Possani ET AL. 1981). As enzimas proteolíticas encontradas nos venenos podem atuar como fatores de difusão do veneno, degradando componentes da região onde é inoculado e facilitando sua absorção ou até mesmo serem causadoras diretas das patologias relacionadas ao envenenamento (Almeida ET AL. 2002; Pessini ET AL. 2001). Entretanto, as neurotoxinas são as principais responsáveis pela maioria dos sintomas apresentados no envenenamento.

O veneno de *T. serrulatus* é uma fonte rica de pequenas proteínas neurotóxicas que interagem especificamente com vários canais iônicos em membranas excitáveis e que agem sobre os diferentes alvos de canais iônicos (como canais para Na⁺, K⁺, Ca⁺² e Cl⁻), formando, assim, quatro famílias de toxinas.

As proteínas melhor estudadas são as toxinas de cadeia longa, contendo de 60 a 70 resíduos de aminoácidos unidos por quatro pontes dissulfeto e, principalmente, ativas em canais de Na⁺. Toxinas ativas em canais de Na⁺ são os principais agentes responsáveis pelos efeitos tóxicos do envenenamento por escorpião. São consideradas peptídeos de cadeia longa e podem ser classificadas em duas classes: α-neurotoxinas e β-neurotoxinas (Gordon ET AL. 1998). Um terceiro grupo, denominado de γ-toxinas, inclui as toxinas altamente específicas contra insetos e se diferem das anteriores pela sua sequência de aminoácidos, seu mecanismo de ação e sítio de ligação nos

canais de Na⁺ (Zlotkin ET AL. 1991).

Toxinas de escorpiões ativas em canais de K⁺ (KTX) são peptídeos básicos pequenos e de cadeia curta (de 23 a 43 resíduos de aminoácidos) unidos por 3 ou 4 pontes dissulfeto e que não apresentarem efeitos tóxicos significativos (apenas 9,2% da toxicidade em relação às toxinas para canais de Na⁺). Estudos estruturais sobre KTX têm revelado uma estrutura 3-D conservada, composta por uma α -hélice unida por duas pontes dissulfeto à uma folha β antiparalela no motivo $\alpha\beta$ DB. Uma terceira ponte dissulfeto liga a folha β à porção aminoterminal da toxina. Apesar de suas semelhanças na arquitetura, exibem seletividade e afinidade distintas por uma variedade de canais de K⁺ sendo classificados em α -, β - e γ - toxinas (Tyatgat ET AL. 1999).

Apesar das diferenças de seletividade, afinidade e sequência linear, as toxinas de escorpiões, como as de *T. serrulatus*, possuem características estruturais conservadas, como a presença de um núcleo denso composto por duas pontes dissulfeto entre as cisteínas da sequência C-XXX-C da região de α -hélice e as cisteínas do C-X-C de uma das folhas β antiparalelas (Figura 3).

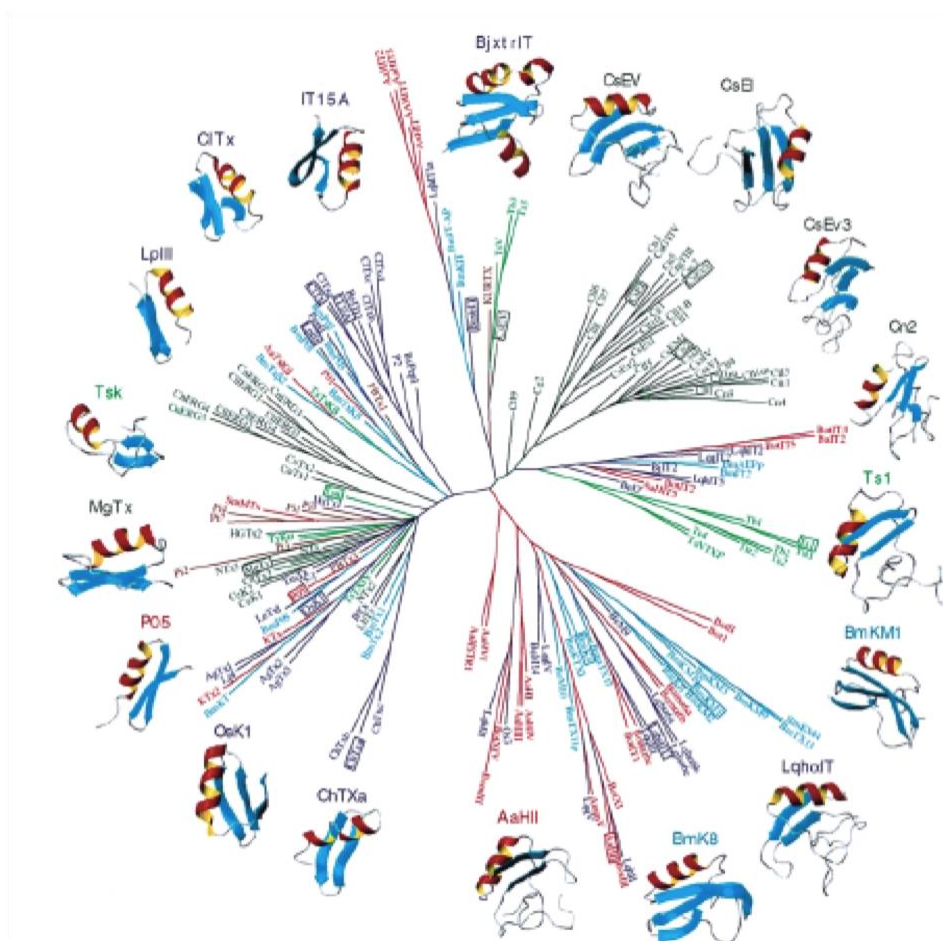


Figura 3: Árvore Filogenética de toxinas escorpionicas. É possível notar características conservadas entre as toxinas. (Possani ET. AL. 2000).

O veneno de *T. serrulatus* apresenta uma grande diversidade de compostos, com toxicidades e atividades biológicas variadas. Essas proteínas compreendem desde toxinas de extrema letalidade, incluídas na família das toxinas para canais de Na⁺ que atuam alterando o mecanismo de abertura dos canais, nesse caso, como a Ts-IV; passando por proteínas atóxicas, como a NTxP (Chávez-Olórtegui ET AL. 1996), essas, proteínas de baixa toxicidade, bloqueadoras de canais de K⁺; até proteínas de atividade ainda indeterminada (Pimenta ET. AL. 2003).

1.4 Potencial biotecnológico de venenos

O processo evolutivo tem refinado a diversidade biológica e a potência dos venenos, dessa forma, eles agora se constituem, essencialmente, em

bibliotecas de substâncias farmacologicamente ativas que são pré-otimizadas para a química medicinal.

Proteínas de venenos possuem características diversas requeridas para o uso terapêutico, como seletividade e especificidade elevadas, estabilidade e pequeno tamanho molecular. Além disso, a imensa diversidade de componentes, principalmente, de proteínas ricas em pontes dissulfeto, pode servir como uma longa plataforma para a descoberta de novos fármacos. Tal fato pode-se concretizar com o uso de algumas ferramentas tecnológicas que permitem a caracterização de diversos componentes de venenos tais como a espectrometria de massas, o sequenciamento *de novo* e a síntese química de peptídeos (Escoubas ET. AL. 2009).

Os fatos mencionados acima já resultaram na obtenção de vários tratamentos bem sucedidos e em tratamentos promissores que se encontram em fase final de aprovação. Um bom exemplo é o medicamento Captopril[®], um anti-hipertensivo sintético que mimetiza funcional e estruturalmente os peptídeos potencializadores da bradiginina e foi descoberto no veneno da serpente brasileira *Bothrops jararaca*. Outros exemplos são: o Prialt[®], uma versão sintética da ω -toxina MVIIA do molusco *Conus magus* que exerce atividade analgésica pelo bloqueio de canais de Ca^{+} e o Byetta[®], uma versão sintética da exendina-4 da saliva do monstro de Gila, que é um peptídeo agonista do receptor do *glucagon-like peptide*, já aprovado como adjuvante no tratamento da diabetes tipo II em adultos. Outro produto, o TM-601[®], atualmente em estudos de fase II em humanos, é uma forma modificada de uma clorotoxina escorpiônica que atua em receptores de células de glioma sem interagir com neurônios vizinhos saudáveis. Os exemplos citados demonstram que a seletividade elevada das toxinas dos escorpiões para diferentes subtipos de receptores pode ser explorada na forma de terapias célula-específicas ou tecido-específicas sem os efeitos colaterais pronunciados.

1.5 Sobre Leishmania e Leishmanioses

Leishmania spp. são parasitas do Sub-Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Possuem hospedeiro invertebrado, que são insetos da Ordem Díptera, Família Psychodidae, Sub-Família Phlebotominae, pertencentes aos Gêneros *Phlebotomus*, em países do velho mundo e *Lutzomyia*, nas Américas, sendo que apenas as fêmeas tem hábitos hemofágicos e são capazes de transmitir o parasita ao hospedeiro mamífero no qual se enquadram o homem e o cão.

O parasita possui duas formas morfológicas distintas: a forma promastigota, que prolifera no trato digestivo de Phlebotomíneos vetores, e a forma amastigota uma forma intracelular obrigatória e que é encontrada no hospedeiro mamífero, e infecta, na maioria das vezes, fagócitos mononucleares. Promastigotas são células alongadas com o corpo celular medindo de 5 a 20 μm de comprimento e 1 a 4 μm de diâmetro, apresentando um flagelo anterior de cerca 20 μm de comprimento (Fig 4 A). Formas amastigotas são células arredondadas que medem cerca de 2 a 4 μm de diâmetro (Fig 4 B). Em ambas as formas de desenvolvimento da flagelo emerge da bolsa flagelar, porém, na forma amastigota, o flagelo é quase totalmente restrito a ela, podendo ser visto apenas por microscopia eletrônica.

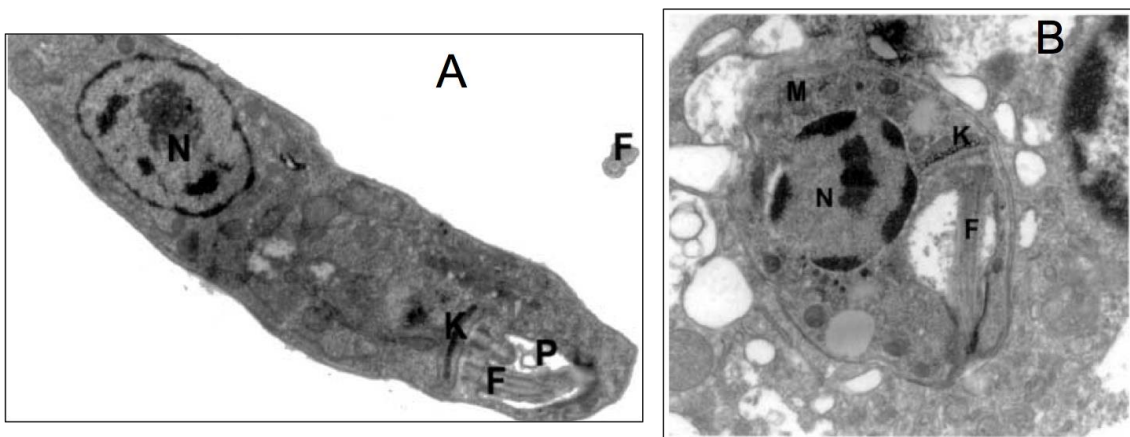


Figura 4: Ultraestrutura de Parasitas. A) Microscopia de Transmissão de *Leishmania* promastigota; B) Microscopia de Transmissão de *Leishmania* amastigota intramacrófago. As principais organelas podem ser observadas, como o Flagelo (F),

desenvolvido em promastigotas e vestigial em amastigotas, Bolsa Flagelar (P), Núcleo (N), Mitocôndria ramificada-Cinetoplasto (K). (Vannier-Santos ET AL. 2002)

Tripanossomatídeos, incluindo *Leishmania*, possuem algumas organelas características desse grupo, como o Alcidocalcissomo, que são organelas ácidas que funcionam como reservatórios de Ca^{+2} , e são ricas em pirofosfato e outros íons, e presença marcante de trocadores de $\text{Ca}^{+2}\text{-H}^{+}$ e de $\text{Ca}^{+2}\text{-H}^{+}$ ATPases, sendo importantes para a osmoregulação e homeostasia do pH (Docampo 1999). Uma outra característica celular de *Leishmania* e outros Tripanossomatídeos, é a presença de uma única mitocôndria ramificada, que se estende por todo o comprimento da célula que tem um conteúdo de cerca de 15% do DNA do parasita em uma região localizada no proximidades do corpo do flagelo, denominado Cinetoplasto.

O parasita *Leishmania* está envolvido em patologias que vão desde uma lesão cutânea única, de cura espontânea, até a forma visceral da doença, fatal, quando não tratada. A evolução da doença no hospedeiro mamífero depende, principalmente, da espécie infectiva e da resposta imune do hospedeiro (Barral et al. 1991). A forma tegumentar ou leishmaniose tegumentar americana (LTA) tem aumentado nos últimos 20 anos em quase todos os estados brasileiros, e surtos epidêmicos têm ocorrido no Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste, e mais recentemente, em regiões da Amazônia, devido a processos predatórios (Delorenzi ET AL. 2001; Gontijo e Melo, 2004) (Figura 5). Historicamente, a LTA tem sido uma doença rural que atinge os agricultores, grupo de militares, e outras pessoas de áreas rurais. Contudo, a doença tem já se manifestada nas áreas urbanas e peri-urbanas, bem como em pessoas de todas as idades e ambos os sexos (Weniger ET AL. 2001).

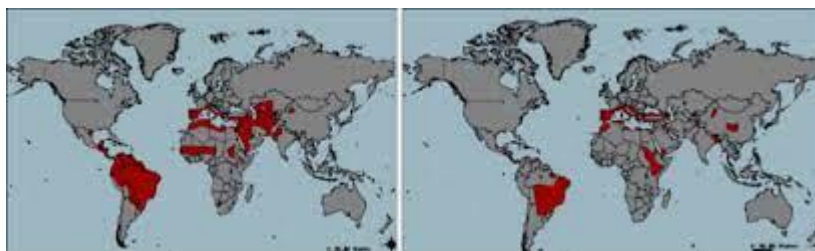


Figura 5: Distribuição no velho mundo e novo mundo de leishmanioses cutânea (esquerda) e visceral (direita). As áreas afetadas, de acordo com Organização Mundial de Saúde, estão em vermelho. (Dilvani.O.Santo ET AL. 2008).

A leishmaniose visceral (LV) ou Calazar é mais severa do que a leishmaniose tegumentar (LT) e pode ser causada por *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania infantum*, similar a *Leishmania chagasi* no Brasil, e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Estes agentes afetam cerca de 500 mil pessoas por ano; principalmente na Índia, Sudão e países da América Latina (Weniger et al. 2001;). O parasita afeta principalmente o fígado e o baço, causando hepatomegalia, esplenomegalia, e conseqüente perda da função desses órgãos, entre outras alterações graves, que podem ser fatais se um tratamento eficiente não for estabelecido (Croft et al. 2006).

Estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas são infectadas por mais de 20 Espécies de *Leishmania*, com cerca de dois milhões de casos notificados anualmente e é preocupante que cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas, sob o risco de infecção (Piscoto ET AL 2006). A leishmaniose é encontrada em pelo menos 88 países, mas mais de 90% dos casos são observados em países subdesenvolvidos ou países em desenvolvimento como o Brasil, Bangladesh, Índia e Sudão.

A relevância desta doença parasitária tem ganhado maior atenção nos últimos anos pelos países desenvolvidos, tais como Espanha, Itália, França e Portugal, uma vez que houve o aumento do número de casos registrados de co-infecção de *Leishmania* com o vírus causador da AIDS, representando cerca de 9% dos pacientes imunocomprometidos (WHO 2003).

1.6 Ciclo Biológico do Parasita *Leishmania*

Durante o repasto sanguíneo de Phlebotomíneos de sangue proveniente de um mamífero infectado, formas amastigotas, no intestino do hospedeiro invertebrado, desenvolvem-se em formas alongadas, flageladas e móveis

denominadas de promastigotas procíclicas (Figura 6) . Após isso, acontece a metaciclogênese, que é o processo de em que formas extracelulares, altamente replicativas, e não infectivas, diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, essas, sem capacidade replicativa, mas altamente infectivas, são responsáveis pela infecção no hospedeiro vertebrado. O inseto, agora contaminado, no momento de um novo repasto sanguíneo, injeta, junto a saliva, algumas centenas de formas promastigotas, na sua maioria, metacíclicas, no hospedeiro mamífero.

Os parasitas são na sua maioria, fagocitados por células do sistema fagócito mononuclear, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, formando os fagossomos, que se fundem a lisossomos , formando os fagolisossomos. Dentro dessas organelas, há a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas. Essas formas praticamente aflageladas, parasitas intracelulares obrigatórias, são responsáveis pelo desenvolvimento da doença no hospedeiro vertebrado, completando-se, assim, o ciclo biológico do parasita. (Sacks ET AL 2001).

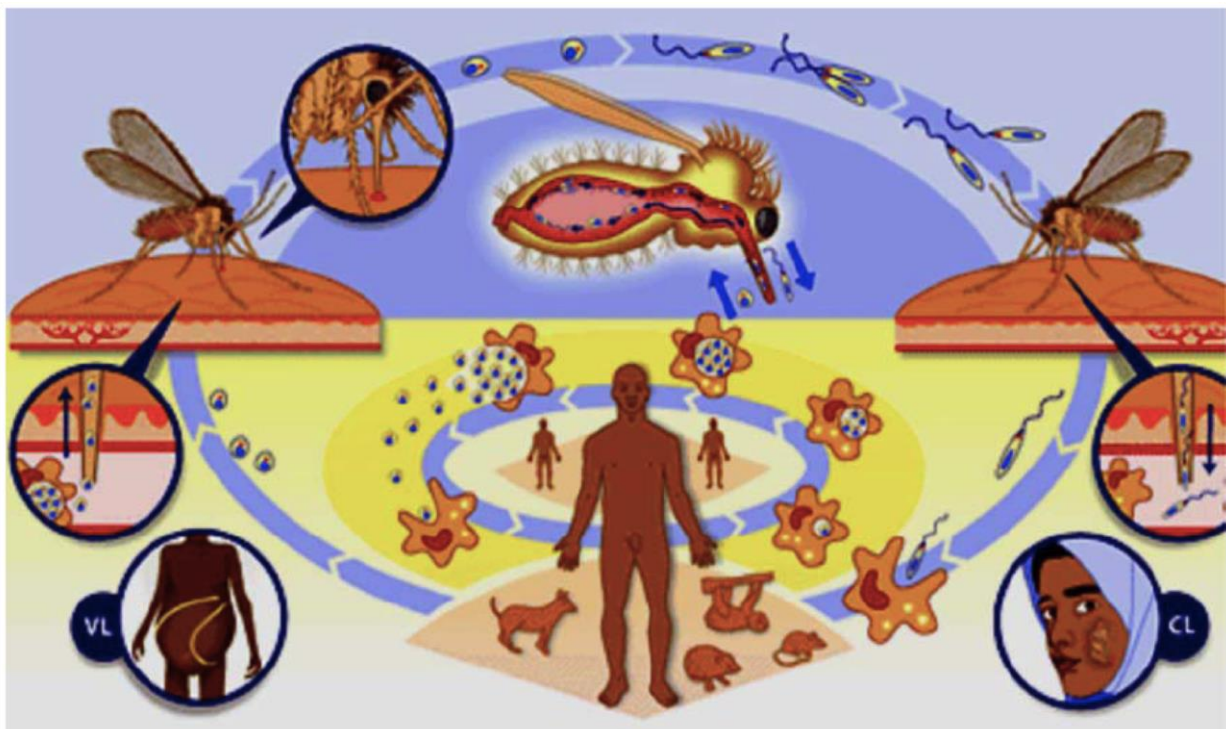


Figura 6: Ciclo de vida de *Leishmania* sp. causando Leishmaniose. (WHO)

1.7 Tratamento das leishmanioses

Os fármacos usadas no tratamento das leishmanioses apresentam diversos problemas, como a toxicidade elevada e os vários efeitos colaterais observados nos pacientes levando, na maioria dos casos, à desistência ao tratamento e ao conseqüente aparecimento de cepas resistentes. Além disso, o custo elevado dos fármacos e a logística de administração dificultada, na qual há necessidade da aplicação diária dos fármacos e que são administrados por via parenteral, tornam o tratamento pouco adequado (Yardley ET AL. 2002; Singh & Sivakumar 2004).

O tratamento inclui o uso do antimônio pentavalente, no caso, o estibogluconato de sódio e antimoniato de N-metilglucamina, formas utilizadas desde a década de 1940 (Raht et al. 2003) (Tabela 2). Em alguns casos, outras drogas, tais como pentamidina, anfotericina B e paromomicina são usadas como drogas de segunda linha, apesar da toxicidade elevada e do custo elevado (Escobar et al. 2001).

Cabe ressaltar que, recentemente, um aumento no número de casos de resistência à pentamidina foram descritos (Bray ET AL. 2003), assim como maiores dificuldades no tratamento de pacientes imunossuprimidos (como os co-infectados com o vírus HIV), nos quais as drogas convencionais são menos eficientes e altas doses e longos períodos de tratamento são normalmente necessários têm sido relatadas (Escobar ET AL. 2001).

Name		2D - structure	Chemical formula	Molecular Mass (g/mol)
Commercial	Chemical			
Pentostam®	Sodium stibogluconate		$C_{12}H_{38}Na_3O_{26}Sb_2$	910.9
Fungizone	Amphotericin B		$C_{47}H_{73}NO_{17}$	924.084
Humatin	Paromomycin sulfate		$C_{23}H_{47}N_5O_{18}S$	615.629
Pentamidine	Pentamidine isethionate		$C_{19}H_{24}N_4O_2$	340.42
^a Glucantime	Meglumine antimoniate		$C_{14}H_{29}O_{10}N_2Sb$	507.01

Tabela 2: Diferentes tipos de drogas usadas no tratamento de Leishmanioses

Antimoniais, apesar de serem os fármacos mais usados, não são aprovados pela FDA-EUA e são considerados pela IARC como possíveis carcinogênicos. Antimoniais trivalentes interagem com sulfidrilas de proteínas, causando perda de função dessas biomoléculas, e antimoniais pentavalentes, mais comuns, formam complexos com ribonucleosídeos interferindo no processo de expressão de proteínas e replicação celular.

Diferentes respostas clínicas para o tratamento de LV, LC, e LTA com antimoniais pentavalentes são um problema para processo de cura do paciente com leishmaniose. Essas diferenças incluem acumulação de drogas em tecidos como baço e fígado, mialgia, pancreatite, arritmia cardíaca, e hepatite, que pode levar à redução ou retirada do tratamento (Croft et al. 2006) e até mesmo adquirir resistência a estes compostos (Escobar et al. 2001). Além disso cerca de 25% dos pacientes podem não responder ao tratamento com antimoniais pentavalentes.

A Amphotericina B é um composto usado para o tratamento de pacientes com kalazar clinicamente resistentes à pentamidina e/ou aos antimoniais. Essa molécula se liga preferencialmente ao ergosterol da membrana plasmática de *Leishmania*, mas também reconhece o colesterol de células humanas, ainda que em menor extensão. Alguns efeitos colaterais estão relacionados com o uso da Amphotericina B, como hipotensão, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, arritmias cardíacas e paradas cardíacas. Com o objetivo de diminuir tais efeitos indesejáveis, algumas formulações comerciais nas quais a Amphotericina B está associada a lipídios e lipossomas (Ambisome[®], Abelcet[®] e Amphotec[®]) foram desenvolvidas. Infelizmente, a produção possui custo elevado o que torna complicado sua aplicação em países menos desenvolvidos (Golenser ET AL. 1999).

Tais fatos denotam a necessidade da obtenção de novos medicamentos para serem utilizados no tratamento das leishmanioses e que apresentem poucos efeitos colaterais, principalmente, quando comparados aos observados no tratamento atual; que possuam maior especificidade e mantenham a eficiência em eliminar os parasitas. Há de se considerar também a necessidade da redução dos custos do tratamento, de modo que novos fármacos possam se tornar mais disponíveis para a maioria da população dos países em desenvolvimento nos quais os casos de leishmanioses se façam presentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a eficácia do veneno total de *Tityius serrulatus* e suas frações purificadas por cromatografia contra formas promastigotas em fase estacionária de crescimento e *like*-amastigotas das espécies *Leishmania amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*.

2.2 Específicos

- Avaliar a viabilidade celular das espécies de *Leishmania* após o tratamento das mesmas com o veneno de *T. serrulatus* ou com suas frações purificadas, via ensaio de MTT.
- Validar a transformação *in vitro* das formas promastigotas em fase estacionária de crescimento para as formas *like*-amastigotas de *Leishmania*.
- Verificar a manutenção *in vitro* da infectividade dos parasitas, em ambas as formas, após seu tratamento com o VTs.
- Purificar as frações do veneno de *T. serrulatus* por gel-filtração com coluna de Sephadex G50.
- Avaliar a viabilidade celular de *Leishmania* sp. e a citotoxicidade em macrófagos, via ensaio de MTT, frente às frações purificadas do VTs.
- Verificar a ativação de macrófagos pela expressão da enzima iNOs após o tratamento dos mesmos com as frações purificadas do VTs.
- Avaliar a eficácia de FG50 para o tratamento *in vitro* de macrófagos infectados com *Leishmania* sp. através de marcação com laranja de acridina em microscopia confocal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e venenos

Foram utilizados camundongos BALB/c ou Swiss fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram adquiridos junto ao Centro de Bioterismo da UFMG e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica do ICB, onde receberam alimentação e condições ambientais controladas..

Escorpiões adultos da espécie *Tityus serrulatus* foram coletados na região de Belo Horizonte e mantidos na Seção de Animais Peçonhentos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). O veneno bruto foi obtido por estimulação elétrica dos telsons e estocado á -20°C no escuro até o uso.

3.2 Parasitas

As amostras IFLA/BR/1967/PH-8 de *L. amazonensis*, MHOM/BR/1970/BH46 de *L. chagasi* e MHOM/IL/1980/Friedlin de *L. major* foram utilizadas. Os parasitas foram cedidos pelas professoras Maria Norma Melo, do Departamento de Parasitologia e Leda Quércia Vieira, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB.

Os parasitas foram cultivados em meio de cultura de Schneider's completo, o qual foi constituído pelo meio de Schneider's (Sigma) acrescido com 20% de soro fetal bovino inativado (Sigma), 20 mM de L-glutamina, 50 µg/mL de gentamicina, 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em pH 7,4. Os parasitas permaneceram em cultivo a 24°C, sendo que repiques das culturas foram efetuados para a manutenção das cepas e preparo dos parasitas para os experimentos. A obtenção das formas promastigotas em fase estacionária de crescimento e das formas *like*-amastigota foi realizada de acordo com protocolo descrito em Coelho ET AL. (2003) Estoques de parasitas foram mantidos congelados em glicerol estéril, na concentração de 15%, armazenados em nitrogênio líquido.

3.3 Dosagem de Proteínas

Para a dosagem de proteínas, foram utilizados, com algumas modificações, os métodos de Bradford e Lowry.

Para o procedimento de Bradford, inicialmente, 20 μL das amostras foram diluídas em 180 μL de água MILIQ. Dessa diluição (1/10), foram adicionadas 5, 10, 15 e 20 μL , em duplicata, em placas de microtitulação de 96 poços. Em cada poço, foram adicionados 15, 10 e 5 μL de água MILIQ, respectivamente, e, em todos eles, 180 μL de reagente Bradford somando, em todos os poços, um total de 200 μL de volume de reação. O branco, necessário para a calibração do aparelho, foi constituído por 20 μL de água MILIQ e 180 μL do reagente de Bradford. Após 20 min de incubação da reação, ao abrigo da luz, a intensidade de cor resultante foi determinada em Leitor de ELISA (BioRad, mod. 2550), no comprimento de onda de 600 nm. A concentração das proteínas nas amostras foi determinada pela construção de uma curva padrão, a partir de uma solução de albumina na concentração de 1 mg/mL.

O procedimento de Lowry, o qual foi utilizado para a dosagem de toxinas escorpionicas, foi feito semelhante ao procedimento de Bradford. O ensaio foi realizado também na forma de microdosagem, e com a mesma estratégia para obtenção da curva padrão. De uma diluição de 1/10 em água MILIQ, 10, 15 e 20 μL das amostras eram colocadas, em duplicatas em placas de microtitulação de 96 poços. Em seguida, eram adicionados 20, 15 e 10 μL de água MILIQ, respectivamente, e em todos eles 200 μL de Solução contendo sulfato de cobre 2%, Tartarato de sódio e potássio 3% e Carbonato de sódio 3% - NaOH 0,2 M, incubando por 10 min. Em seguida, era acrescentado 10 μL de reagente FOLIN (Intralab), por 1 hora. A intensidade de cor resultante foi determinada em Leitor de ELISA (BioRad, mod. 2550), no comprimento de onda de 640 nm.

3.4 Ensaio de atividade Leishmanicida

A viabilidade de parasitas foi analisada pela oxidação mitocondrial do MTT (4,5-(3-[4,5-dimethylthiazol-2-y1]-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide).

Os parasitas (tanto em forma promastigota, quanto em forma amastigota) em fase estacionária de crescimento foram contadas em câmara de Neubauer em Isoton e plaqueadas, em placas de microtitulação de 96 poços, com 4×10^5 céls/poço, em RPMI-PR 1640 completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 ug/ml de estreptomicina, em pH 7.0), em um volume final de 100 μ L/poço. Assim, era alcançada uma concentração de 4×10^6 céls/mL. Essas células foram incubadas por 1 hora, a 25°C, com VTs ou frações purificadas (todas à mesma concentração), e PBS estéril foi usado para garantir o mesmo fator de diluição do meio de cultura exercido pelas proteínas testadas.

Em seguida, foi preparada solução de MTT (2 mg/mL) em RPMI-PR 1640 incompleto e esterilizada por filtração (0,22 μ m). Então, 50 μ L/poço da solução de MTT foi adicionado e a placa foi incubada por 4 horas a 25 °C. Finalmente, 60 μ L/poço de SDS 10% em HCL 0,01 M (SDS – HCl) foi adicionado, seguido de 18 horas de incubação. 24°C. A densidade ótica (DO) das amostras foi determinada em leitor de ELISA (BioRad, mod. 2550) no comprimento de onda de 570 nm e correlacionada com o número de parasitas não-viáveis (mortos) através da seguinte equação:

$$\% \text{ de Morte} = \frac{(\text{DO}_{\text{controle}} - \text{DO}_{\text{amostra}})}{\text{DO}_{\text{controle}}} \quad (\text{Tempone ET AL. 2001})$$

Com isso, a CE 50% foi calculada por interpolação linear de acordo com Ponte-Sucre ET AL. 1998.

3.5 Conversão de formas Promastigotas em Amastigotas (*like-Amastigotas*)

O procedimento de conversão de formas promastigotas em fase estacionária de crescimento para formas *like*-amastigotas foi realizado de acordo com o protocolo descrito em Coelho ET. AL. 2003.

Após a conversão dos parasitas, lâminas das culturas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*, nas formas promastigotas e *like*-amastigotas foram confeccionadas para comparar a morfologia dos parasitas. Cerca de 50 µL das culturas foram aplicados sobre a superfície de lâminas de microscopia limpas e desengorduradas e as mesmas foram deixadas à temperatura ambiente por cerca de 40 min, para completa secagem. Em seguida, as lâminas foram levadas a uma estufa a 37°C por 1 hora, fixadas com metanol 100% (5 min) e coradas por May – Grunwald (1 minuto) e Giensa (10 minutos).

3.6 Análise de Morfologia e Motilidade de Parasitas tratados

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento foram contadas em câmara de Neubauer, em 1: 10 Isoton, e 4×10^5 células foram incubadas em microplacas de 96 poços com 25 µg/mL de VTs por 20 min em RPMI - PR- 1640 completo, num volume final de 100 µL. Em seguida, 80 µL das culturas foi aplicado em lâminas para microscopia em um diâmetro de cerca de 2,5 cm, delimitado por Immunopen Dako Pen(Dako) e levadas ao microscópio ótico. Após isso, foram feitas imagens e vídeos com câmera Sony Cybershot 12 megapixels.

3.7 Isolamento de macrófagos peritoneais em camundongos

Camundongos BALB/c fêmeas, de 6 a 8 semanas, receberam tioglicolato de sódio (3%) via intraperitoneal, e 4 dias da aplicação do tioglicolato, os animais foram mortos por decapitação. Macrófagos peritoneais foram coletados com uma agulha de 21 G através de 3 lavagens na cavidade peritoneal com 10 ml de PBS gelado estéril, seguidos de massagem no abdômen. As células foram transferidas para um tubo de centrífuga estéril de 15 mL e mantidos no gelo em ambiente estéril. As células serão então

centrifugadas a 1.200 RPM à 4 °C por 20 min, e o pellet de células foi ressuspensionado em 1ml de meio RPMI 1640 completo e em banho de gelo. As células serão contadas em câmara de Neubauer diluídas 1:50 em Azul de Tripán e, se for necessário, serão submetidas a um processo de hemólise (Tris-HCl 17 mM e NH₄Cl 144 mM) para eliminar hemácias do lavado intraperitoneal.

3.8 Infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais com de leishmania

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* e de *L. (L.) chagasi* em fase estacionária de crescimento, ou na forma *like*-amastigota foram e quantificadas em câmara de Neubauer e uma proporção de 10 parasitas/macrófago foi mantida nos diferentes experimentos envolvendo infecção *in vitro*. Macrófagos foram isolados conforme protocolo já descrito, contados também em câmara de Neubauer, e plaqueados em microplacas de 6 poços (Nunc, Nunclon). Essas células foram mantidas por 2 horas em estufa de 37 °C com 5% CO₂, para aderência, e logo após, as placas eram lavadas 3 vezes com RPMI incompleto macrófagos não aderidos. Com isso, macrófagos peritoneais foram cultivados por mais 24h e, posteriormente, infectados na proporção de 10 parasitas por célula. Os macrófagos e os parasitas eram incubados por 4 h a 37°C com 5% de CO₂. As culturas eram então lavadas 3 vezes com RPMI 1640 incompleto para remover parasitas não-aderentes e não-internalizados.

3.9 Avaliação da Infectividade dos parasitas tratados com o veneno total

Macrófagos peritoneais foram extraídos conforme descrito acima, quantificados, e 2x10⁶ cél/poço foram plaqueadas em lamínula estéril, colocadas em microplacas de 6 poços, por 2 horas para aderência. Depois disso, as culturas eram lavadas 3 vezes com RPMI 1640 incompleto, e cultivadas por 24 horas.

Leishmanias (tanto em forma promastigota, quanto em forma *Like*-amastigota) eram contadas em câmara de Newbaeur, em 1: 10 Isoton, e 2x10⁷ células eram incubadas, junto aos macrófagos, com meio RPMI 1640 completo.

Ao mesmo tempo, as culturas foram incubadas, ou não, com 20 µg/mL de VTs durante as 4 horas de infecção *in vitro*.

Após isso, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com 1 mL de RPMI incompleto, para a retirada de parasitas não fagocitadas, e macrófagos infectados eram cultivados em estufa 37 °C com 5% CO₂ por 24 horas. Depois disso, o meio era retirado e as culturas foram fixadas com metanol 100%, por 5 min, e coradas por May – Grunwald (1 minuto) e Giensa (10 minutos).

Após tais procedimentos, foi feita a contagem 100 macrófagos por lamínula e calculado a porcentagem de macrófagos infectados e o número de parasitas por macrófago, em microscópio ótico.

3.10 Purificação do veneno de *T. serrulatus*

Cerca de 80 mg de veneno de *Tityus serrulatus* foi pesado e dissolvido em 2 ml de ácido acético 30% (em água) e colocado em agitação constante por 18 horas a 4 °C. Logo após, o veneno foi centrifugado a 5.000 RPM por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e o precipitado foi novamente ressuspenso e submetido a nova centrifugação. Tal procedimento foi repetido 3 vezes. Os sobrenadantes foram juntados em um volume de 2 mL (que correspondia a cerca de 1 a 5 % do volume total da coluna utilizada) e injetado em uma coluna de Sephadex G50 (Sigma), de volume de cerca de 100 mL. Como eluente, foi utilizada uma solução de ácido acético 0,1M, e foi coletado cerca de 1 mL por tubo, os quais, posteriormente, foram submetidos à leitura por espectrofotômetro, a 280 nm, e em seguida liofilizados.

Após a purificação os picos foram testados em sua toxicidade em camundongos Swiss fêmeas de 6 semanas, pesando cerca de 20 - 22g. Foi avaliada a toxicidade de 25 µg de amostra, frações purificadas e VTs (em 100 µL de PBS) por 48 horas em 2 animais por grupo

3.11 Análise de frações purificadas por MALDI-TOF-TOF

Um pequena análise por espectrometria de massas MALDI-TOF-TOF foi realizada, no Centro de Biomoléculas ICB – UFMG, para um avaliação do conteúdo molecular presente nas frações purificadas. Para isso, uma pequena quantidade das frações F2 e F4, purificadas por Sephadex G50, e liofilizadas, foi colocada em eppendorfs® de 500 µL e dissolvidas em 10 µL de água MILIQ. Em seguida, foi realizada uma micro-cromatografia em ZIP TIP (MILLIPORE), sendo que as amostras foram eluídas em Acetonitrila 50%.

Após isso, 1 µL de solução das frações purificadas foi aplicada em placas MTP AnchorChip 600/384, seguidas de 0,5 µL de matriz CHCA (α -ciano-4-ácido hidroxicinâmico, 2mg/mL), e deixado a temperatura ambiente para secagem. Um laser de nitrogênio a 337 nm foi usado para desorção das amostras e o espectro de massas foi obtido por cerca de 256 pulsos de faixa de 600 a 39 400 m/z . O aparelho foi calibrado com padrões externos (*Protein Calibration Standard I*, Bruker Daltonics, Alemanha). Os dados foram analisados através do programa FlexControl 3.0 e FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha).

3.12 Citotoxicidade em Macrófagos

Para avaliar a citotoxicidade das frações purificadas, por Sephadex G50, do veneno de *T. serrulatus* em macrófagos, usou o ensaio de viabilidade celular por redução do MTT, da mesma maneira procedido com os parasitas *Leishmania* sp..

Macrófagos peritoneais foram extraídos de acordo com método descrito em Materiais e Métodos, e 4×10^5 cél/poço foram plaqueadas, com RPMI 1640 completo, em microplacas de 96 poços, num volume final de 100 µL, alcançando, assim, a concentração de 4×10^6 cél/mL. Após adesão de 2 horas em estufa 37 °C com 5% CO₂, as culturas foram lavadas três vezes com RPMI 1640 incompleto, e ambientadas por 24 horas, também em estufa 37 °C com 5% CO₂. Em seguida, o meio foi retirado e as células foram incubadas por 1 hora com frações purificadas (50 µg/mL), em RPMI-PR⁻ 1640 completo. Após isso, foi preparada solução de MTT (2 mg/mL) em RPMI-PR⁻ 1640 incompleto e esterilizada por filtração (0,22 µm). Então, 50 µL/poço da solução de MTT foi

adicionado e a placa foi incubada por 4 horas a 37 °C com 5% CO₂. Finalmente, 60 µL/poço de SDS 10% em HCL 0,01 M (SDS – HCl) foi adicionado, seguido de 18 horas de incubação. A densidade ótica (DO) foi detectada a 570 nm em Leitor de ELISA (BioRad, mod. 2550) e correlacionada com o número de parasitas mortos pela Equação 1.

3.13 Western-blot para avaliar a expressão da enzima iNOs

Para a verificação da expressão da enzima oxido nítrico sintase indutível (iNOS) em macrófagos tratados com as frações purificadas do veneno de *T. serrulatus*, ensaios de Western-Blot foram realizados. As culturas de células contendo 2 x 10⁶ macrófagos por poço em RPMI 1640 completo, infectadas ou não, foram tratadas com frações purificadas FG50 ou F4 (50 µg/mL) e com estímulo de LPS (1 µg/mL) (controle positivo) por 24 horas em estufa 37 °C com 5% CO₂. Algumas culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* por 4 horas (na proporção de 1:10), e após infecção, foram tratadas, ou não, com 50 µg/mL de FG50. Também foi feita a incubação simultânea de 50 µg/mL de FG50 com 50 µg/mL de F4, e de 1 µg/mL de LPS com 50 µg/mL de F4. O meio de cultura foi retirado e as células receberam 1ml de PBS gelado e ficaram 10 minutos sob banho de gelo para descolamento das células da placa de cultura. As células foram, então, centrifugadas 1000 RPM durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado.

As células foram rompidas com 200 µL de solução de lise (0.15 M NaCl, 50 mM Tris, 1mM EDTA, 0.05% SDS, 0.5% Triton X-100 e 1 mM PMSF, pH 7.4) durante 1 h. Após esse procedimento, foi feita nova centrifugação a 14.000 RPM por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante será coletado. Em seguida, as amostras foram quantificadas por método de Bradford e foi aplicado cerca de 25 µg de proteína por canaleta em SDS-PAGE com 7% de poliacrilamida, sendo que foi aplicada uma voltagem de 120 volts durante 1 h e 30 min.

A transferência do gel para uma membrana de nitrocelulose foi realizada com 24 volts durante 16 h, e mais 48 V por 1 hora. Após isso, a membrana foi

corada com solução de ponceau 0,1% em 1% de ácido acético para verificar a eficiência da transferência.

A membrana será lavada com PBS 0,5 M tween 0,05% 3 vezes de 10 minutos para retirada do corante. Após esse procedimento, a membrana será bloqueada com 5% de BSA em PBS 10mM, pH 7,4 durante 1h em temperatura ambiente. Após esse passo a membrana será lavada 3 vezes com PBS 0,5 M tween 0,05%, sendo 10 minutos cada lavagem. Então, será adicionado IgG monoclonal anti-óxido nítrico sintase indutível produzida em coelho (Sigma cat. N7782), ou IgG monoclonal anti- β actina (Santa Cruz Biotechnology) por 2 horas a temperatura ambiente na diluição de 1:5000 e 1:500, respectivamente. Os passos de lavagem foram repetidos e a membrana foi incubada com anti-IgG de coelho peroxidase (Sigma cat. A6154) na diluição de 1:3000 durante 1h a temperatura ambiente. Após a incubação a membrana passou pelo mesmo processo de lavagem descrito e foi incubada com a solução reveladora foi utilizando o kit Enhanced Chemiluminescence Immunoblotting (GE) por 5 min. Após esse tempo, o excesso de solução de ECL foi retirado e a membrana foi levada ao Gel Logic 1500 Imaging System (Carestream Health Inc.) e submetida a exposição de 1 a 3 min. Após a formação das bandas a membrana foi escaneada e a intensidade da coloração foi analisada pelo software GelEval 1.22.

3.14 Tratamento *in vitro* de macrófagos infectados e marcação com laranja de acridina

A marcação de macrófagos infectados com Laranja de Acridina tem como finalidade verificar se o tratamento em que as culturas são submetidas é eficaz em levar à morte parasitas internalizados.

Para isso, macrófagos peritoneais foram extraídos conforme descrito acima, e 2×10^5 cél/poço foram plaqueadas em lamínula estéril, colocadas em microplacas de 6 poços, por 2 horas para aderência. Depois disso, as culturas eram lavadas 3 vezes com RPMI 16 40 incompleto, e cultivadas por 24 horas em RPMI 1640 completo em estufa 37 °C com 5% CO₂.

Leishmanias (na forma promastigota) eram contadas em câmara de Neubauer, em 1: 10 Isoton, e 2×10^7 células eram incubadas, junto aos macrófagos, com meio RPMI 1640 completo durante as 4 horas de infecção.

Após isso, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com 1 mL de RPMI incompleto, para a retirada de parasitas não fagocitadas, e logo após as culturas foram incubadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ de FG50, Amphotericina B ou 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS por 48 horas em estufa 37 °C com 5% CO_2 . Em seguida, as culturas de macrófagos infectados foram lavadas 3 vezes com 1 mL de RPMI incompleto e fixadas com 1 mL de Paraformaldeído 4% por 15 min.

Depois de fixadas, foi adicionada às culturas 1 mL de Etanol 70% (vol/vol) gelado por 4 horas. Logo após, as culturas eram lavadas 3 vezes com 1 mL PBS e era adicionado 1 mL de solução de RNase A (200 $\mu\text{g/mL}$) por 30 min em estufa 37 °C.

Por fim, para a marcação com Laranja de Acridina (Invitrogen cod. A3568), foi adicionado, por poço, 370 μL de HCl 0,1 M em 148 μL de PBS, e depois de 30 a 45 seg, foi adicionado 1,5 mL de solução de laranja de acridina (3 $\mu\text{g/mL}$ de Laranja de Acridina, 0,1 M de ácido acético e 0,2 M de Na_2HPO_4 pH 2,6) por 5 min no escuro. Em seguida, as culturas eram lavadas 3 vezes com 1 mL PBS procedidas da montagem das lâminas que foram levadas ao microscópio confocal (Carl Zeiss LSM META), do Departamento de Morfologia e Histologia do ICB - UFMG.

Para a excitação do marcador, foi usado filtro de 488 nm, sendo que para a captura das imagens foram utilizados filtros de referência de 525 nm e 650 nm. As imagens captadas por esses dois filtros serão sobrepostas e a avaliação de Leishmanias vivas e mortas será feita pela predominância da marcação ou a existência de uma única marcação (525 nm ou 650 nm). Durante a análise foi utilizado tanto objetiva de 40 x quanto de 63 x.

4. RESULTADOS

4.1 Atividade Leishmanicida do veneno de *T. serrulatus* em formas promastigotas de *Leishmania*

Com o intuito de verificar se o veneno de *T. serrulatus* possui alguma atividade anti-*Leishmania* diferentes concentrações de veneno (0, 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) foram incubadas por 1 hora com 4×10^6 parasitas/mL, na forma promastigota. Observou uma clara diminuição da atividade de desidrogenase mitocondrial, o que remete a uma perda da viabilidade desses parasitas frente ao veneno, sendo que essa diminuição foi mais pronunciada à medida que se aumentou as concentrações de VTs (Figura 7). Como controle positivo foi usado 50 µg/mL de Amphotericina B. A partir da análise do gráfico, pode-se observar a redução da DO das colônias de todas as espécies tratadas, o que representa uma redução da viabilidade celular dos parasitas.. E tal redução da viabilidade é mais pronunciada com o aumento da concentração do veneno de *T. serrulatus*.

Pela análise dos valores obtidos neste experimento, foi calculado a porcentagem de morte dos parasitas de acordo com a equação descrita por Tempone ET AL. (2001). Na análise da tabela 3, pode-se observar um percentual de morte significativo nas diferentes espécies de parasitas (*L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*). Nota-se que as espécies *L. amazonensis* e *L. major* apresentaram uma sensibilidade ao VTs similar entre elas, alcançando um percentual de morte em torno de 60%, quando a concentração do VTs utilizada foi de 100 µg/mL, enquanto que a espécie *L. chagasi* mostrou-se mais sensível, chegando, na mesma concentração descrita, a apresentar cerca de 80% de morte (Tabela 3).

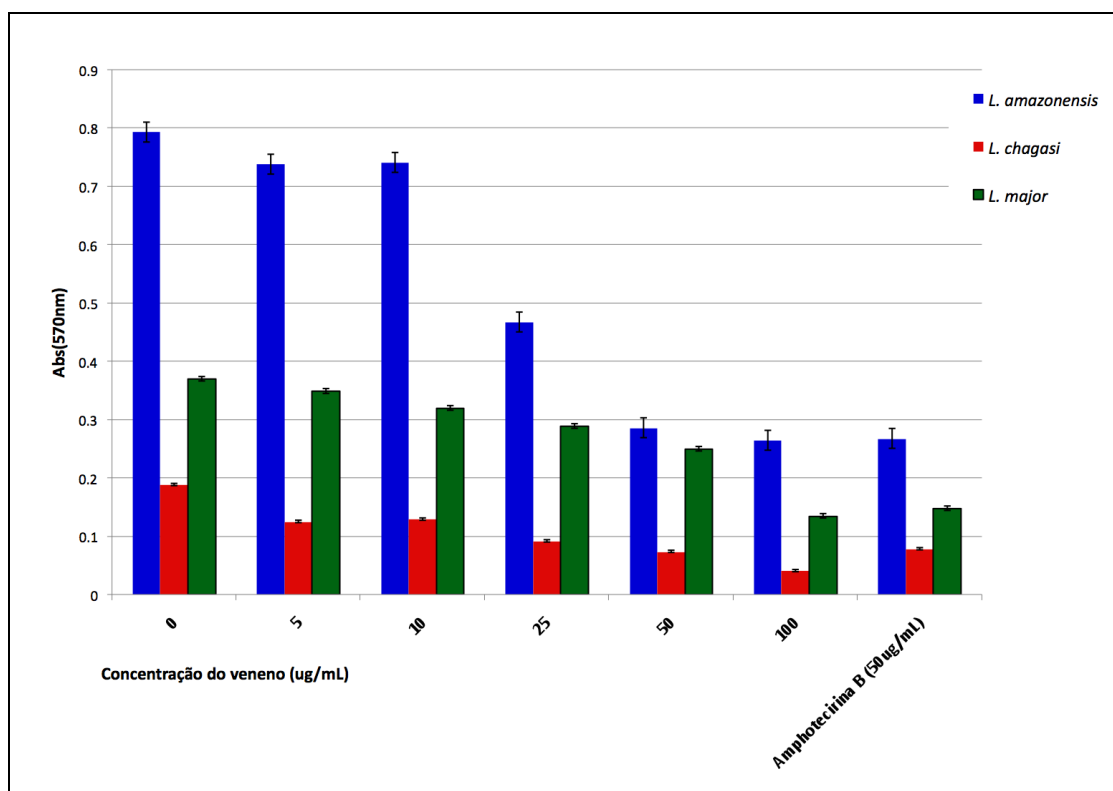


Figura 7: Atividade Leishmanicida de VTs em promastigotas. Promastigotas em fases estacionária de crescimento foram contadas em câmara de Neubauer em Isoton 1:10 e plaqueadas, em placas de microtitulação de 96 poços, e 4×10^6 parasitas/mL foram plaqueados por poço. Após isso, diferentes concentrações do veneno de *T. serrulatus* foram incubadas por 1 hora a 24,5 °C. Após isso, as culturas foram incubadas com solução estéril de MTT por 4 horas a 24,5 °C e solubilizadas por 18 horas com SDS-HCl. Por fim, foi feita a leitura das placas a 570 nm em leitor de ELISA.

Com base no gráfico acima, foi calculada a porcentagem de morte e os resultados foram plotados na tabela abaixo.

Concentração veneno (µg/mL)	% Morte <i>L. amazonensis</i>	% Morte <i>L. chagasi</i>	% Morte <i>L. major</i>
5	6,5 ± 0,82	31,1 ± 2,08 *	2,15 ± 0,8
10	6,9 ± 0,79	33,7 ± 2,11 *	4,3 ± 1,13
25	20 ± 1,23 *	51,2 ± 1,68 *	21,6 ± 1,16 *
50	63,9 ± 2,01 *	60,4 ± 2,18 *	32,2 ± 1,09 *
100	66,7 ± 2,12 *	78,1 ± 1,57 *	63,4 ± 1,15 *

Tabela 3: Porcentagem de Morte de promastigotas tratadas 1 hora com VTs. * indica diferença significativa entre amostras e controle sem tratamento ($p < 0,005$).

4.2 Conversão das formas Promastigotas em *like*-Amastigotas de *Leishmania*

Para a realização dos ensaios de atividade leishmanicida sobre as formas amastigotas de *Leishmania*, o protocolo descrito por Coelho ET AL. (2003) foi utilizado para a conversão das formas promastigotas em fase estacionária de crescimento para formas *like*-amastigotas.

Dessa forma, para a conversão *in vitro*, 1×10^7 parasitas na forma promastigota em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* foram incubados por 48 horas ou 72 horas (*L. major*) a 34°C com 5% de CO₂. Após, a avaliação das culturas foi feita com a fixação por Metanol 100% e pela coloração com May-Grünwald-Giemsa (Figura 8). A atividade metabólica entre as diferentes espécies e as diferentes formas foi avaliada após incubação com o reagente MTT e por 4 horas (Tabela 4).

Os resultados demonstram alterações morfológicas significativas na morfologia dos parasitas, condizentes com a morfologia de formas amastigotas. Além disso, percebe-se também a mudança no perfil metabólico das culturas de promastigotas em relação às *ike*-amastigotas, o que remete à ocorrência de possíveis modificações nos sistemas metabólicos intracelulares destes parasitas (Figura 8 e Tabela 4).

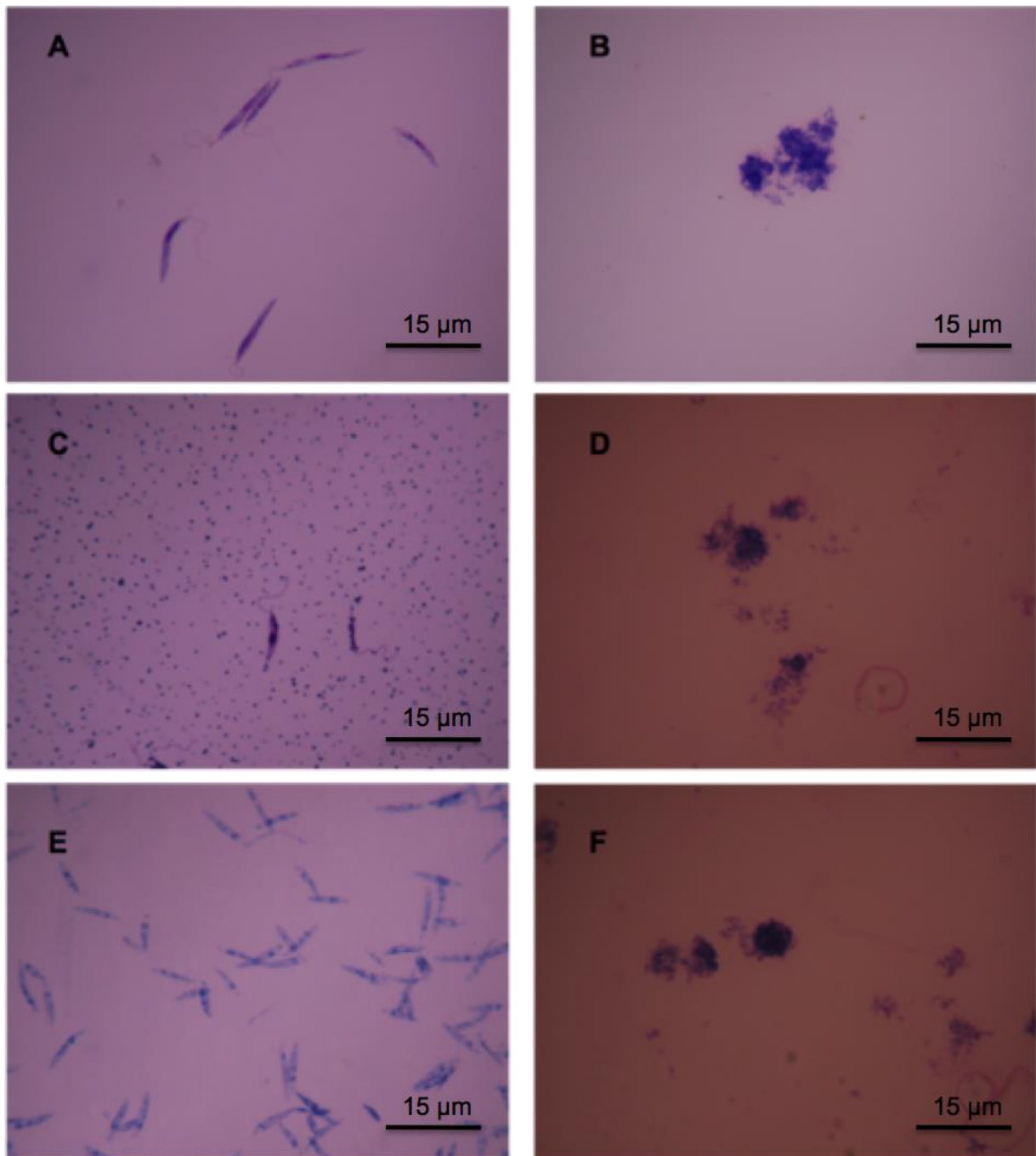


Figura 8: Conversão *in vitro* de Promastigotas em Amastigotas. (A) *L. amazonensis* Promastigota, 100x (zoom 40%), (B) *L. amazonensis* Amastigota, 100x (zoom 40%), (C) *L. chagasi* Promastigota, 100x (zoom 60%), (D) *L. chagasi* Amastigota, 100x (zoom 40%), (E) *L. major* Promastigota, 100x (zoom de 40%). Foi aplicada cerca de 50 µL das culturas em lâminas estéreis e deixadas secar em temperatura ambiente por cerca de 40 min. Em seguida, as lâminas foram levadas a estufa 37 °C por 1 hora, e depois fixadas com metanol 100% (5 min), e coradas por May – Grunwald (1 minuto) e Giensa (10 minutos).

	Promastigota (DO 570 nm)	Like - Amastigota (DO 570 nm)
<i>L.amazonensis</i>	0,876 +- 0,01704	0,577 +- 0,01680
<i>L.chagasi</i>	0,395 +-0,00201	0,605 +- 0,00192
<i>L. major</i>	0,568 +- 0,00239	0,477 +- 0,00217

Tabela 4: Variação na atividade metabólica de *Leishmania* sp. Promastigota e Amastigota. A tabela representa médias de 6 experimentos feitos em triplicatas, sendo que 4×10^6 parasitas/mL, de diferentes formas, mostradas na Figura 7, eram plaquedados em microplacas de 96 poços, e incubados por 4 horas com solução de MTT, solubilizados por 18 horas com SDS-HCl. Por fim, feito a leitura a 570 nm.

4.3 Atividade Leishmanicida do veneno de *T. serrulatus* nas formas *like-amastigotas* de *leishmania*

Após a conversão das formas Promastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* em fase estacionária de crescimento para *like-amastigotas*, as mesmas foram quantificadas e incubadas com concentrações crescentes do VTs. Após, a viabilidade dos parasitas tratados foi analisada pelo ensaio com MTT, de acordo com os mesmos procedimentos descritos para as formas promastigotas (Figura 9). Como controle, a Amphotericina B foi utilizada na concentração de 50 µg/mL.

O veneno de *T. serrulatus* apresentou uma menor alteração na viabilidade das formas *like-amastigotas* das três espécies analisadas (*L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*), quando comparadas às promastigotas; o que demonstra uma maior resistência dessas formas quando comparadas às promastigotas. Entretanto, ainda que mais discreta, o VTs apresentou atividade leishmanicida sobre as formas *like-amastigotas*, que alcançou em torno de 15% dos parasitas.

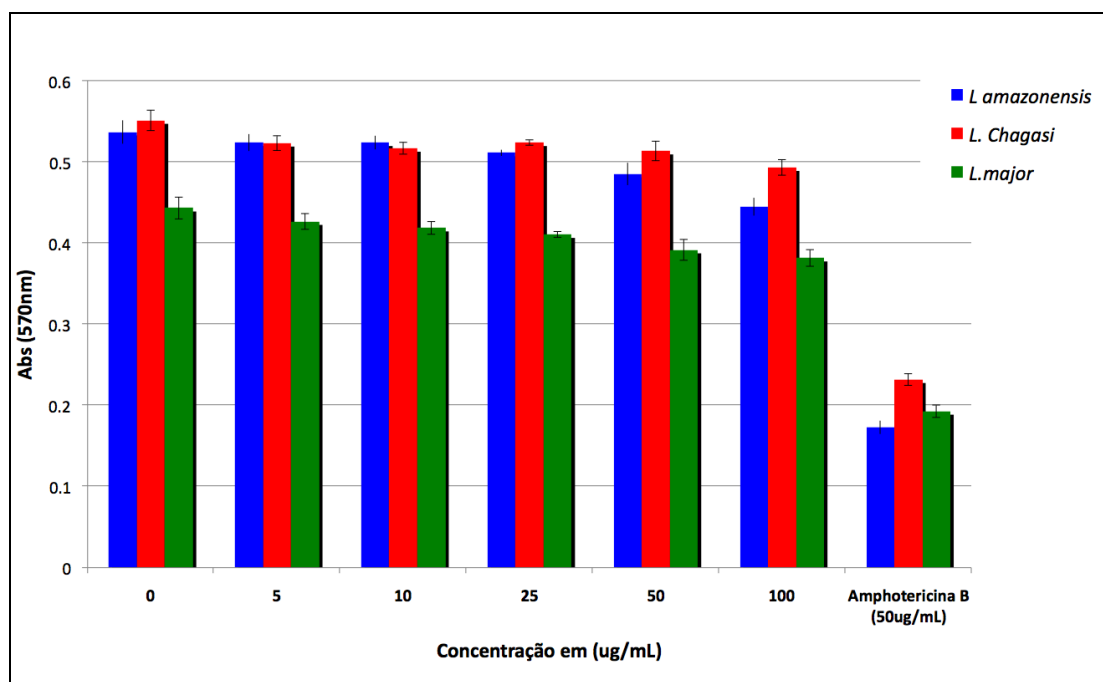


Figura 9: Atividade Leishmanicida de VTs em Amastigotas. Amastigotas foram contadas em câmara de Neubauer em Isoton 1:10 , e 4×10^6 parasitas/mL foram plaqueados em placas de microtitulação de 96 poços. Após isso, os parasitas foram incubados com crescentes concentrações de VTs por 1 hora a 24,5 °C. Após isso, as culturas foram incubadas com solução estéril de MTT por 4 horas a 24,5 °C e solubilizadas por 18 horas com SDS-HCl. Por fim, foi feita a leitura das placas a 570 nm em leitor de ELISA.

Com base nesses resultados, foi calculado a porcentagem de morte dos parasitas tratados, e os dados foram compilados na Tabela 5.

Concentração veneno ($\mu\text{g/mL}$)	% Morte <i>L. amazonensis</i>	% Morte <i>L. chagasi</i>	% Morte <i>L. major</i>
5	$2,4 \pm 0,251$	$5,2 \pm 0,298$	$3,72 \pm 0,202$
10	$2,5 \pm 0,264$	$5,62 \pm 0,2271$	$5,53 \pm 0,247$
25	$4,77 \pm 0,258$	$6,35 \pm 0,2311$	$7,333 \pm 0,185$
50	$9,6 \pm 0,399^*$	$7,44 \pm 0,340^*$	$11,62 \pm 0,303^*$
100	$17,26 \pm 0,624^*$	$10,52 \pm 0,609^*$	$13,88 \pm 0,385^*$

Tabela 5: Porcentagem de morte de Amastigotas tratadas 1 hora com VTs. *

indica diferença significativa entre amostras e controle sem tratamento ($p < 0,005$).

	CE 50% Veneno <i>T. serrulatus</i> ug/mL	CE 50% Amphotericina B ug/mL
<i>L. amazonensis promastigota</i>	57,5	42,3
<i>L. amazonensis amastigota</i>	224,9	41,2
<i>L. chagasi promastigota</i>	30,7	34,6
<i>L. chagasi amastigota</i>	230,2	33,2
<i>L. major promastigota</i>	88	36,8
<i>L. major amastigota</i>	180,4	35,9

Tabela 6: Concentrações efetivas 50% de *Leishmania* sp. tratadas com VTs. A tabela resume os valores de CE 50% (concentração de VTs necessária para levar a morte 50% das células incubadas) para as duas formas das espécies analisadas.

4.4 Análise de Morfologia e Motilidade de Parasitas tratados

A medida que procedemos os experimentos de Atividade Leishmanicida do veneno de *T. serrulatus*, pudemos constatar alterações na morfologia dos parasitas tratados e, além disso, foi notada uma redução na motilidade desses parasitas ao longo do tratamento. Com isso, um experimento foi realizado para a análise da variabilidade morfológica dos parasitas tratados com VTs e também para verificar a capacidade de locomoção dos mesmos. Assim, formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis* foram quantificadas e 4×10^6 parasitas foram incubados com 25 $\mu\text{g/mL}$ de VTs por 20 min. Depois disso, imagens e vídeos das culturas tratadas e não-tratadas foram obtidas e registradas para análise da morfologia das células (Figura 10, e CD anexo).

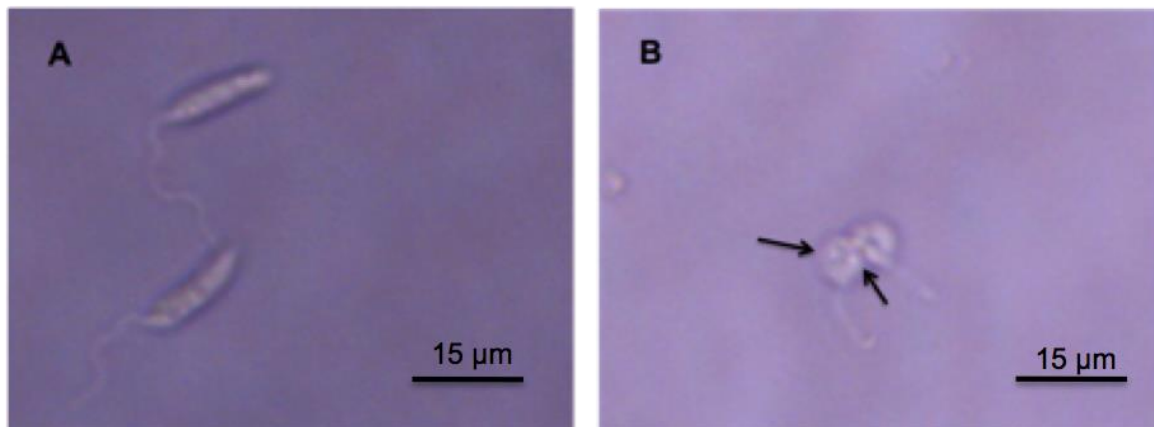


Figura 10: Alteração da Morfologia de Promastigotas Tratadas. (A) Parasitas sem tratamento, controle negativo; (B) Parasitas tratados com VTs. Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na concentração de 4×10^6 parasitas/mL e foram incubadas com 25 µg/mL de VTs por 20 min. Depois disso, as culturas foram aplicadas em lâminas estéreis e fotografadas e filmadas com câmera Sony Cybershot 12 megapixels acoplada a microscópio ótico (aumento de 40x, zoom de 80%) .

Pode-se observar uma clara alteração na morfologia dos parasitas tratados em relação ao controle sem tratamento, mostrando a perda da morfologia natural dos mesmos, uma vez que formas mais arredondadas foram observadas, assim como a presença de estruturas semelhantes a vacúolos autofágicos nas células tratadas (setas de cor preta, Figura 10 B). Além disso, uma nítida redução na capacidade locomotiva dos parasitas tratados foi percebida na maioria das células, com um movimento residual e pouco expressivo (vídeos em CD anexo).

4.5 Avaliação da infectividade das formas promastigotas tratadas com o veneto total de *t. serrulatus*

Com a finalidade de avaliar se o veneno de *T. serrulatus* seria capaz de inibir a infectividade de *Leishmania*, os parasitas, na forma promastigota em fase estacionária de crescimento, foram incubados com o VTs durante a infecção de macrófagos peritoneais. Pela análise da Figura 11, pode-se observar uma redução no número de parasitas internalizados em todas as espécies analisadas, demonstrando que o VTs, possivelmente, apresenta

algum componente que reduz a infectividade dos parasitas. Dessa forma, 100 macrófagos foram quantificados por cada lâmina e os valores da porcentagem de macrófagos infectados e do número de parasitas interiorizados por macrófago, sem e com o tratamento com o VT, foram utilizados para a confecção da Tabela 7.

O tratamento das culturas resultou em uma redução significativa na porcentagem de macrófagos infectados, sendo que essa redução chegou próxima a 50% quando a espécie *L. amazonensis* foi avaliada e em torno de 20% nas espécies *L. chagasi* e *L. major*. Observou-se também uma redução do número de parasitas por macrófago infectado, fato que se mostrou também muito expressivo em todas as espécies analisadas, dentre as quais na espécie *L. amazonensis* houve uma redução de 50% do número de parasitas por macrófago e de cerca de 25% em *L. chagasi* e 40% em *L. major*.

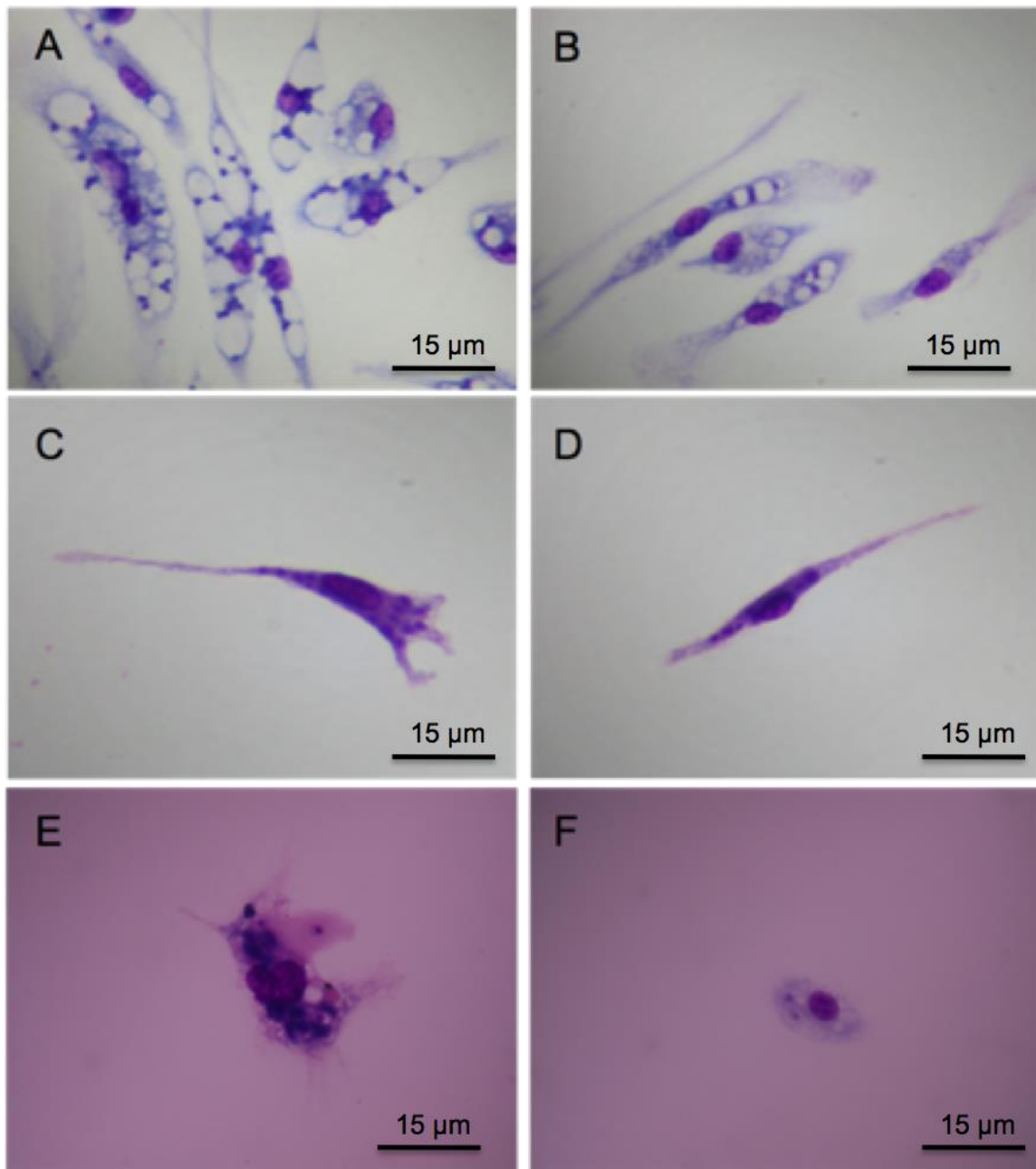


Figura 11: Redução da capacidade infecciosa de promastigotas tratados com VTs. Promastigotas em fase estacionária foram contadas em câmara de Neubauer, e 2×10^7 parasitas foram incubados junto com 2×10^6 macrófagos e, durante a infecção de 4 horas, as culturas foram tratadas com 20 µg/mL de VTs. Após isso, as culturas foram lavadas, para retirada de parasitas não internalizados, e as células eram fixadas com Metanol 100% (5 min) 1 May-Grunwald (5 min) e Giemsa (10 min). Imagens foram com câmera Sony Cybershot 12 megapixels acoplada a microscópio ótico (aumento de 100x, zoom de 40%). (A) infecção com *L. amazonensis*, (B), infecção com *L. amazonensis* e VTs, (C) infecção com *L. chagasi*, (D) infecção com *L. chagasi* e VTs, (E) infecção com *L. major*, (F) infecção com *L. major* e VTs.

	% MΦ infectados	Nº parasitas/MΦ
<i>L. amazonensis</i>	84	12
<i>L. amazonensis</i> + 20ug/mL VTs	40,5	6,2
<i>L. chagasi</i>	77	9,2
<i>L. chagasi</i> + 20ug VTs	54	6,74
<i>L. major</i>	64	5,4
<i>L. major</i> + 20ug de VTs	44	3,3

Tabela 7 : Porcentagem de macrófagos infectados com as formas promastigotas em fase estacionária de crescimento e a relação do número de parasitas por macrófago infectado. Após a confecção das lâminas, 100 macrófagos por lâmina foram quantificados e a porcentagem de macrófagos infectados e o número de parasitas por macrófago foi determinado.

4.6 Avaliação da infectividade das formas amastigotas tratadas com o veneto total de *t. serrulatus*

Com os resultados obtidos na redução da infectividade das formas promastigotas em fase estacionária de crescimento, a redução da infectividade das formas *like*-amastigotas com o tratamento com VTs foi testada seguindo o protocolo descrito no item anterior. Os parasitas foram incubados com o VTs durante a infecção em macrófagos peritoneais na proporção de 1 macrófago para 10 *Leishmanias* e a incubação se processou por 4 horas (Figura 12).

Pode-se observar uma redução no número de parasitas internalizados nas culturas tratadas com VTs, em comparação com o controle de infecção, em todas as espécies analisadas (*L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*).

Outro dado importante é a manutenção da capacidade infecciosa das formas amastigotas transformadas, dado esse que, junto com outros demonstrados anteriormente, valida a conversão *in vitro* desses parasitas.

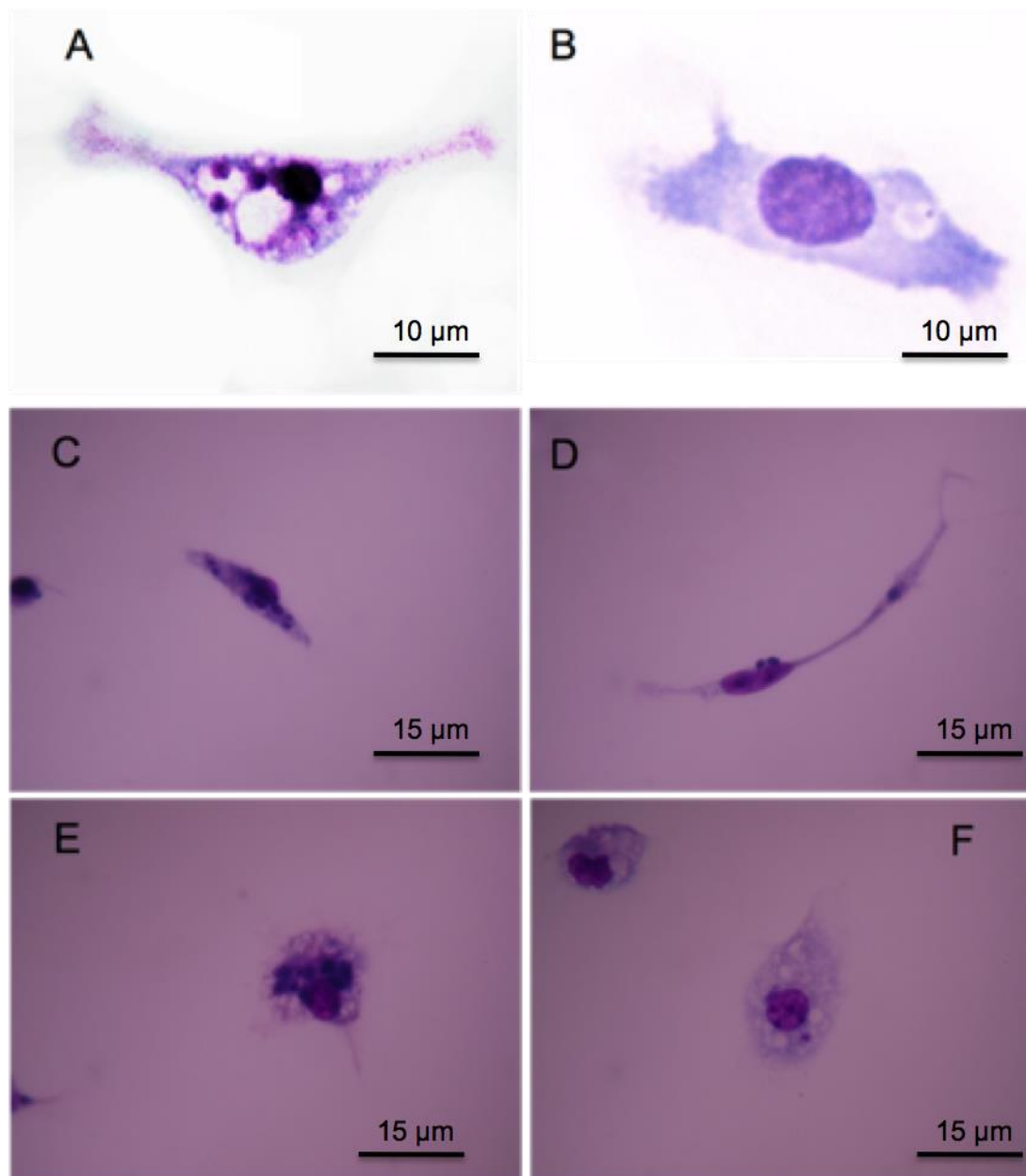


Figura 12: Redução da infectividade das formas *like*-amastigotas após tratamento com o veneno total (VT) de *T. serrulatus*. Formas *like*-amastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* foram quantificadas e 2×10^7 parasitas foram tratadas com 20 µg/mL do VT e posteriormente incubadas com 2×10^6 macrófagos e, novamente incubadas por 4 horas. Após, as culturas foram lavadas para retirada dos parasitas não-internalizados e as células foram fixadas com metanol 100% (5 min) coradas com May-Grünwald-Giemsa. Imagens foram feitas com o auxílio da câmera Sony Cybershot 12 megapixels, acoplada a um microscópio ótico (aumento de 100x, zoom de 40%). (A) infecção com *L. amazonensis*; (B) infecção com *L. amazonensis* e VT (zoom 60%); (C) infecção com *L. chagasi*; (D) infecção com *L. chagasi* e VT; (E) infecção com *L. major*; (F) infecção com *L. major* e VT.

Como descrito anteriormente, 100 macrófagos por lâmina foram quantificados e a porcentagem do número de macrófagos infectados e a relação entre o número de parasitas por macrófago infectado foram calculados e expostos na Tabela 8.

Pode-se observar uma redução significativa no número de macrófagos infectados em todas as espécies analisadas com uma porcentagem de morte de cerca de 47% em *L. amazonensis*, 44% em *L. chagasi* e 49% em *L. major*. A redução do número de parasitas por macrófago foi ainda maior para as espécies *L. chagasi* (66%) e *L. major* (65%) e de cerca de 27% para a espécie *L. amazonensis*.

Dessa forma, os dados apresentados permitem inferir que, tanto para as formas promastigotas quanto *like*-amastigotas, o VTs possui atividade que inibe a internalização dos parasitas e a consequente infecção por essas espécies.

	% MΦ infectados	Nº parasitas/MΦ
<i>L. amazonensis</i>	60	3,7
<i>L. amazonensis</i> + 20ug/mL VTs	31,5	2,7
<i>L. chagasi</i>	62	6
<i>L. chagasi</i> + 20ug VTs	35	2
<i>L. major</i>	65,6	4
<i>L. major</i> + 20ug de VTs	34	1,4

Tabela 8 : Porcentagem de macrófagos infectados com as formas *like*-amastigotas de *Leishmania* e a relação do número de parasitas por macrófago infectado. Após a confecção das lâminas, 100 macrófagos por lâmina foram quantificados e a porcentagem de macrófagos infectados e o número de parasitas por macrófago foi determinado.

4.7 Purificação do veneno de *T. serrulatus*

Veneno total de *T. serrulatus* foi submetido a cromatografia por Gel Filtração em coluna Sephadex G50. Cerca de 80 mg de veneno total foi submetido a extração ácida, com ácido acético, conforme descrito em Materiais e Métodos, e aplicado em coluna de vidro de cerca de 1,20 m. Após a coleta (de 1 mL/tubo), os conteúdos coletados foram levados a espectrofotômetro, e com a leitura, a 280 nm, foi confeccionado a Figura 12.

O perfil obtido foi semelhante ao cromatograma mostrado por Chávez-Olórtegui ET AL. 1992, e o conteúdo dos picos, chamados de F1, F2, F3 F4 e F5, respectivamente, foi submetido a análise em espectrometria de massas.

A análise de toxicidade das frações em Swiss demonstrou a toxicidade de VTs, F2 e F3, causando sintomas como tremores, salivação, diarreia e morte dos animais. Porém, não foi observado nenhum sinal de toxicidade nos animais inoculados com F1 e F4 durante 48 horas.

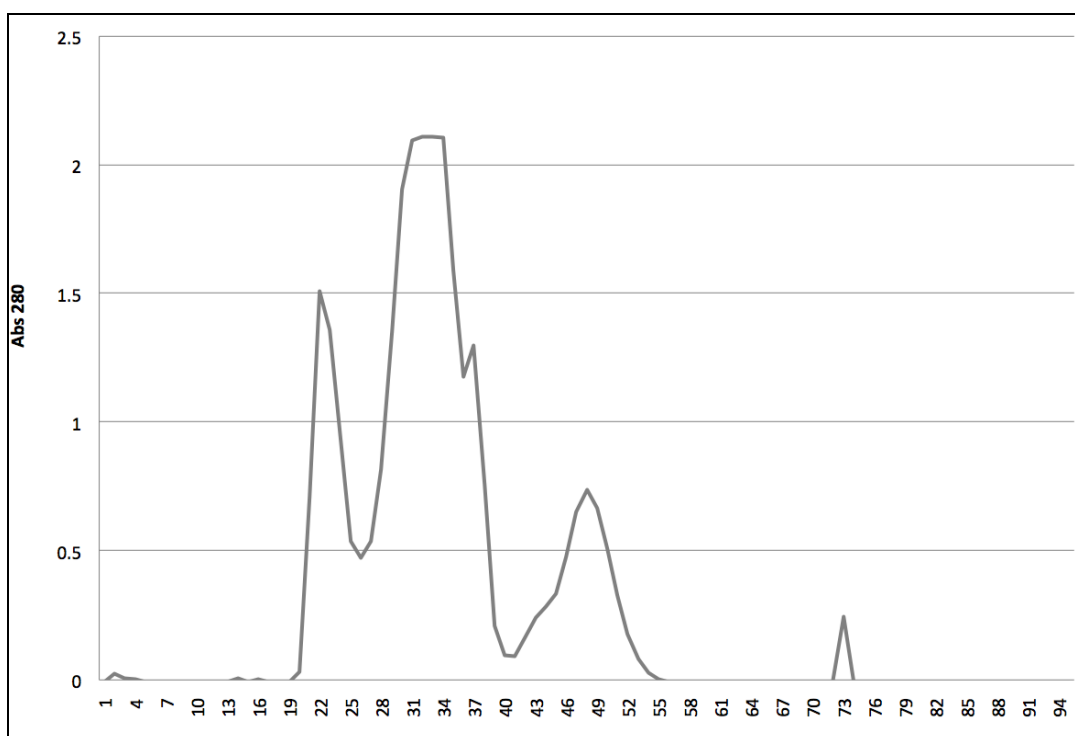


Figura 13: Purificação de 80 mg de veneno de *T. serrulatus* em Sephadex G50. Após a coleta, os picos foram liofilizados e dosados pelo método de Lowry, descrito em Materiais e Métodos.

4.8 Análise de frações purificadas por MALDI-TOF-TOF

Após purificação, algumas frações obtidas foram analisadas por espectrometria de massas por MALDI-TOF-TOF no Centro de Biomoléculas ICB – UFMG. Um micro-cromatografia de fase reversa (em Acetonitrila 50%) em ZIP TIP foi realizada com as frações F2 e F4 e, após isso, as amostras foram analisadas em seu conteúdo molecular (Figura 13 e Figura 14).

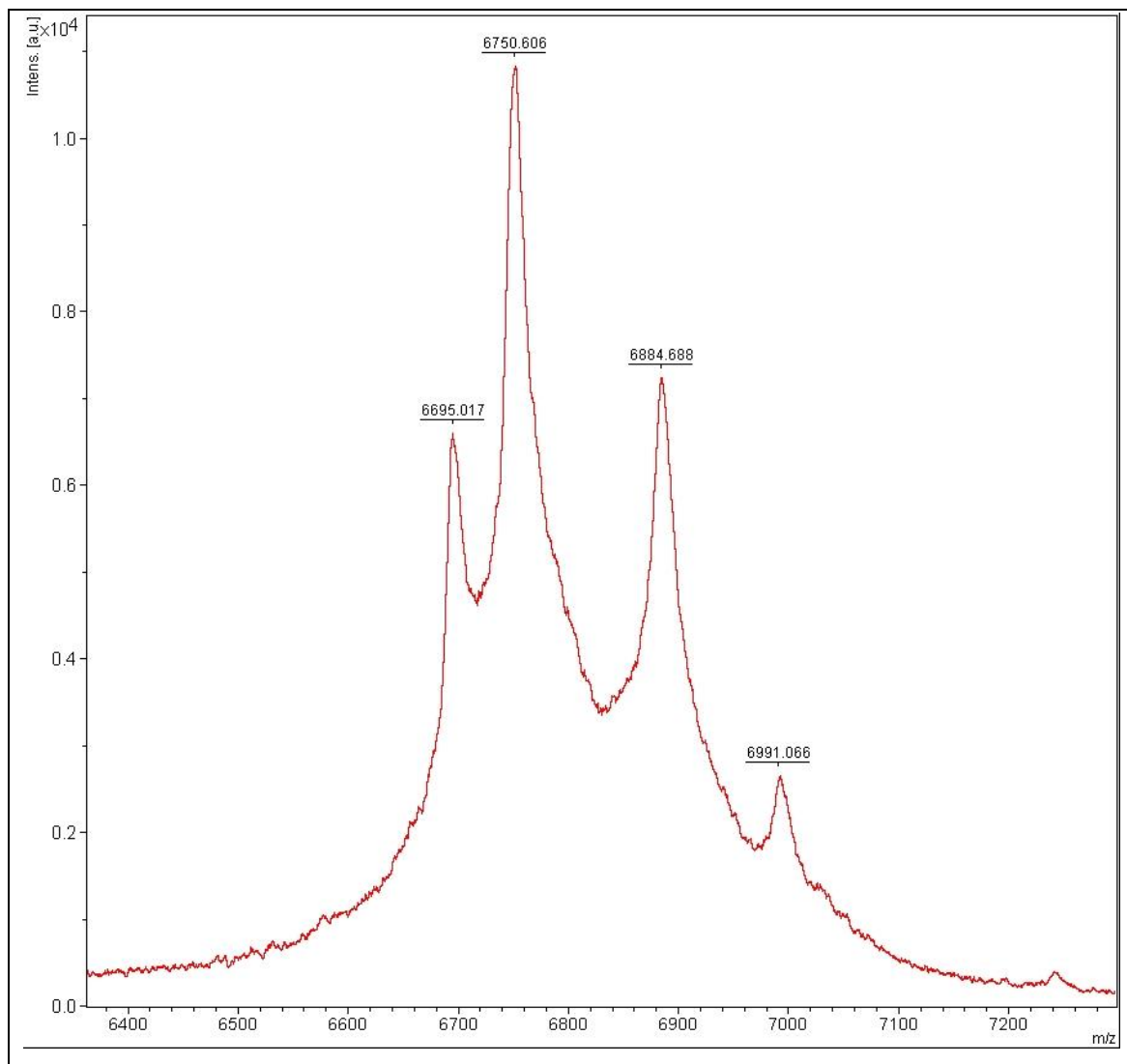


Figura 14: Espectro de Massas por MALDI-TOF-TOF da fração correspondente a F2.

O perfil molecular obtido na F2 foi um perfil “clássico” correspondendo à fração denominada, pela literatura, FG50. Sendo que foram detectadas as massas de toxinas mais bem descritas, como TsVII (6.884,688), TsNTxP (6.750,606), TsNTxP_{NH2} (6.695,017) e TsII (6.991,066).

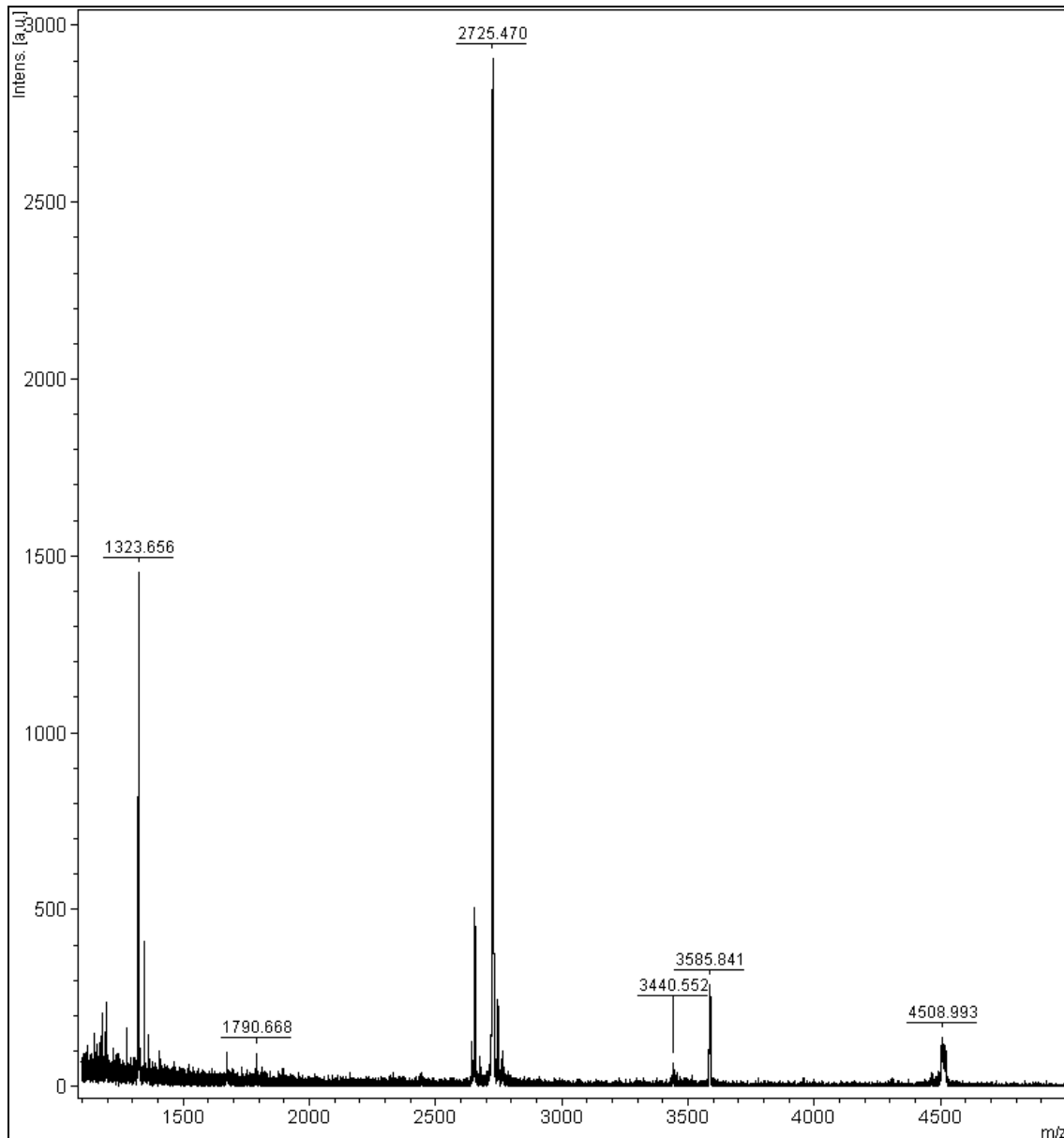


Figura 15: Espectro de Massas por MALDI-TOF-TOF da fração correspondente a F4.

O perfil molecular de F4 apresentou peptídeos de menor tamanho, com menor informação a respeito. Porém, foi possível identificar massas que

pertencem a faixas de grupos de proteínas com ação um pouco conhecida, como à família de Hipotensinas (TsHpT), que tem a faixa de 2.600 – 2.800 Da (massa encontrada de 2.725,470 Da) (Verano-Braga ET AL. 2008), assim como a Família de peptídeos antimicrobianos, que vão de 1.000 a 3.000 Da (Pimenta & De Lima ET AL. 2005); além de massas coerentes a massas pertencentes a família de toxinas ativas em canal para potássio (KTx) (3.000 – 5.000 Da), como a massas encontradas de 3.585,841 Da, 3.440,552 Da com cerca de 29 a 34 resíduos de aminoácidos e 4508,993 Da, correspondendo a Butantoxina. Vale ressaltar que, freqüentemente, TsHpT e peptídeos antimicrobianos estão presentes em pouquíssimas concentrações no veneno de artrópodes, e que a fração F4 demonstrou conteúdo semelhante a frações ricas em toxinas ativas em canal para potássio, conforme descrito na literatura (Pimenta ET AL. 2001).

4.9 Atividade Leishmanicida de frações Purificados do Veneno de *T. serrulatus*

Após, purificação por Sephadex G50, as frações obtidas foram testadas quanto a possível atividade anti-Leishmania, usando-se a concentração de 50 µg/mL. Para o ensaio foram utilizadas as frações denominadas F1, F2, F3 e F4, seguindo protocolo idêntico ao utilizado para o ensaio de atividade Leishmanicida para o veneno de *T. serrulatus* (Figura 16). Nesse ensaio, foram usados tanto promastigotas em fases estacionária de crescimento, quanto formas *like*-amastigotas das três espécies de Leishmania, convertidas a partir de promastigotas, e Amphotericina B foi usado como controle positivo, também na concentração de 50 µg/mL.

Na Figura 16, pode-se observar que as frações apresentaram atividade leishmanicida diferenciada, sendo que a fração F1 apresentou a menor atividade de morte dos parasitas, enquanto que a fração F4 demonstrou a maior atividade alcançado valores similares aos observados com a anfotericina B, próximo a 100% de morte para formas promastigotas de *L. amazonensis* e de cerca de 90% para as formas *like*-amastigotas dessa espécie. A fração F4

também apresentou atividade semelhante à anfotericina B em relação às espécies *L. major* e *L. chagasi*, tanto nas formas promastigotas e *like*-amastigotas. A fração F2 demonstrou atividade leishmanicida discreta (entre 10 e 25%) e a fração F3 demonstrou uma atividade intermediária entre as observadas para as frações F4 e F2; sendo que as formas promastigotas mostraram-se mais sensíveis em relação às *like*-amastigotas em todas as espécies analisadas.

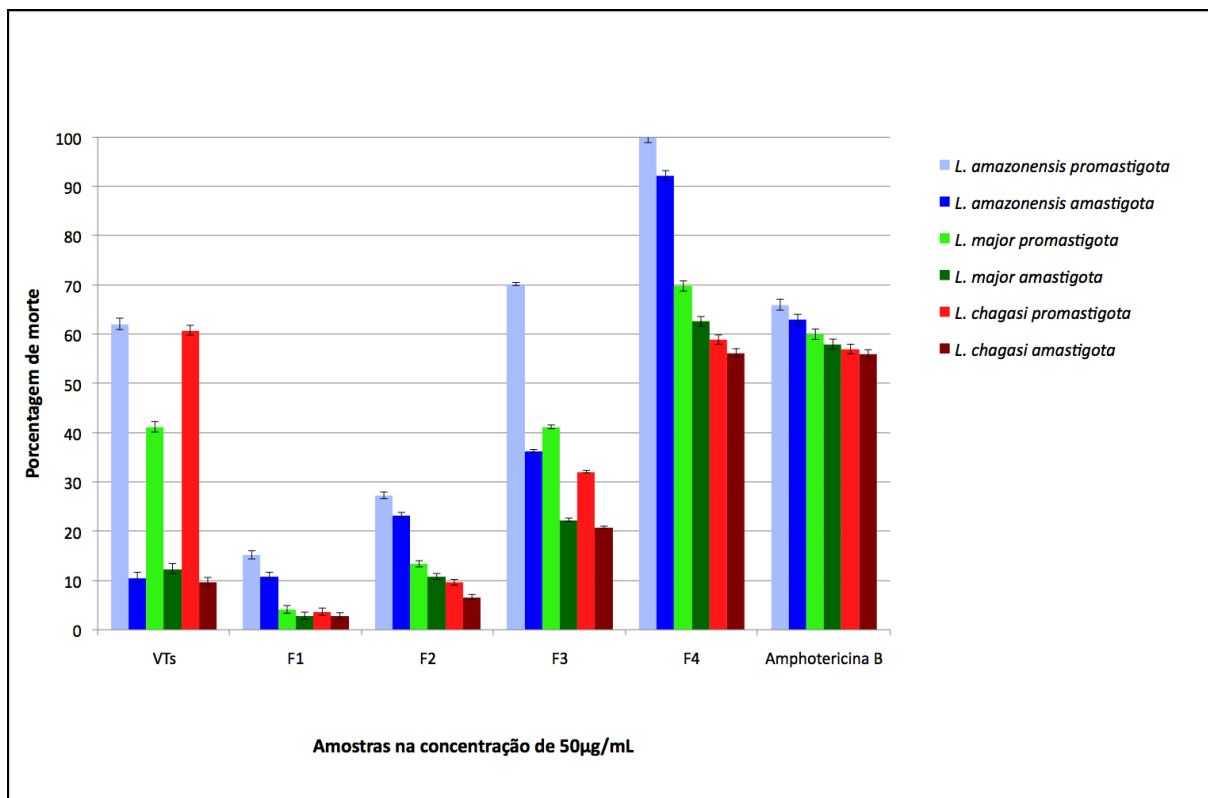


Figura 16: Atividade leishmanicida de Frações purificadas por Sephadex G50 do veneno de *T. serrulatus*. Formas promastigotas em fase estacionária de crescimento e formas *like*-amastigotas foram quantificadas e 4×10^6 parasitas/mL foram incubados com 50 µg/mL de cada fração purificada, por 1 hora e a 24°C. Após, as culturas foram incubadas com uma solução de MTT (2 µg/mL) por 4 horas a 24°C e solubilizadas por 18 horas com uma solução de SDS 10% / HCl 0,01 M. A leitura das placas foi realizada em comprimento de onda a 570 nm.

4.10 Citotoxicidade em macrófagos de frações purificadas

Para avaliar a citotoxicidade das frações purificadas do VT de *T. serrulatus* em relação às células de mamíferos, macrófagos peritoneais foram preparados e incubados com 50 µg das frações purificadas e o ensaio de viabilidade celular foi realizado de maneira similar ao descrito para os ensaios de atividade leishmanicida. Os resultados foram calculados em porcentagem de morte e conforme a equação descrita no item 3.4. Na análise da figura 17, pode-se observar que as frações purificadas de VTs não apresentaram toxicidade em macrófagos, mantendo a grande maioria das células viáveis (com o valor mínimo de 95% de viabilidade para todas as frações).

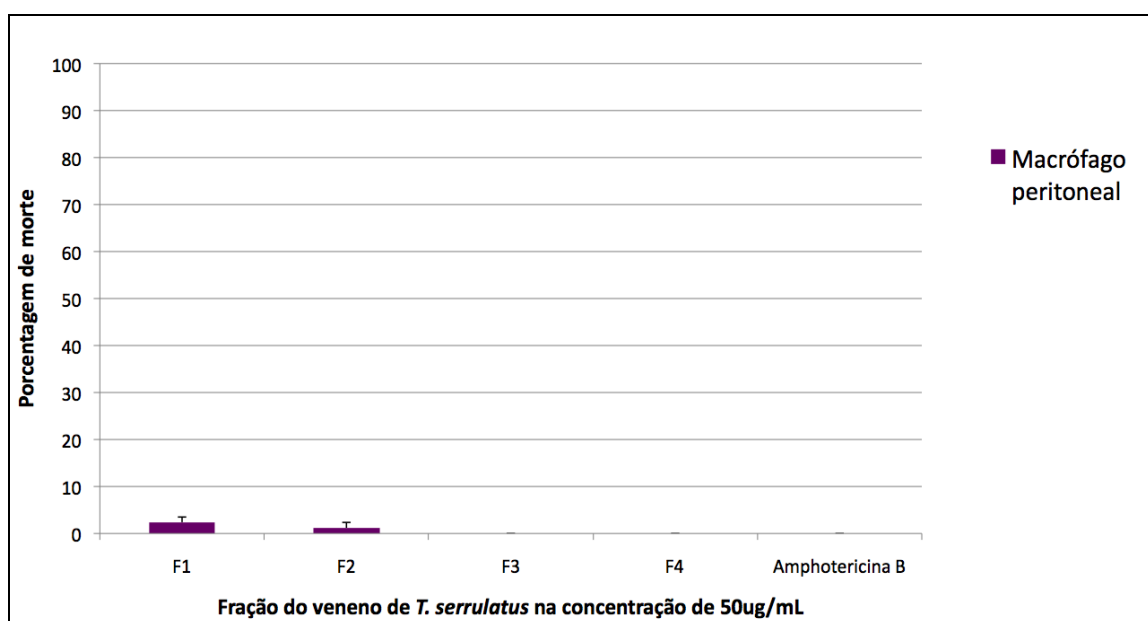


Figura 17: Citotoxicidade em macrófagos de Frações purificadas de VTs por Sephadex G50. Macrófagos peritoneais foram quantificados e 4×10^6 células foram plaqueadas em meio RPMI 1640 completo em placas de cultura celular de 96 poços. Após a adesão por 2 horas a 37°C e 5% de CO₂, as culturas foram lavadas 3 vezes com meio RPMI 1640 incompleto e ambientadas por 24 horas a 37°C, com 5% CO₂. Em seguida, foram incubadas com 50 µg/mL com cada fração purificada a 37°C com 5% CO₂ e o ensaio de viabilidade celular foi realizado com MTT, entretanto, alterando-se apenas a temperatura de incubação com a solução de MTT, que foi feita em estufa 37°C e 5% CO₂. A porcentagem de morte foi calculada de acordo com a equação descrita no item 3.4.

4.11 Western-blot para a detecção da expressão da enzima iNOs em macrófagos tratados

Recentemente, Petricevich e colaboradores, demonstraram que o veneno de *T. serrulatus*, FG50 e TsVII não são tóxicos para macrófagos peritoneais murinos, e que conseguem levar essas células a ativação, com produção de algumas citocinas (IL-1, IL-6, para VTs e FG50 e TNF, para FG50), com aumento cíclico de cálcio intracelular (TsVII) (Petricevich ET AL. 2005 e 2008). Nos mesmos trabalhos citados, foi analisada a produção de óxido nítrico, mas não foi verificada a expressão da enzima Óxido Nítrico Sintase induzível (iNO). Com isso, decidimos avaliar a ativação de macrófagos peritoneais, via FG50 e F4, através de Western-Blot para a detecção da expressão de iNOs em macrófagos tratados e/ou infectados com *L. amazonensis*.

A Figura 18 mostra o resultado da ativação de macrófagos via iNOs com incubação de 50 µg/mL de FG50, sendo que as culturas infectadas com *L. amazonensis* também foram tratadas e 1 µg/mL de LPS foi usado como controle. Nota-se também um leve aumento no nível de expressão de iNOs em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, porém, esse aumento é mais perceptível em macrófagos tratados com FG50. Macrófagos infectados com *L. amazonensis* e submetidos ao tratamento com FG50 apresentaram detecção comparável ao controle positivo, no caso, macrófagos tratados com LPS.

Após a obtenção das imagens, as bandas foram analisadas por densitometria pelo programa GelEval 1.22, e os resultados estão apresentados na Tabela 9, que confirmam o aumento de expressão de iNOs com o tratamento com 50 µg/mL de FG50 e reafirmam que a ativação de macrófagos através de FG50 é mais pronunciada quando essas células são infectadas com *L. amazonensis*.

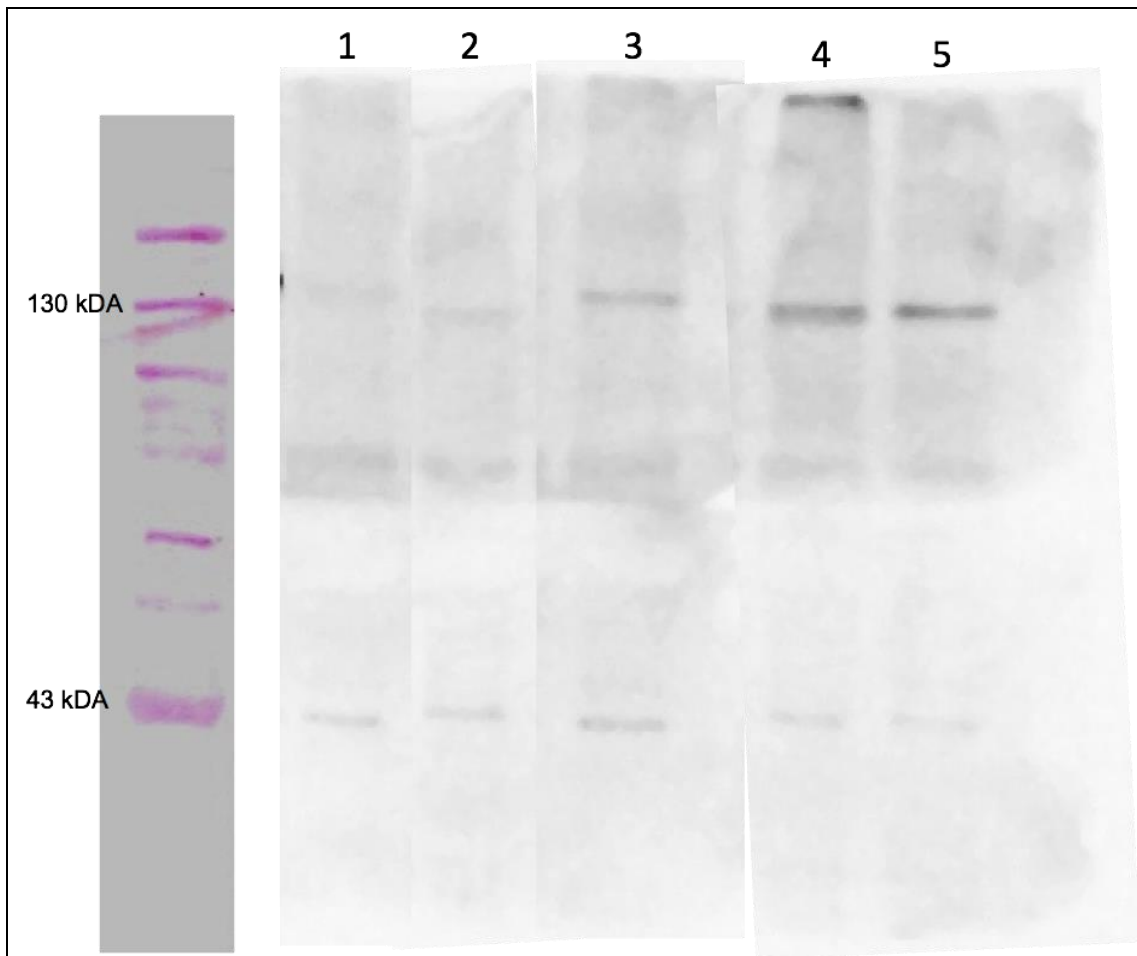


Figura 18: Avaliação da ativação de macrófagos tratados com FG50. (1) Macrófagos sem tratamento; (2) Macrófagos infectados com *L. amazonensis*; (3) Macrófagos tratados com FG50; (4) Macrófagos infectados tratados com FG50; (5) Macrófagos tratados com LPS. Culturas de macrófagos (2×10^6 cel/mL) foram tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ de FG50, ou 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS por 24 horas em estufa 37 °C com 5% CO_2 . Após isso, foi confeccionado um Gel de Eletroforese com 25 μg do lisado celular centrifugado, e feito imunodeteccao via Western Blot, usando monoclonal anti-iNOs (Sigma), na diluição 1:5000, anti- β actina (Santa Cruz Biotechnonology), na diluição de 1:500. O perfil mais a esquerda na figura representa o marcador molecular, sinalizando as massas próximas de iNOs (130 KDa) e β actina (43 KDa).

Anti-iNOs	Área	Densidade	Densidade média
Mφ	135	22,77	0,168
Mφ/L. <i>amazonensis</i>	135	23,22	0,172
Mφ + FG50	135	38,68	0,223
Mφ/L. <i>amazonensis</i> + FG50	135	43,49	0,322
Mφ + LPS	135	42,11	0,311
Anti-β Tubulina	Área	Densidade	Densidade média
Mφ	66	33,78	0,12
Mφ/L. <i>amazonensis</i>	66	40,39	0,123
Mφ + FG50	66	38,63	0,168
Mφ/L. <i>amazonensis</i> + FG50	66	13,33	0,112
Mφ + LPS	66	18,77	0,099

Tabela 9: Densitometria referente a bandas da imagem de Western Blot da Figura 18. A imagem foi analisada através do Software GelEval 1.22; sendo que Mφ se refere a 1, na figura 17; Mφ/L. *amazonensis* se refere a 2, Mφ + FG50 se refere a 3, Mφ/L. *amazonensis*+ FG50 se refere a 4, Mφ + LPS se refere a 5.

Após esses resultados, foi avaliada a capacidade de ativação de macrófagos, via iNOs, pela fração denominada F4. Para isso, culturas de macrófagos foram incubadas por 24 horas, em estufa 37 °C com 5% CO₂, com 50 µg/mL de F4, ou 50 µg/mL de FG50, co-tratamento com 50 µg/mL de F4 mais 50 µg/mL de FG50; 1 µg/mL de LPS e co-tratamento com 50 µg/mL de F4 mais 1 µg/mL de LPS (Figura 19). Após obtenção da imagem de Western Blot, as bandas foram analisadas em sua densitometria pelo programa GelEval 1.22, e os resultados estão apresentados na Tabela 10.

A Figura 19, junto com a Tabela 10 mostram que o tratamento de macrófagos com F4 causa um aumento discreto nos níveis de iNOs, sendo que o co-tratamento com F4 e FG50, e com F4 e LPS não impede a ativação dessas células, via iNOs.

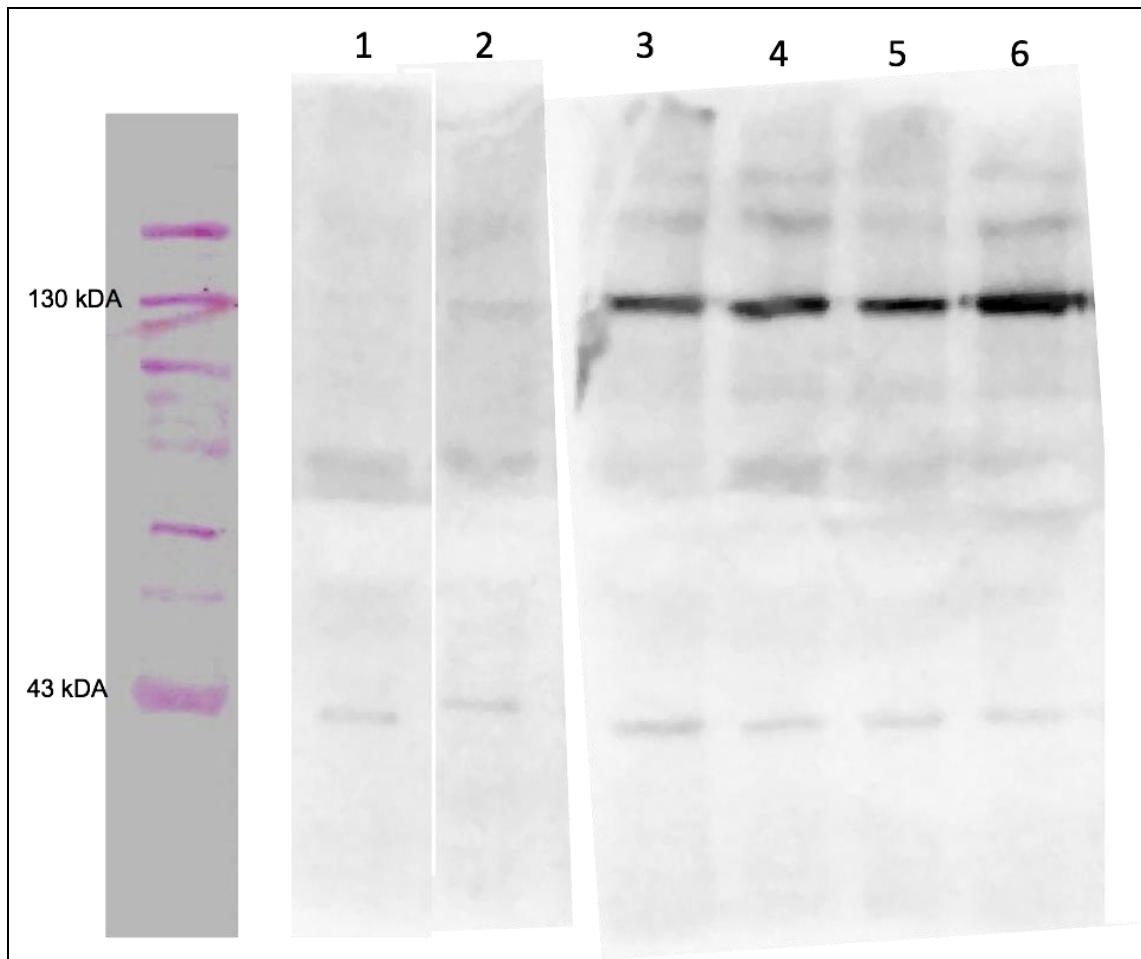


Figura 19: Avaliação da ativação de macrófagos tratados com F4. ((1) Macrófagos sem tratamento; (2) Macrófagos tratados com F4; (3) Macrófagos tratados com FG50; (4) Macrófagos tratados com FG50 + F4; (5) Macrófagos tratados com LPS + F4; (6) Macrófagos tratados com LPS. Culturas de macrófagos (2×10^6 céls/mL) foram tratadas com $50 \mu\text{g/mL}$ de frações (FG50 e F4) separadas ou em co-tratamento, $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS ou co-tratamento com $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS mais $50 \mu\text{g/mL}$ de F4 por 24 horas a 37°C e com $5\% \text{CO}_2$. Após isso, foi confeccionado um gel SDS-PAGE a 7% e cerca de $25 \mu\text{g}$ do lisado celular foi aplicado e submetido posteriormente ao Western-Blot, com a utilização do anticorpo monoclonal anti-iNOs (Sigma), na diluição 1:5.000 e anticorpo anti- β actina (Santa Cruz Biotechnonology), na diluição de 1:500. O perfil à esquerda, na figura, representa o marcador molecular, no qual alguns pesos moleculares próximos de iNOs (130 KDa) e β actina (43 KDa) são mostrados.

Anti-iNOs	Área	Densidade	Densidade média
Mφ	1.115	169,69	0,146
Mφ + F4	1.115	245,71	0,212
Mφ + FG50	1.115	690,67	0,597
Mφ + FG50 + F4	1.115	786,51	0,68
Mφ + LPS + F4	1.115	796,7	0,689
Mφ + LPS	1.115	1031,68	0,893
Anti-β Tubulina	Área	Densidade	Densidade média
Mφ	640	91,55	0,143
Mφ + F4	640	98,12	0,153
Mφ + FG50	640	100,87	0,157
Mφ + FG50 + F4	640	75,71	0,118
Mφ + LPS + F4	640	71,25	0,111
Mφ + LPS	640	68,15	0,106

Tabela 10: Densitometria referente a bandas da imagem de Western Blot da Figura 19. A imagem foi analisada através do Software GelEval 1.22; sendo que Mφ se refere a 1, na figura 18; Mφ + F4 se refere a 2, Mφ + FG50 se refere a 3, Mφ + F4 + FG50 se refere a 4, Mφ + F4 + LPS se refere a 5, e , Mφ + LPS se refere a 6.

4.12 Tratamento in vitro com FG50 de macrófagos infectados com *Leishmania* sp.

Já é bem descrito na literatura que o principal mecanismo Leishmanicida de células infectadas por esse parasita, incluindo macrófagos, é a produção de óxido nítrico, via aumento da expressão de iNOs (David Sacks & Nancy Noben-Trauth 2002). Demonstramos, nos resultados exibidos nas Figuras 18 e 19, e nas Tabelas 9 e 10, que a fração denominada FG50, foi eficaz em estimular macrófagos peritoneais murinos a aumentar os níveis de iNOs, sendo que esse aumento foi ainda maior em macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Com isso, decidimos realizar tratamento *in vitro* de macrófagos infectados com *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* para avaliação se essa ativação de

macrófagos via FG50 é eficaz em levar a morte de parasitas intracelulares. Para isso, macrófagos peritoneais foram tratados, ou não, com FG50 e Amphotericina B, ambos a 50 µg/mL, por 48 horas em estufa 37 °C com 5% CO₂. Após isso, as culturas foram fixadas com Paraformaldeído 4% por 15 min, tratadas com 200 µg/mL de RNase por 30 min a 37 °C. Por fim, foi feita a marcação com solução de Laranja de acridina (3 µg/mL) por 5 min no escuro, em seguida as lamínas foram levadas ao microscópio confocal (Carl Zeiss LSM META), do Departamento de Morfologia e Histologia do ICB – UFMG (Figura 20, 21, 22 e 23). Esse tipo de marcação com Laranja de Acridina consegue diferenciar DNA íntegro de DNA apoptótico e/ou fragmentado, já que a interação desse marcador com DNA fita dupla difere da interação com DNA fita simples. Com isso, quando esse mesmo marcador é submetido a excitação por laser (488 nm), moléculas de Laranja de Acridina complexadas com DNA íntegro (fita dupla) emitem fluorescência na faixa de 525 nm (espectro na faixa da cor verde), enquanto que moléculas de Laranja de Acridina complexadas com DNA apoptótico (fita simples) emitem fluorescência na faixa de 650 nm (espectro na faixa da cor vermelho). Com isso, núcleo que possuem a marcação predominantemente esverdeado, representam células que estão viáveis, já núcleos celulares que se apresentam alaranjados e/ou vermelhos, representam células em processo apoptótico, ou de morte celular.

Na Figura 20 são apresentadas imagens de macrófagos infectados sem qualquer tratamento, onde pode-se perceber que após 48 horas de infecção os parasitas intra-celulares permanecem viáveis nas três espécies analisadas, no caso, *L. amazonensis* (Figura 20A), *L. chagasi* (Figura 20C) e *L. major* (Figura 20E).

O tratamento dos macrófagos infectados por meio da fração FG50, por 48 horas, conseguiu causar a morte de parasitas intracelulares nessas células parasitadas (Figura 21). As três espécies de *Leishmania* analisadas, *L. amazonensis* (Figura 21A), *L. chagasi* (Figura 21C) e *L. major* (Figura 20E) foram susceptíveis ao tratamento com 50 µg/mL de FG50 indicando que a ativação de macrófagos, via iNOs, pela fração FG50 atingiu níveis suficientes de produção de NO para levar a morte das três espécies dos parasitas.

A Figura 22 mostra imagens de culturas de macrófagos infectados com *Leishmania* e tratadas com 50 µg/mL de Amphotericina B, por 48 horas. Nas imagens (22A, 22C e 22E) pode-se perceber a presença de núcleos apoptóticos de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*, respectivamente. Diferente da estratégia feita com FG50, o tratamento com anfotericina B visa o efeito direto desse fármaco sobre os parasitas intra-macrófagos, já que essa molécula tem caráter hidrofóbico e consegue transpor membranas celulares.

Macrófagos peritoneais murinos não apresentaram toxicidade frente ao tratamento com 50 µg/mL de FG50 nem com 50 µg/mL de Amphotericina B por 48 horas, demonstrando que essas células também são resistentes a tratamento com esses compostos tanto em curto prazo, (Figura 17), quanto a longo prazo, 48 horas (Figura 23, C e E).

Outro fato que deve ser mencionado é o aumento da vacuolização de macrófagos tratados com FG50, quando comparados com macrófagos não tratados, tal fato também está relacionado com a ativação dessas células e também foi observado por Petricevich ET AL. 2008.

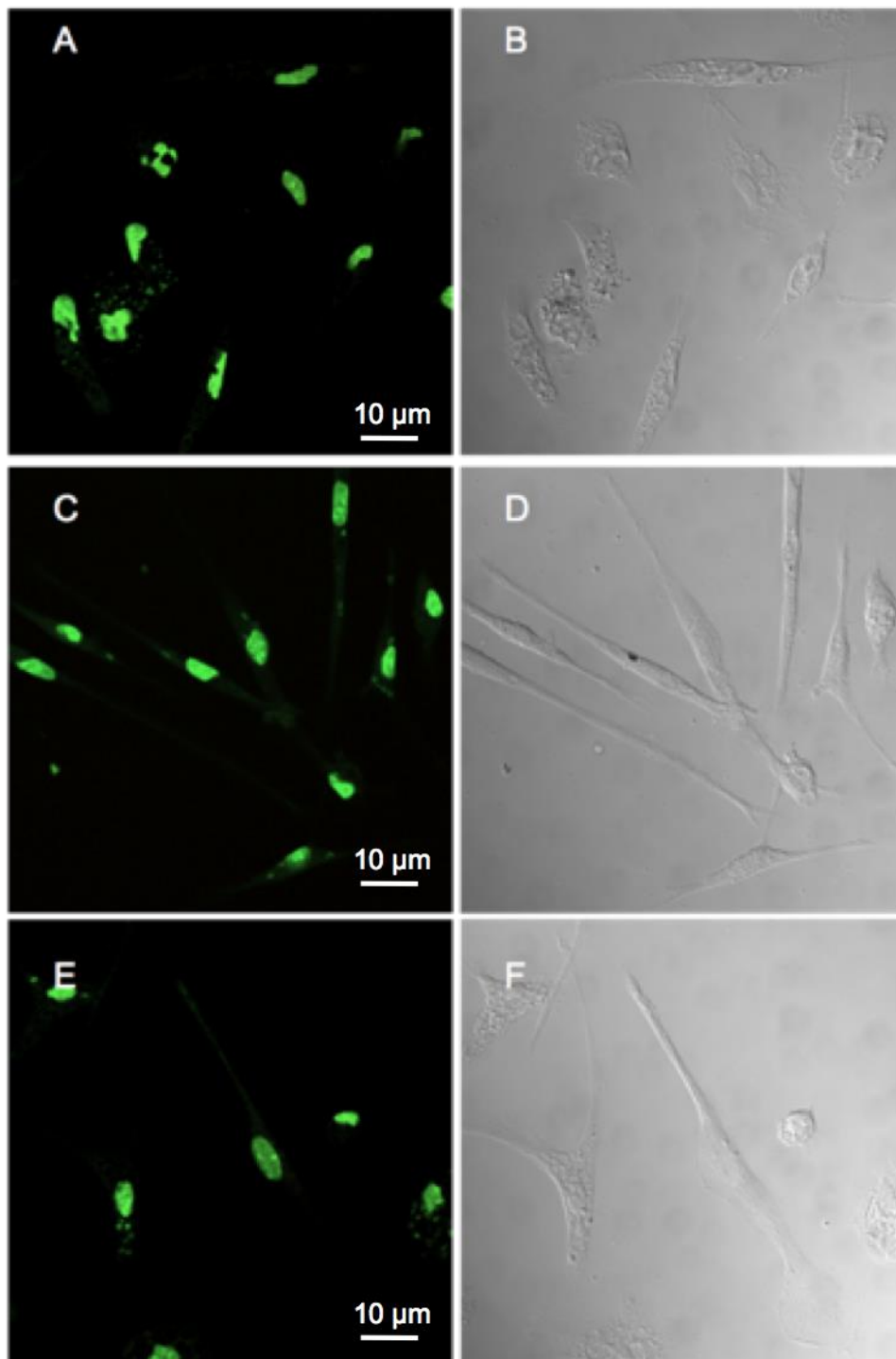


Figura 20: Marcação com Laranja de Acridina de Macrófagos infectados. (A) MΦ infectados com *L. amazonensis*, (B) Aspecto da cultura de A; (C) MΦ infectados com *L. chagasi*, (D) Aspecto da cultura de C; (E) MΦ infectados com *L. major*, (F) Aspecto da cultura de E. As imagens A, C e E representam controles de infecção, sem tratamento, e mostram os núcleos viáveis de macrófagos (estruturas arredondadas e de cor verde, em maior tamanho), assim como podem ser vistos núcleos de *Leishmania* (estruturas arredondadas e de cor verde, de menor tamanho).

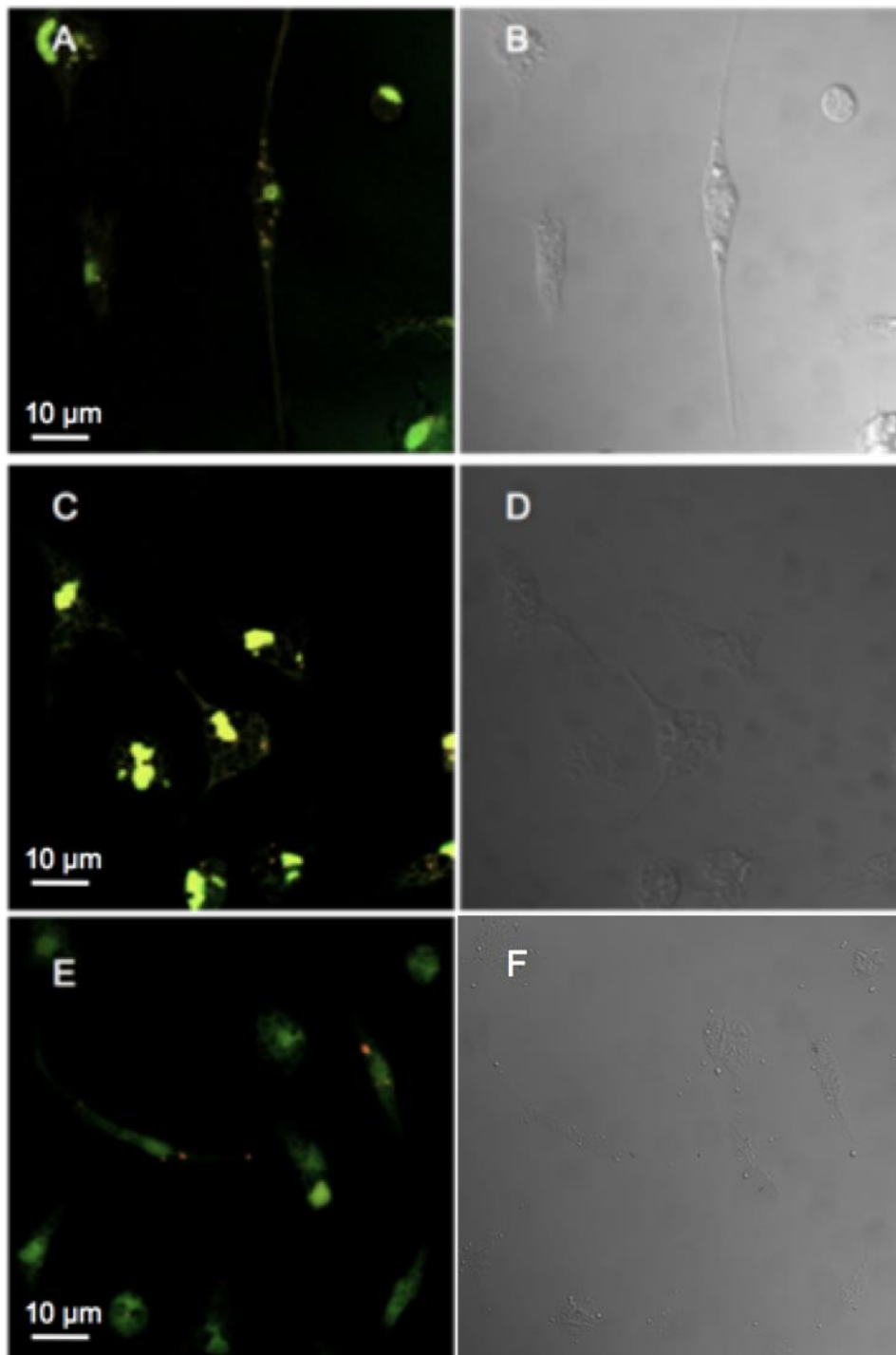


Figura 21: Marcação com Laranja de Acridina de Macrófagos infectados tratados com FG50. (A) MΦ infectados com *L. amazonensis*, (B) Aspecto da cultura de A; (C) MΦ infectados com *L. chagasi*, (D) Aspecto da cultura de C; (E) MΦ infectados com *L. major*, (E) Aspecto da cultura de E. Nas imagens A, C e E é possível perceber a presença de núcleos apoptóticos de Leishmania (estruturas arredondadas e alaranjadas/avermelhadas), obtidas com tratamento com 50 μg/mL de FG50 por 24 horas.

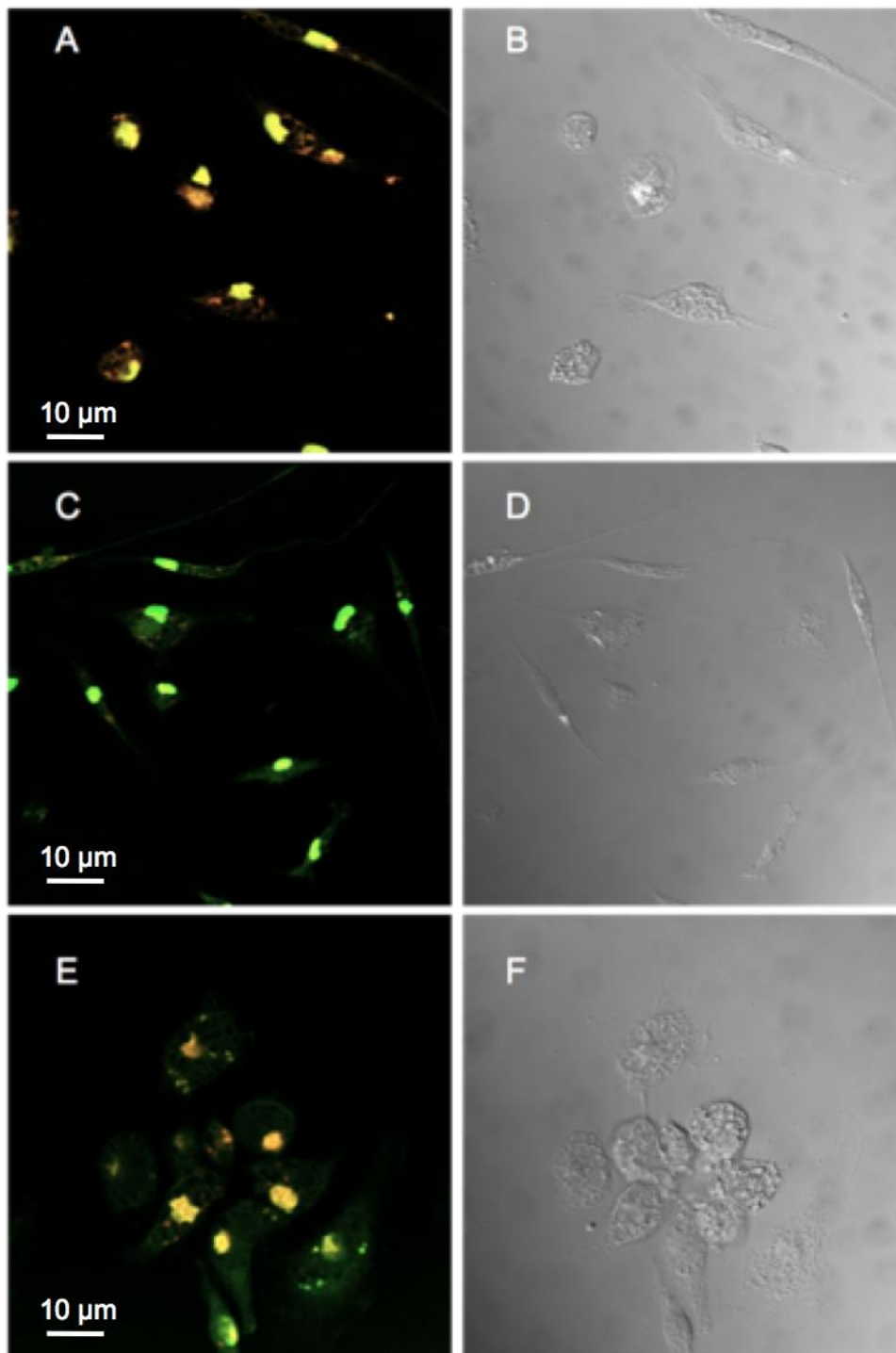


Figura 22: Marcação com Laranja de Acridina de Macrófagos infectados tratados com Amphotericina B. (A) MΦ infectados com *L. amazonensis*, (B) Aspecto da cultura de A; (C) MΦ infectados com *L. chagasi*, (D) Aspecto da cultura de C; (E) MΦ infectados com *L. major*, (E) Aspecto da cultura de E. Nas imagens A, C e E é possível perceber a presença de núcleos apoptóticos de Leishmania (estruturas arredondadas e alaranjadas/avermelhadas), obtidas após o tratamento com 50 μg/mL de Amphotericina B por 24 horas.

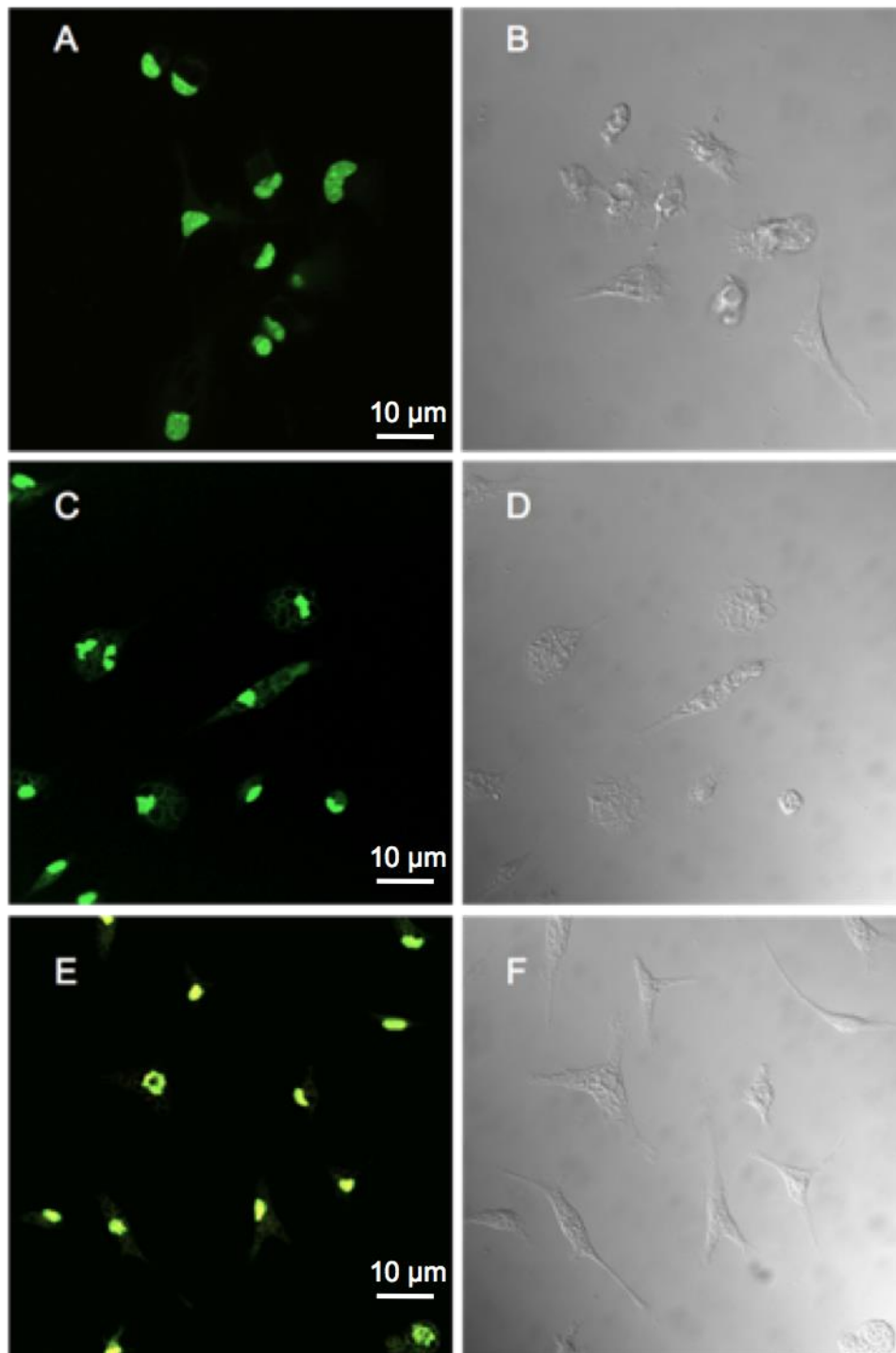


Figura 23: Marcação com Laranja de Acridina de Macrófagos tratados, ou não, com FG50 ou Amphotericina B. (A) MΦ sem qualquer tratamento, (B) Aspecto da cultura de A; (C) MΦ tratados com 50 µg/mL de FG50 , (D) Aspecto da cultura de C; (E) MΦ tratados com 50 µg/mL de Amphotericina B, (E) Aspecto da cultura de E. Nas imagens A, C e E é possível perceber a presença de núcleos viáveis de macrófagos.

5. DESENVOLVIMENTO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e representam uma patologia emergente com morbidade e mortalidade elevadas em diversos países no mundo. Os fármacos utilizados atualmente no tratamento das leishmanioses, os antimoniais pentavalentes, são os medicamentos usados desde a descoberta dos primeiros princípios ativos com atividade leishmanicida, o que nos remete à década de 40, porém, diversos problemas conhecidos tais como a toxicidade elevada dos fármacos, a dificuldade da logística de administração, seu custo elevado e o crescimento do número de casos de recidiva à doença em pacientes curados e o aumento do número de casos de resistência ao tratamento tem estimulado inúmeras tentativas para a obtenção de novos produtos que apresentem elevada eficiência no tratamento da doença, mas que não causem os problemas relacionados ao uso dos antimoniais, como os descritos acima.

Substâncias com atividade tóxica existentes em vários animais na natureza são o resultado do processo evolutivo que permitiu selecionar compostos com características de defesa destes seres. Possuem, na sua maioria, elevada estabilidade *in vivo*, especificidade e seletividade bem definidos, pequeno tamanho e atividade biológica importante, todos esses, fatores de pré-requisitos para o emprego terapêutico na indústria farmacêutica.

A proposta deste trabalho consistiu em avaliar o vasto potencial biotecnológico da diversidade de compostos do veneno total de *T. serrulatus* com a necessidade emergencial da melhoria terapêutica nas leishmanioses. Para isso, primeiramente, testamos a atividade leishmanicida do veneno de *T. serrulatus* sobre formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de três diferentes espécies de *Leishmania*, no caso, *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*, consideradas importantes espécies causadoras de leishmanioses no mundo. Com os resultados obtidos, pode-se observar que o VTs foi capaz de causar a morte de percentual significativo de parasitas nas três espécies testadas. As formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. major* demonstraram sensibilidade similar ao VTs, apresentando taxas de morte expressivas a partir de 25 µg/mL de VTs (cerca de 20%) e alcançando valores

próximos a 65% na concentração de 100 µg/mL do VTs. A espécie *L. chagasi* demonstrou maior sensibilidade ao VTs de *T. serrulatus*, sendo que na concentração de 5 µg/mL do VTs, houve uma taxa de morte de cerca de 32% dos parasitas e, na concentração de 100 µg/mL do VTs, houve uma taxa de morte de parasitas na ordem de 78%, percentual esse que se mostrou maior em relação ao uso de 50 µg/mL do fármaco Amphotericina B, medicamento usado no tratamento das leishmanioses. O fármaco Amphotericina B apresentou resultados similares nas três espécies analisadas, com uma taxa de 60% de morte nas três espécies. O mecanismo de ação da Amphotericina B não é completamente entendido, porém, sabe-se que essa droga tem afinidade elevada por lipídios de membrana, como o ergosterol, característico de alguns microorganismos, incluindo *Leishmania*, mas que também pode interagir com o colesterol encontrado na superfície de células humanas. Além disso, há indícios de que essa molécula, ao interagir com a membrana celular, induz alterações no potencial de membrana e pode modificar a atividade de alguns canais iônicos (Hartsel ET AL. 1996).

É importante ressaltar também o pequeno tempo de incubação dos parasitas com o VTs de *T. serrulatus*, de 1 hora, sendo que alterações já eram notadas a partir de 20 min, o que condiz com os mecanismos de ação envolvendo perturbação de membranas celulares, ao invés de modificações de transporte intracelular e mecanismos de transdução de sinais. Além disso, sabe-se que o VTs de *T. serrulatus* possui conteúdo elevado de toxinas ativas em canais iônicos que podem causar esse tipo de alteração em membranas celulares. Foi testado também a atividade do VTs exposto à uma temperatura elevada, no caso, a 100°C, com a intenção de analisar se a atividade leishmanicida exercida pelo veneno de *T. serrulatus* provém de conteúdo protéico (dado não mostrados) e observou-se a perda quase total da atividade leishmanicida, o que demonstra que os compostos relacionados à essa apresentam atividade protéica e termolábil. Venenos de escorpiões possuem proteínas termolábeis, tais como toxinas ativas em canais iônicos, mas também peptídeos catiônicos lineares, esses, termoestáveis. Dessa forma, acreditamos que os componentes responsáveis pela atividade leishmanicida do VTs de *T. serrulatus* seriam as neurotoxinas.

A partir desses dados, procurou-se testar a atividade leishmanicida do VT contra formas amastigotas de *Leishmania*, uma vez que tais formas são as responsáveis pelo desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero, no qual se enquadra o homem e o cão. O isolamento de formas amastigotas de macrófagos obtidos da lesão tecidual é o procedimento normalmente utilizado para o isolamento desta forma do parasita, entretanto, apresenta um protocolo técnico demorado, custoso e com rendimento relativamente baixo de parasitas. Assim, para a obtenção de formas amastigotas de *Leishmania*, foi realizado o protocolo técnico descrito por Coelho ET AL. (2003).

Após a realização do protocolo de conversão dos parasitas *in vitro*, os resultados demonstraram uma nítida e importante alteração na morfologia das células em todas as espécies testadas (*L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*), com uma redução no volume celular e a formação de um aspecto arredondado das mesmas, fatos coerentes com a morfologia de formas amastigotas. Outro dado interessante foi que a incubação das culturas com MTT mostrou uma alteração na atividade mitocondrial dos parasitas transformados, o que sugere a ocorrência de modificações intracelulares nos parasitas. Apesar de serem, geralmente chamadas de formas *like*-amastigotas, formas amastigotas de *Leishmania* obtidas após a transformação *in vitro* apresentam inúmeras similaridades bioquímicas e moleculares com as formas amastigotas oriundas da lesão de tecidos infectados. Formas *like*-amastigotas são capazes de manter a infectividade em macrófagos e sabe-se também que o choque térmico realizado no protocolo de conversão induz às diversas alterações nos parasitas, tanto no nível protéico quanto na expressão de certos genes. O choque térmico induz a uma maior expressão de genes tais como hsp 70, hsp83 e β -tubulina, sendo essa última responsável pela mudança na morfologia dos parasitas. A transformação de promastigotas em amastigotas induzida por temperatura pode estar também relacionada à degradação de proteínas termolábeis que não são sintetizadas em temperaturas elevadas (Zilberstein & Shapira 1994). Além disso, transformações *in vitro* para formas amastigotas por influência de temperatura levam à alterações morfológicas da mitocôndria do parasita e sabe-se que, no DNA mitocondrial, há homólogos de hsp70, o que indica o envolvimento dessa organela no processo de diferenciação celular dos

parasitas (Deshaies ET AL. 1988). Assim, acreditamos que a transformação *in vitro* na qual as formas promastigotas foram submetidas foi eficaz em todas as espécies analisadas, o que nos possibilitou o prosseguimento dos estudos *in vitro*.

O veneno de *T. serrulatus* mostrou menor atividade leishmanicida sobre as formas *like*-amastigotas de *L. amazonensis*, *L. major* e *L. chagasi*, com valores em torno de 17%, 14% e 11%, respectivamente. Diferentemente das formas promastigotas de *L. chagasi*, as formas *like*-amastigotas se mostraram menos sensíveis ao VT quando comparada aos valores obtidos com as formas *like*-amastigotas de *L. amazonensis* e *L. major*, que apresentaram resultados similares. Apesar da atividade leishmanicida do veneno de *T. serrulatus* nas formas *like*-amastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* ter sido mais discreta, tal atividade não pode ser desconsiderada. Ainda, a diferenciação na atividade leishmanicida exercida pelo veneno de *T. serrulatus* sobre as formas promastigotas e *like*-amastigotas favorece a argumentação de que a transformação *in vitro* dos parasitas foi bem sucedida.

À medida na qual os experimentos de atividade leishmanicida foram realizados nas formas promastigotas, pode-se observar que o veneno de *T. serrulatus* induzia a alterações na morfologia dos parasitas. Em sua maioria, os parasitas perderam a sua forma afilada, característica de promastigotas infectivas e se apresentaram mais arredondadas, refringentes, sendo também possível constatar a presença de estruturas semelhantes a vacúolos autofágicos em todas as espécies de *Leishmania* analisadas, sendo que tais modificações foram observadas já em um curto período de incubação (20 minutos) com o veneno de *T. serrulatus* e em uma baixa concentração (25 µg/mL). Borges ET AL. (2006) também relataram essa modificação estrutural após a incubação do veneno de *T. discrepans* (na concentração de 35 µg/mL) em formas promastigotas de *L. mexicana* indicando, também, a presença de vacúolos autofágicos nos parasitas.

Paralelamente, foi constatada uma redução na motilidade dos parasitas após a incubação com o veneno de *T. serrulatus*, quando comparados aos grupos de células sem tratamento, de forma que com apenas cerca de 20 minutos de incubação, as células se mostravam com menor capacidade de

deslocamento (CD, em anexo). É bem sabido que o potencial de membrana é crucial no controle da motilidade de organismos flagelados, sendo que a ativação de canais de Ca^{+2} do Tipo L, sensíveis à voltagem, desempenham um papel crítico para o início de seu movimento levando ao aumento da concentração intracelular de íons Ca^{+2} e que a ativação de canais de K^{+} dependentes de Ca^{+2} levam à repolarização do potencial de membrana e marcam o fim do movimento celular (Ballanyi & Deitmer 1984). Ativadores de Ca^{+2} podem induzir um deslocamento rápido em Flagelados e, por outro lado, bloqueadores de Ca^{+2} retardam o movimento dessas células, mantendo-as próximas ou estáticas do local de origem do movimento (Stock ET AL. 1999). Com isso, acreditamos que, talvez, neurotoxinas bloqueadoras de Ca^{+2} presentes no veneno de *T. serrulatus* possam estar envolvidas na redução da motilidade dos parasitas.

Os ensaios de redução da infectividade de formas promastigotas tratadas com o veneno de *T. serrulatus* (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, durante a infecção), mostraram uma redução expressiva no número de macrófagos infectados por *L. amazonensis* (52%), *L. chagasi* (30%) e *L. major* (31%). Em relação ao número de parasitas por macrófago, também foi observado altos níveis de redução, em torno de 50% para *L. amazonensis*, seguida de *L. major* (40%) e *L. chagasi* (25%). O mesmo ensaio foi conduzido com as formas *like-amastigotas* e mostrou resultados semelhantes, sendo que a taxa de redução do número de macrófagos infectados se mostrou mais homogênea; em torno de 48% para *L. amazonensis*, 44% para *L. chagasi* e 48% para *L. major*. A redução do número de parasitas por macrófagos no ensaio de redução da infectividade nas formas *like-amastigotas* se mostrou mais efetivo para as espécies *L. chagasi* (66%) e *L. major* (65%) e, por fim, *L. amazonensis* (27%).

Para os ensaios de redução da infectividade dos parasitas, tanto nas formas promastigotas quanto *like-amastigotas*, foi empregada uma concentração de células cerca de 5 vezes maior do que a concentração de células utilizadas normalmente nos ensaios de atividade leishmanicida, além de uma concentração menor do veneno de *T. serrulatus*, com a finalidade de reduzir a influência de morte desses parasitas pelo veneno de *T. serrulatus*. Tal objetivo parece ter sido atingido, já que formas *like-amastigotas* se mostraram

menos sensíveis ao VTs, porém, os resultados na redução de infectividade se mostraram semelhantes em ambas as formas, sendo até maiores nas formas *like*-amastigotas.

A respeito da interação entre *Leishmania* e macrófagos, é sabido que há a participação de algumas biomoléculas na interação entre parasita e hospedeiro e que alguns receptores em macrófagos participam nessa adesão, tais como CR3 e MFR, facilitando a entrada dos parasitas nas células do hospedeiro. O processo de interação é redundante, uma vez que poucas moléculas do parasita podem interagir com mais de um receptor da célula parasitada como a gp63, que pode se ligar ao MFR, CR1 e às integrinas β 1. Apesar das formas promastigotas e amastigotas apresentarem quase o mesmo repertório de moléculas de interação com o hospedeiro, formas promastigotas parecem ser mais dinâmicas neste processo. Além das moléculas citadas, sabe-se que a ligação de *Leishmania* e macrófagos é influenciada pela carga da superfície do parasita (Saraiva ET AL. 1989) e que íons Ca^{+2} desempenham um papel importante nessa interação, sendo que quelantes para Ca^{+2} e bloqueadores de canais de Ca^{+2} parecem prejudicar a interação parasita-hospedeiro (Sujata ET AL. 1990). Associando-se tais fatos com o possível envolvimento de bloqueadores de canais de Ca^{+2} na redução da motilidade dessas células, acreditamos que a redução da infectividade dos parasitas incubados com o veneno de *T. serrulatus* seja, dentre outros fatores, devido a sua ação como bloqueadores de canais de Ca^{+2} .

A purificação do veneno de *T. serrulatus* por cromatografia de Gel Filtração em coluna de Sephadex G50 resultou na obtenção de um perfil clássico de cromatograma, sendo que alguns picos foram submetidos à análise de conteúdo molecular via espectrometria de massas por MALDI-TOF-TOF. A fração F2 demonstrou um conteúdo coerente com a fração denominada, pela literatura, de FG50, sendo que massas de proteínas descritas como sendo de TsVII, NTxP e TsII foram encontradas. A fração F4, por sua vez, mostrou uma maior complexidade de compostos sendo que massas de peptídeos da família das hipotensinas (TsHpT), de peptídeos com atividade antimicrobiana e de neurotoxinas ativas em canal de potássio (KTx) foram identificadas. O conteúdo molecular da fração F4 é coerente com frações ricas toxinas da

família KTx, sendo que a TsHpT e os peptídeos antimicrobianos se encontram em menor quantidade nessa fração (Pimenta ET AL. 2001, Pimenta & De Lima 2005).

A atividade leishmanicida das frações purificadas do veneno de *T. serrulatus* por Sephadex G50 se mostrou bem diferenciada. A fração F1, que sabidamente é rica em compostos enzimáticos como hialuronidases, apresentou apenas uma atividade residual de morte em *Leishmania* e as frações F2 e F3 demonstraram atividade considerável sobre ambas as formas dos parasitas. Porém, as formas promastigotas se mostraram mais sensíveis à fração F3 em relação às formas *like*-amastigotas e, talvez, esse fato pode explicar a maior sensibilidade das formas promastigotas frente ao veneno de *T. serrulatus*. Frações com o conteúdo rico em neurotoxinas apresentaram maior atividade, sendo que a fração F4, que apresenta conteúdo elevado de toxinas ativas em canal de potássio mostrou maior atividade leishmanicida sobre todas as formas das três espécies analisadas, sendo maior até mesmo que taxas de morte do controle positivo e alcançando 100% de morte em promastigotas de *L. amazonensis*.

São descritos na literatura dois processos de morte celular em *Leishmania*: a apoptose e a autofagia, e ambos parecem envolver a participação de canais iônicos. O processo de apoptose em *Leishmania* pode estar relacionado com a seleção de parasitas tanto no trato digestivo do vetor quanto no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos, além de permitir o estabelecimento de uma interação estável entre parasitas e hospedeiro, reduzindo o processo inflamatório e favorecendo a evasão do parasita (Shaha 2006). Ativação de canais de potássio em algumas células eucarióticas, inclusive *Leishmania*, pode levar aos eventos característicos de apoptose. O efluxo de K⁺ por esses canais leva à perda de volume celular, acidificação do citosol e a consequente ativação de metacaspases (análogos de caspases em *Leishmania*) e fragmentação do DNA (Sen ET AL. 2004).

A autofagia é um processo de morte celular independente de metacaspases e, conseqüentemente, sem fragmentação de DNA, porém, ocorre a formação de vacúolos autofágicos e a degradação de organelas intracelulares (Bera ET AL. 2003). Foi demonstrado que bloqueadores de canais iônicos podem levar

espécies de *Leishmania* à morte por autofagia, como bloqueadores de canais K^+ , Cl^- , Kir.6.2, K-ATPase e Ca^{+2} . Tais bloqueadores foram capazes de causar alteração nas células como a presença de vacúolos autofágicos, condizentes com a autofagia (Ponte-Sucre ET AL. 1998 e Tempone ET AL. 2009). Acreditamos assim que o veneno de *T. serrulatus*, assim como suas frações purificadas, principalmente a F4, induziram à morte dos parasitas via autofagia por bloqueio de canais iônicos, provavelmente, canais de K^+ , levando à vacuolização da célula e a conseqüente perda da viabilidade celular.

A incubação de culturas de macrófagos peritoneais murinos com a fração FG50, por 24 horas, mostrou-se eficaz na ativação dessas células, o que pode ser observado pelo aumento da expressão da enzima iNOs nas células tratadas. Essa ativação foi ainda mais eficiente nos macrófagos infectados com *L. amazonensis*, que apresentaram níveis mais elevados de iNOS em relação às culturas estimuladas com LPS. Petricevich ET AL. (2004) demonstraram a capacidade do veneno de *T. serrulatus* e da fração FG50 em ativar macrófagos de maneira similar à ativação clássica, com a produção de IL-6, IL-1, TNF e NO, sugerindo, também, o envolvimento de canais de sódio Na^+ no processo de ativação celular. Com a análise dos dados, demonstramos, pela primeira vez, o aumento na expressão de iNOs após o tratamento de macrófagos não-infectados e macrófagos infectados com *Leishmania* pelo uso da fração FG50.

Sabe-se que o mecanismo microbicida mais eficiente na elucidação da infecção de *Leishmania* em macrófagos compreende a ativação efetiva das células com o aumento da expressão de iNOs e, conseqüentemente, de NO. Níveis elevados de NO e ROS induzem à apoptose de parasitas intracelulares. Curiosamente, a internalização de *Leishmania* em macrófagos promove um aumento suave nos níveis de expressão de iNOs, porém, essa ativação não é suficiente para erradicar a infecção pelo parasita (Cunningham 2002).

A incubação da fração F4 com culturas de macrófagos peritoneais não à expressão de iNOs após 24 horas de incubação, porém, as culturas submetidas ao co-tratamento entre F4 e FG50 ou F4 e LPS demonstraram expressão elevada da enzima. Assim, apesar de F4 não causar ativação de macrófagos via iNOs, essa fração não impediu a ativação dessas células por

FG50 ou por LPS. Tal fato denota o efeito proeminente de FG50 e LPS na ativação de macrófagos, e também o efeito proeminente do conteúdo molecular de FG50 na ativação das células pelo veneno de *T. serrulatus*.

É demonstrado na literatura o envolvimento de canais de K⁺ (K_{or}, K_v e K_{ir}) na ativação de macrófagos e na produção de citocinas (Qiu ET AL. 2002). Além disso, foi demonstrado que o estímulo por LPS causa um aumento na expressão de K_v1.3 e a redução na expressão de K_{ir}2.1, sendo que K_v1.5 se mostrou constitutivo não alterando seus níveis de expressão. Coerente com esses dados, a ativação de macrófagos via estímulo por LPS leva a um aumento na corrente de efluxo de íons potássio (por K_v1.3, principalmente, e também de K_v1.5) e a uma redução da corrente de influxo de íons potássio (por K_{ir}2.1) (Vicente ET AL. 2003).

Bloqueadores para canais de potássio, tais como o 4AP, podem bloquear canais K_v e K_{ir} e levar a uma diminuição na produção de citocinas, como o TNF- α . Porém, o envolvimento de mais de um tipo e subtipos de canais de K⁺ na ativação de macrófagos confere uma dinamicidade a esse processo. A exemplo disso, os canais constitutivos K_v1.5 parecem desempenhar o papel de manter a corrente de efluxo de íons K⁺ na ativação de macrófagos, sendo que há indícios da presença de hetero-tetrâmeros de K_v1.3 e K_v1.5 (Vicente ET AL. 2008). Tal fato pode justificar a ativação de macrófagos incubados, simultaneamente, com as frações FG50 e F4 e com F4 e LPS.

Conforme demonstrado, macrófagos peritoneais murinos tratados por 24 horas com a fração FG50 apresentaram um aumento na expressão de iNOs, sendo que tal aumento se mostrou mais elevado nas células infectadas com *Leishmania*. Como já discutido anteriormente, o aumento na produção de NO está relacionada com a eliminação do parasita pela célula hospedeira; assim, tendo em vista os resultados de ativação de macrófagos, não-infectados e infectados, prosseguimos para o tratamento *in vitro* com a fração FG50 de macrófagos infectados, com o intuito de avaliar se a ativação seria eficaz em levar à morte celular parasitas internalizados. Os experimentos com marcação por laranja de acridina nos macrófagos infectados e tratados com FG50, por 48 horas, demonstraram que grande parte dos parasitas encontrados interiorizados nos macrófagos se mostravam com núcleo apoptótico, indicando

a perda da viabilidade celular e a consequente morte das formas interiorizadas. A presença de amastigotas em estado apoptótico com o tratamento com FG50 de macrófagos infectados foi verificada tanto com *L. amazonensis*, como para *L. chagasi* e *L. major*, demonstrando um perfil semelhante a culturas tratadas com o medicamento Amphotericina B.

Com isso, foi demonstrado pela primeira vez que o tratamento *in vitro* com a fração FG50 do VTs, em macrófagos infectados com Leishmania, foi capaz de ativar os macrófagos, levando a um aumento na produção de iNOs, provavelmente através do canal iônico Nav1.5, e essa ativação foi suficiente para causar a morte das formas amastigotas intracelulares.

O presente trabalho explicita que o potencial biotecnológico do veneno de *T. serrulatus* pode ser explorado na pesquisa por uma terapêutica alternativa para as leishmanioses e que, talvez, repertórios diferentes de compostos provenientes do veneno total de *T. serrulatus* possam ser utilizados no tratamento da doença, seja na forma de bloqueadores de canais de Ca^{+2} ou de canais de K^{+} , além da ativação da célula parasitada por canais de Na^{+} .

6. CONCLUSÃO

Com base nos objetivos propostos no trabalho e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O processo de conversão das formas promastigotas em fase estacionária de crescimento para formas *like*-amastigotas mostrou-se eficaz nas três espécies de parasitas, no caso, *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major*, sendo observadas diferenças na morfologia das espécies, bem como na atividade metabólica analisada entre as duas formas parasíticas
- O veneno total do escorpião *T. serrulatus* demonstrou atividade leishmanicida significativa nas três espécies de *Leishmania* tanto nas formas promastigotas em fase estacionária de crescimento quanto nas formas *like*-amastigotas levando, inclusive, a uma alteração na morfologia dos parasitas, coerente com a autofagia.
- O veneno total de *T. serrulatus* conseguiu reduzir a adesão de *Leishmania* em macrófagos peritoneais, o que permitiu a diminuição da infecção *in vitro* dessas células.
- Purificação, por Gel filtração e, conseqüente análise do conteúdo molecular por espectrometria de massas indicou perfil “clássico” do cromatograma de F2 e F4.
- Frações purificadas do veneno tal de *T. serrulatus* não apresentaram citotoxicidade em macrófagos murinos.

- Dentre as frações testadas, a F4 mostrou a maior atividade leishmanicida e a fração FG50 causou a ativação de macrófagos via expressão da enzima iNOs, sendo que essa ativação foi mais visualizada nos macrófagos infectados, quando comparados àqueles não-infectados.
- F4 não ativou eficazmente macrófagos via iNOs, porém, não impediu a ativação dessas células por FG50 nem por LPS.
- O tratamento *in vitro* de macrófagos peritoniais infectados com *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. major* com a fração FG50 foi eficaz em estimular o mecanismo microbicida de macrófagos e causar a morte celular dos parasitas internalizados.

7. PERSPECTIVAS

- Desenvolver experimentos de microscopia eletrônica de parasitas tratados com veneno ou frações purificadas.
- Purificar, por fase reversa ou troca iônica, tanto F4, que demonstrou maior atividade anti-Leishmania, quanto FG50, que apresentou propriedades de ativação de macrófagos.
- Caracterizar proteínas purificadas, em atividade biológica sobre Leishmania, mas também em afinidade e seletividade sobre canais iônicos, via Patch Clamp.
- Selecionar e triar proteínas purificadas que apresentem menor toxicidade, mas mantêm atividade em Leishmania.
- Inserir outras linhagens celulares nos ensaios de citotoxicidade, como células CHO, e também outros ensaios de citotoxicidade como ensaio de Cristal de Violeta.
- Iniciar tratamento in vivo com frações e proteínas purificadas (isoladas e em co-tratamento) de BALB/c infectados com Leishmania sp..
- Verificar se a ativação de macrófagos através de FG50 ou proteínas purificadas é eficaz no combate a outras parasitoses ou infecções.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA F., PIMENTA A., DE FIGUEIREDO S., SANTORO M., MARTIM-EAUCLAIRE M., DINIZ C., DE LIMA M.. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon* 2002; 40: 1041-1045.
- AWASTHI A., KUMAR R., MATHUR, SAHA B. Immune response to Leishmania infection. *Indian J Med Res* (2004) vol. 119 (6) pp. 238-58
- BALLANYI K., GRAFE P., REDDY M. , BRUGGENCATE G. Different types of potassium transport linked to carbachol and gamma-aminobutyric acid actions in rat sympathetic neurons. *Neuroscience* (1984) vol. 12 (3) pp. 917-27
- BERA A., SINGH S., NAGARAJ R., VAIDYA T. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol Biochem Parasitol* (2003) vol. 127 (1) pp. 23-35
- BARRAL A., PEDRAL-SAMPAIO D., GRIMALDI JÚNIOR G., MOMEN H., MCMAHON-PRATT D., RIBEIRO DE JESUS A., ALMEIDA, BADARÓ R., BARRAL-NETTO M., CARVALHO E. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* (1991) vol. 44 (5) pp. 536-46
- BERN C., ADLER-MOORE J. , BERENQUER J. , BOELAERT M., DEN BÔER M., N DAVIDSON R., FIGUERAS C., GRADONI L., A KAFETZIS D., RITMEIJER K., ROSENTHAL E., ROYCE C., RUSSO R., SUNDAR S., JORGE ALVAR J. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* (2006) vol. 43 (7) pp. 917-24
- BERROCAL-LOBO M., MOLINA A., RODRÍGUEZ-PALENZUELA P., GARCÍA-OLMEDO F., RIVASET. L. *Leishmania donovani*: thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Exp Parasitol* (2009) vol. 122 (3) pp. 247-9
- BOGDAN C., RÖLLINGHOFFET M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* (1998) vol. 28 (1) pp. 121-34
- BORGES A., SILVA S., J M OP DEN CAMP H., VELASCO E., ALVAREZ M., J M ALFONZO M., JORQUERA A., DE SOUSA L., DELGADOET O. In vitro leishmanicidal activity of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Parasitol Res* (2006) vol. 99 (2) pp. 167-73

- BORTNER C., A. CIDLOWSKI J. The role of apoptotic volume decrease and ionic homeostasis in the activation and repression of apoptosis. *Pflugers Arch* (2004) vol. 448 (3) pp. 313-8
- BOSMANS F., TYTGAT J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. *Toxicon* (2007) vol. 49 (2) pp. 142-58
- BRAY P., BARRETT M., WARD S., KONINGET H. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in Parasitology* (2003) vol. 19 (5) pp. 232-9
- BULET P., STÖCKLIN R., MENINET L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* (2004) vol. 198 pp. 169-84
- BURG E., V REMILLARD C., X-J YUAN J. K⁺ channels in apoptosis. *J Membr Biol* (2006) vol. 209 (1) pp. 3-20
- CAMACHO M., ELISA FORERO M., FAJARDO C., NIÑO A., MORALES P., CAMPOSET H. *Leishmania amazonensis* infection may affect the ability of the host macrophage to be activated by altering their outward potassium currents. *Exp Parasitol* (2008) vol. 120 (1) pp. 50-6
- CATISTI R., A. UYEMURA S., DOCAMPO R., E VERCESIET A. Calcium mobilization by arachidonic acid in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* (2000) vol. 105 (2) pp. 261-71
- CHANG K., G. REED S., S. MCGWIRE B., SOONGET. L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop* (2003) vol. 85 (3) pp. 375-90
- CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, MOREIRA FERREIRA AM, CORDEIRO M, MARIA WS, RICHARDSON M, DINIZ CR. Immunological and chemical properties of a non-toxic protein from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz & Mello, 1922) *Envenomings and their Treatments*. 1996. Fondation Marcel Mérieux. Eds C. Bon and M Goyffon. 183-195
- CHAVEZ-OLORTEGUI C, MOLINA F, GRANIER C. Molecular basis for the cross-reactivity of antibodies elicited by a natural anatoxin with alpha- and beta-toxins from the venom of *Tityus serrulatus* scorpion. *Mol Immunol* 2002; 38(11):867-76
- CHICHARRO C., GRANATA C., LOZANO R., ANDREU D., RIVASET L. N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide. *Antimicrob Agents Chemother* (2001) vol. 45 (9) pp. 2441-9
- COELHO E., TAVARES C., AMORIM F., CHAVES K., TEIXEIRA K., RODRIGUES R., CHAREST H., MATLASHEWSKI G., GAZZINELL R., FERNANDESET A. Immune responses induced by the *Leishmania*

(*Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. *Infect Immun* (2003) vol. 71 (7) pp. 3988-94

COSTA T., MENALDO D., OLIVEIRA C., SANTOS-FILHO N., TEIXEIRA S., NOMIZO A., FULY A., MONTEIRO M., DE SOUZA B., PALMA M., STÁBELI R., SAMPAIO S., SOARESET A. Myotoxic phospholipases A(2) isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. *Peptides* (2008) vol. 29 (10) pp. 1645-56

CROFT S., SUNDAR S., FAIRLAMBET A. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* (2006) vol. 19 (1) pp. 111-26

CUPO, P.; JURCA, M.; AZEVEDO-MARQUES, M.; OLIVEIRA, J.; HERING, S. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 1994, 36(1), 67-76

CUNNINGHAM A. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Experimental and Molecular Pathology* (2002) vol. 72 (2) pp. 132-41

DA SILVA D., TULLI E., MILITÃO G., COSTA-LOTUFO L., PESSOA C., DE MORAES M., ALBUQUERQUE S., DE SIQUEIRAET J. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. *Phytomedicine* (2009) pp.

DELORENZI J., ATTIAS M., GATTASS C, ANDRADE M., REZENDE C., PINTO A., HENRIQUES A., BOU-HABIB D., SARAIVA E. (2001) Antileishmania activity of na índole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob Agents Chemother* 45(5):1349–1354

DOCAMPO R., MORENO S. Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitol Today (Regul Ed)* (1999) vol. 15 (11) pp. 443-8

DE OLIVEIRA C., DE OLIVEIRA S., GODOY L., GABARDO J., BUCHIET D. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. *J Infect* (2006) vol. 52 (6) pp. 420-32

DESHAIES R., KOCH B., WERNER-WASHBURNE M. , CRAIG E., SCHEKMAN R. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* (1988) vol. 332 (6167) pp. 800-5

DÍAZ-ACHIRICA P., UBACH J., GUINEA A., ANDREU D., RIVASET L. The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main

- target for CA(1-8)M(1-18), a synthetic cecropin A-melittin hybrid peptide. *Biochem J* (1998) vol. 330 (Pt 1) pp. 453-60
- DINIZ CR. Chemical and pharmacological aspects of *Tityinae* venom. *Arthropod Venoms*. Bettini (Ed.), 1978. Springer-Verlag, Berlin. pp 379-394.
- DUTTA A., BANDYOPADHYAY S., MANDAL C., CHATTERJEEET M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology International* (2005) vol. 54 (2) pp. 119-22
- ENGWERDA C., ATO M., KAYEET P. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends in Parasitology* (2004) vol. 20 (11) pp. 524-30
- ESCOUBAS P., QUINTON L., NICHOLSONET G. Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry : JMS* (2008) vol. 43 (3) pp. 279-95
- ESCOUBAS P., KING F. Venomics as a drug discovery platform. *Expert review of proteomics* (2009) vol. 6 (3) pp. 221-4
- FERNANDEZ-GOMEZ R., ZERROUK H., SEBTI F., LOYENS M., BENSLIMANE A., MOUAISSIET M. 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* (1994) vol. 32 (8) pp. 875-82
- FERREIRA L., ALVES E., HENRIQUESET O. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* (1993) vol. 31 (8) pp. 941-7
- FORERO M., MARIN M., CORRALES A., LLANO I., MORENO H., CAMACHOET M. *Leishmania amazonensis* infection induces changes in the electrophysiological properties of macrophage-like cells. *J Membr Biol* (1999) vol. 170 (2) pp. 173-80
- FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning, In: Ownby, C.L.; Odell, G.V., Ed.; *Natural toxins: characterization, pharmacology and therapeutics*; Pergamon Press: Oxford, 1989; pp. 139-159
- FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J.; AMARAL, C. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. *Toxicon*, 1994, 32(9), 1009- 1014.
- GAZARIAN KG, GAZARIAN T, HERNÁNDEZ R, POSSANI LD. Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine* 2005;23:3357-3368.

- GOLENSER J., FRANKENBURG S., EHRENFREUND T., DOMB A. (1999) Efficacious treatment of experimental leishmaniasis with amphotericin b-arabinogalactan water-soluble derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 43(9):2209–2214
- GONÇALVES A., SOARES M., DE SOUZA W., DAMATTA R., ALVES E. Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Parasitol Res* (2002) vol. 88 (7) pp. 598-602
- GORDON D., KARBAT I., ILAN N., COHEN L., KAHN R., GILLES N., DONG K., STÜHMER W., TYTGAT J., GUREVITZET M. The differential preference of scorpion alpha-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control. *Toxicon* (2007) vol. 49 (4) pp. 452-72
- GORDON S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* (2003) vol. 3 (1) pp. 23-35
- GÓMEZ-ANGELATS M., BORTNER C., CIDLOWSKIET J. Cell volume regulation in immune cell apoptosis. *Cell Tissue Res* (2000) vol. 301 (1) pp. 33-42
- HARTSEL S., BOLARD J. Amphotericin B: new life for an old drug. *Trends Pharmacol Sci* (1996) vol. 17 (12) pp. 445-9
- INCEOGLU B, LANGO J, JING J, CHEN L, DOYMAZ F, PESSAH IN, HAMMOCK BD. One scorpion, two venoms: Prevenom of *Parabuthus transvaalicus* acts as a alternative type of venom with distinct mechanism of action. *PNAS* 2003; 100:922-927
- IZIDORO L., RIBEIRO M., SOUZA G., SANT'ANA C., HAMAGUCHI A., HOMSI-BRANDEBURGO M., GOULART L., BELEBONI R., NOMIZO A., SAMPAIO S., SOARES A., RODRIGUES V. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. *Bioorg Med Chem* (2006) vol. 14 (20) pp. 7034-43
- JACOBS T., ANDRÄ J., GAWORSKI I., GRAEFE S., MELLENTHIN K., KRÖMER M., HALTER R., BORLAK J., CLOSET J. Complement C3 is required for the progression of cutaneous lesions and neutrophil attraction in *Leishmania major* infection. *Med Microbiol Immunol* (2005) vol. 194 (3) pp. 143-9
- KALAPOTHAKIS E, CHAVEZ-OLÓRTEGUI C. Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. *Toxicon* 1997; 35:1523-1529

- KAMHAWI S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?. *Trends in Parasitology* (2006) vol. 22 (9) pp. 439-45
- KROEMER G., REED J. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* (2000) vol. 6 (5) pp. 513-9
- LANG F., FÖLLER M., LANG K., LANG P., RITTER M., GULBINS E., VERENINOV A., HUBERET S. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol* (2005) vol. 205 (3) pp. 147-57
- LEGROS C., CÉARD B., BOUGIS P., MARTIN-EAUCLAIREET M. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *FEBS Lett* (1998) vol. 431 (3) pp. 375-80
- LEWIS R., GARCIA M. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature reviews Drug discovery* (2003) vol. 2 (10) pp. 790-802
- LIEN S., LOWMANET H. Therapeutic peptides. *Trends Biotechnol* (2003) vol. 21 (12) pp. 556-62
- LIGHTON, .B.; BROWNELL, P.; JOOS, B.; TURNER, R. Low metabolic rate in scorpions: implications for population biomass and cannibalism. *J. Exp. Biol.*, 2001, 204(3), 607-613.
- LIPOLDOVÁ M., DEMANT P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet* (2006) vol. 7 (4) pp. 294-305
- MAENO E., ISHIZAKI Y., KANASEKI T., HAZAMA A., OKADAET Y. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) vol. 97 (17) pp. 9487-92
- MAGALHÃES M., PEREIRA M., AMARAL C., REZENDE N., CAMPOLINA D., BUCARETCHI F., GAZZINELLI R., CUNHA-MELOET J. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* (1999) vol. 37 (8) pp. 1155-64
- MARTINEZ F., SICA A., MANTOVANI A., LOCATIET M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* (2008) vol. 13 pp. 453-61
- MATALON S., O'BRODOVICH H. Sodium channels in alveolar epithelial cells: molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance. *Annu Rev Physiol* (1999) vol. 61 pp. 627-61
- MIGUEL D., YOKOYAMA-YASUNAKA J., ANDREOLI W., MORTARA R., ULIANAET S. Tamoxifen is effective against Leishmania and induces a rapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring

- Leishmania (Leishmania) amazonensis amastigotes. *J Antimicrob Chemother* (2007) vol. 60 (3) pp. 526-34
- MISRA S., K NASKAR K., SARKAR D., GHOSHET D. Role of Ca²⁺ ion on Leishmania-macrophage attachment. *Mol Cell Biochem* (1991) vol. 102 (1) pp. 13-8
- MUKHERJEE S., DAS M., SUDHANDIRAN G., SHAHAET C. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes. *J Biol Chem* (2002) vol. 277 (27) pp. 24717-27
- NASCIMENTO D., RATES B., SANTOS D., VERANO-BRAGA T., BARBOSA-SILVA A., DUTRA A., BIONDI I., MARTIN-EAUCLAIRE M., DE LIMA M., M. C. PIMENTA A. Moving pieces in a taxonomic puzzle: venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). *Toxicon* (2006) vol. 47 (6) pp. 628-39
- NIETSCH H., ROE M., FIEKERS J., MOORE A., LIDOFISKYET S. Activation of potassium and chloride channels by tumor necrosis factor alpha. Role in liver cell death. *J Biol Chem* (2000) vol. 275 (27) pp. 20556-61
- OKADA Y., MAENO E., SHIMIZU T., DEZAKI K., WANG J., MORISHIMAET S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol (Lond)* (2001) vol. 532 (Pt 1) pp. 3-16
- OLIVIER M. Modulation of host cell intracellular Ca²⁺. *Parasitol Today (Regul Ed)* (1996) vol. 12 (4) pp. 145-50
- PETRICEVICH V., CRUZ A., CORONAS F., POSSANIET L. Toxin gamma from Tityus serrulatus scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon* (2007) vol. 50 (5) pp. 666-75
- PETRICEVICH V., REYNAUD E., CRUZ A., POSSANI L. Macrophage activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillations induced by scorpion toxins from Tityus serrulatus. *Clin Exp Immunol* (2008) vol. 154 (3) pp. 415-23
- PETRICEVICH V., LEBRUN I. Immunomodulatory effects of the Tityus serrulatus venom on murine macrophage functions in vitro. *Mediators Inflamm* (2005) vol. 2005 (1) pp. 39-49
- PIMENTA A., DE LIMA M. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. *J Pept Sci* (2005) vol. 11 (11) pp. 670-6

- PIMENTA A., STÖCKLIN R., FAVREAU P., BOUGIS P., MARTIN-
EAUCLAIREET M. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass
fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus*
(Scorpiones, Buthidae). *Rapid Commun Mass Spectrom* (2001) vol. 15
(17) pp. 1562-72
- PONTE-SUCRE., CAMPOS Y., FERNANDEZM., MOLL H., MENDOZA-
LEÓN A. *Leishmania* sp.: growth and survival are impaired by ion
channel blockers. *Exp Parasitol* (1998) vol. 88 (1) pp. 11-9
- PONTE-SUCRE A., MENDOZA-LEÓN A., EXPERIMENTAL H. *Leishmaniasis*:
synergistic effect of ion channel blockers and interferon-gamma on the
clearance of *Leishmania major* by macrophages. *Parasitol Res* (2001)
vol. 87 (1) pp. 27-31
- PESSINI A., TAKAO T., CAVALHEIRO E., VICHNEWSKI W., SAMPAIO S.,
GILGIO J., ARANTES E. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus*
scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by
flavonoids. *Toxicon* 2001; 39: 1495-1504
- PESSINI, A.; SOUZA, A.; FACCIOLI, L.; GREGÓRIO, Z.; ARANTES, E. Time
course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom
and TsTX-I in mice. *Intern. Immunopharm.*, 2003, 3(5), 765-774
- POSSANI L., MERINO E., CORONA M., BOLÍVAR F., BECERRIL B. Peptides
and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels.
Biochimie (2000) vol. 82 (9-10) pp. 861-8
- POSSANI L., BECERRIL B., DELEPIERRE M., TYTGAT J. Scorpion toxins
specific for Na⁺ channels. *Eur J Biochem* (1999) vol. 264 (2) pp. 287-
300
- POSSANI L., STEINMETZ E., DENT M., ALAGÓN A., WÜTHRICHET K.
Preliminary spectroscopic characterization of six toxins from Latin
American scorpions. *Biochim Biophys Acta* (1981) vol. 669 (2) pp.
183-92
- PREVARSKAYA N., SKRYMA R., BIDAUX G. , FLOURAKIS M., SHUBA Y. Ion
channels in death and differentiation of prostate cancer cells. *Cell
Death Differ* (2007) vol. 14 (7) pp. 1295-304
- QIU M., CAMPBELL T., BREIT S. A potassium ion channel is involved in
cytokine production by activated human macrophages. *Clin Exp
Immunol* (2002) vol. 130 (1) pp. 67-74
- RATES B., FERRAZ K., BORGES M., RICHARDSON M., DE LIMA M.,
PIMENTA A. *Tityus serrulatus* venom peptidomics: Assessing venom
peptide diversity. *Toxicon* (2008) pp.

- RATH S., TRIVELIN L., IMBRUNITO T., TOMAZELA D., MARZAL M. ANTIMONIAIS EMPREGADOS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE- ESTADO DA ARTE. (2003) pp. 6
- RODRÍGUEZ DE LA VEGA R., POSSANI L. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon* (2005) vol. 46 (8) pp. 831-44
- SACKS D., NOBEN-TRAUTH N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* (2002) vol. 2 (11) pp. 845-58
- SANTOS D., COUTINHO C., MADEIRA M., BOTTINO C., VIEIRA R., NASCIMENTO S., BERNARDINO A., BOURGUIGNON S., CORTE-REAL S., PINHO R., RODRIGUES C., CASTRO H. Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* (2008) vol. 103 (1) pp. 1-10
- SARAIVA E., VANNIER-SANTOS M., SILVA-FILHO F., DE SOUZA W. Anionic site behavior in *Leishmania* and its role in the parasite-macrophage interaction. *J Cell Sci* (1989) vol. 93 (Pt 3) pp. 481-9
- SEN N., DAS B., A GANGULY A., MUKHERJEE T., TRIPATHI G., BANDYOPADHYAY S., RAKSHIT S., SEN T., MAJUMDER H. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death Differ* (2004) vol. 11 (8) pp. 924-36
- SINGH S., SIVAKUMAR R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* (2004) vol. 10 (6) pp. 307-15
- SHAHA C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res* (2006) vol. 123 (3) pp. 233-44
- SOLLOD B., WILSON D., ZHAXYBAYEVA O., GOGARTEN J., DRINKWATER R., KING G. Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries?. *Peptides* (2005) vol. 26 (1) pp. 131-9
- STOCK I., WIEDEMANN B. An in-vitro study of the antimicrobial susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* and the definition of a database. *J Antimicrob Chemother* (1999) vol. 43 (1) pp. 37-45
- TEMPONE A., ANDRADE F., SPENCER P., LOURENÇO C., ROGERO J., NASCIMENTO N. Bothrops moojeni venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) vol. 280 (3) pp. 620-4

- TEMPONE A., TANIWAKI N., REIMÃO J. Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of *Leishmania (L.) chagasi* treated with the calcium channel blocker nimodipine. *Parasitol Res* (2009) pp.
- VANNIER-SANTOS M., MARTINY A., DE SOUZA W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Curr Pharm Des* (2002) vol. 8 (4) pp. 297-318
- VARGHESE A., BRAGAIS F., MUKHOPADHYAY D., KUNDU S., PAL M., BHATTACHARYYA K., AGARWALET A. Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics. *Andrologia* (2009) vol. 41 (4) pp. 207-15
- VERANO-BRAGA T., ROCHA-RESENDE C., SILVA D., IANZER D., MARTIN-EAUCLAIRE M., BOUGIS P., DE LIMA M., SANTOS R., PIMENTA A. *Tityus serrulatus* Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) vol. 371 (3) pp. 515-20
- VICENTE R., ESCALADA A., COMA M., FUSTER G., SÁNCHEZ-TILLÓ E., LÓPEZ-IGLESIAS C., C SOLER C., SOLSONA C., CELADA A., FELIPE A. Differential voltage-dependent K⁺ channel responses during proliferation and activation in macrophages. *J Biol Chem* (2003) vol. 278 (47) pp. 46307-20
- VICENTE R., VILLALONGA N., CALVO M., ESCALADA A., SOLSONA C., SOLER C., TAMKUN M., FELIPEET A. Kv1.5 association modifies Kv1.3 traffic and membrane localization. *J Biol Chem* (2008) vol. 283 (13) pp. 8756-64
- WATANABE Y., HAMAGUCHI-TSURU E., MORIMOTO N., NISHIO Y., YAGYU K., KONISHI Y., TOMINAGA M., MIYAZAKI J., FURUYA M., TOMINAGA A. IL-5-Induced Eosinophils Suppress the Growth of *Leishmania amazonensis* In Vivo and Kill Promastigotes In Vitro in Response to Either IL-4 or IFN-gamma. *DNA Cell Biol* (2004) vol. 23 (7) pp. 412-8
- WENIGER B., ROBLEDO S., ARANGO G., DEHARO E., ARAGON R., MUNOZ V., CALLAPA J., LOBSTEIN A., ANTON R. (2001) Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J Ethnopharmacol* 78(2–3):193–200
- WICKENDEN A. K(+) channels as therapeutic drug targets. *Pharmacol Ther* (2002) vol. 94 (1-2) pp. 157-82
- YARDLEY V., KHAN A., MARTIN M., SLIFER T., ARAUJO F., MORENO S., DOCAMPO R., CROFT S., OLDFIELD E. (2002) In vivo activities of farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 46(3):929–931

YU S., CHOI D. Ions, cell volume, and apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA (2000) vol. 97 (17) pp. 9360-2

ZILBERSTEIN D., SHAPIRA M. The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annu Rev Microbiol (1994) vol. 48 pp. 449-70