

Andréia Vieira Pereira

**Atividade anti-leishmania e imunomodulatória *in vitro*
da melitina natural na infecção experimental por
*Leishmania (L.) infantum chagasi***

**Botucatu/SP
2013**

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu
Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

**Atividade anti-leishmania e imunomodulatória *in vitro*
da melitina natural na infecção experimental por
*Leishmania (L.) infantum chagasi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para a obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Aluno: Andréia Vieira Pereira
Orientador: Prof. Dr. Benedito Barraviera
Co-orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

**Botucatu/SP
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Pereira, Andréia Vieira.

Atividade anti-leishmania e imunomodulatória in vitro da melitina natural na infecção experimental por Leishmania (L.) infantum chagasi / Andréia Vieira Pereira. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Benedito Barraviera

Coorientador: Rui Seabra Ferreira Junior

Capes: 40101096

1. Antiparasitários. 2. Agentes anti-inflamatórios. 3. Leishmania. 4. Citocinas.

Palavras-chave: Antiparasitário; Leishmania (L.) infantum chagasi; Prospecção; Toxinas.

DEDICATÓRIA

Ao Deus todo poderoso, pela força e saúde que sempre me proporcionou nesta caminhada e em toda minha vida, pelos momentos felizes durante esses anos e também pelos não tão bons, que me fizeram crescer.

A minha filha Andressa Vieira, meu presente de Deus, por todo amor, compreensão e força para superar a distância que nos separa.

A minha mãe e irmãs, pelo carinho e incentivo em todas as etapas desta busca pelo conhecimento.

Ao meu amado esposo Ricardo Schubert por todo amor, ajuda, paciência e total apoio nessa caminhada para realização de um sonho...

AGRADECIMENTOS

Este espaço que reservo para lembrar tantas pessoas que fazem parte da minha História, talvez seja o melhor momento de toda minha tese, pois faço uma retrospectiva de minha vida e descubro quantas oportunidades tive de conhecer pessoas, de viver momentos, de superar dificuldades.

À minha mãe Maria Nazareth Vieira por ser simplesmente o que é: força, determinação, coragem e amor;

Às minhas queridas irmãs Maria do Socorro Vieira e Jozinete Vieira por serem tão batalhadoras e acreditarem em mim, por estarem sempre do meu lado me apoiando e me encorajando nessa caminhada e, sobretudo pelos ensinamentos de profissão tão importantes para minha formação acadêmica e profissional, que de maneira nobre e sábia estendem a todos que as cercam;

Ao meu orientador Prof. Dr. Benedito Barraviera, agradecimentos são poucos para demonstrar a sua importância em minha vida;

Ao Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior pela contribuição na minha formação profissional;

À Profa. Dra. Sueli Aparecida Calvi pela grande colaboração, apoio, confiança, amizade, respeito ao meu trabalho;

Uma profunda gratidão à pesquisadora Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos pelo companheirismo, convivência harmônica e descontraída, por ter me mostrado que o conhecimento adquirido não deve ficar retido a um só indivíduo mais tem que ser repassado, pois, só assim conquistamos nossos objetivos com a consciência de não sermos egoístas para que possamos viver em paz;

Ao Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi pela generosidade em me receber no setor de apicultura, primordial para a concretização deste trabalho, muito obrigado por partilhar seus conhecimentos e disponibilidade;

Ao Prof. Dr. Daniel Pimenta por sua generosidade em me ajudar nas etapas iniciais desta pesquisa, pelos valiosos esclarecimentos e correções.

À Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares pela contribuição para o desenvolvimento desse estudo.

Ao Prof. Dr. André Gustavo Tempone pela atenção, colaboração e disposição em ensinar;

À Erika Gracielle pela imensa dedicação em aprender e ajudar, além de sua amizade e alegria contagiante;

Às amigas Vivian Scalon, Aline Ropeli, Patrícia Rocha, Letícia Pontes, Isabel Paiva, Priscila Silvestre, Priscila Zacarias, Francilene Capel, Eliana Peresi, Cristiane Melissa, Patrícia Orsi, Daniela Fossato e aos amigos Gustavo Adolfo, James Venturini e Helan Balderramas que sempre me deram força, principalmente nos momentos difíceis, e que com certeza levarei no meu coração por toda minha vida;

Em especial a Ebivaldo Gonçalves pela convivência e principalmente pelas boas risadas;

A todos aqueles que de alguma maneira me ajudaram e não estou citando individualmente.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de estudo cedida durante o curso.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem. Por isso
existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis”

(Fernando Sabino)

QUADRO DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo evolutivo das espécies de <i>Leishmania</i> spp.	14
Figura 2.	Resposta imune celular na Leishmaniose.	15
Figura 3.	Estrutura primária da melitina de <i>Apis mellifera</i> constituída por 26 resíduos de aminoácidos.	18
Figura 4.	Perfil cromatográfico do veneno bruto obtido por cromatografia líquida de fase reversa.	30
Figura 5.	Espectro de massa da melitina obtido por ESI em tensão de pulverização de 1,8 kV, mostrando íons [M +H].	31
Figura 6.	Efeito do veneno total de <i>Apis mellifera</i> , melitina e droga padrão sobre parasitas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> .	32
Figura 7.	Efeito da melitina isolada e do veneno total de <i>Apis mellifera</i> sobre macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c.	33
Figura 8.	Efeito da melitina isolada e do veneno total de <i>Apis mellifera</i> sobre macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c infectados com a forma amastigota de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	34
Figura 9.	Efeito da melitina em diferentes concentrações sobre macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c infectados com a forma amastigota de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> .	36
Figura 10.	Produção de IL-12 em sobrenadante de cultura de macrófagos desafiados ou não com o parasita, tratados e ou não com melitina.	37
Figura 11.	Produção de IFN- γ em sobrenadante de células totais desafiados ou não com o parasita, tratados ou não com melitina.	39
Figura 12.	Produção de TNF- α em sobrenadante de cultura de macrófagos desafiados ou não com o parasita, tratados ou não com melitina.	41
Figura 13.	Produção de IL-10 em sobrenadante de cultura de macrófagos desafiados ou não com o parasita, tratados ou não com melitina.	43
Figura 14.	Produção de TGF- β em sobrenadante de cultura de macrófagos ou não com o parasita, tratadas ou não com melitina.	44
Figura 15.	Produção de NO em sobrenadante de cultura de macrófagos desafiados ou não com o parasita, tratadas e não-tratadas com melitina.	46
Figura 16.	Produção de H ₂ O ₂ em sobrenadante de cultura de macrófagos desafiados ou não com o parasita, tratadas e não-tratadas com melitina.	48
Figura 17.	Esquematização do mecanismo modulador da melitina sobre macrófagos infectados com o parasita <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	59
Figura 18.	Quadro resumo do mecanismo modulador da melitina sobre macrófagos infectados com o parasita <i>L. (L.) infantum chagasi</i> .	60

LISTA DE ABREVIATURAS

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

ELISA – Enzyme Linked Immunossorbent Assay

SFM – Sistema Mononuclear Fagocitário

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

LVH – Leishmaniose Visceral Humana

NNN – Neal, Novy, Nicolle

LIT – Liver Infusion Tryptose

OMS – Organização Mundial de Saúde

FC – Fragmento cristalizável

PBS – Solução tampão de fosfato

IL-12 – Interleucina 12

IL-10 – Interleucina 10

IFN- γ – Interferon gama

Th1 – Linfócitos T auxiliares tipo 1

Th2 – Linfócitos T auxiliares tipo 2

TNF α – Fator de Necrose Tumoral alfa

WHO – World Human Organization

NADPH oxidase – Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato-oxidase

PLA₂ – Fosfolipase A₂

LPS – Lipopolissacarídeo

T[SH]² – Tripanotiona

TryR – Enzima tripanotiona redutase

iNOS – Enzima óxido nítrico síntese induzível

POPC– Palmitoil oleoil fosfatidilcolina

MTT– [3- (4,5- dimethtythiazol-2-yl) – 2,5 diphenyltetrazoliumbromide]

NF- κ^{β} – Fator nuclear kappa beta

DO – Densidade óptica

SFB – Soro bovino fetal

SDS – Dodecil sulfato de sódio

CE₅₀ – Concentração efetiva

NEED – N-(1Naphthyl) ethyl-enediamine

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

NO – Óxido nítrico

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 –	INTRODUÇÃO	13
2 –	OBJETIVOS	20
3 –	MATERIAL E MÉTODOS	21
4 –	RESULTADOS	30
5 –	DISCUSSÃO	49
6 –	CONCLUSÕES	61
7 –	REFERÊNCIAS	63
9 –	APÊNDICE	

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da melitina natural na infecção experimental por *Leishmania (L.) infantum chagasi*, bem como seu efeito sobre a produção de citocinas pró e antiinflamatórias e metabólitos do oxigênio e do nitrogênio. O fracionamento do veneno foi realizado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-RP) usando-se colunas C8 e C18. As frações foram identificadas por sequenciamento peptídico pela química degradativa de Edman e espectrometria de massas do tipo eletrospray. A determinação da atividade anti-leishmania, contra formas promastigotas foi realizada de forma seriada partindo-se de uma concentração inicial de melitina de 100 µg/mL observando-se o valor de CE₅₀ de 28,29 µg/mL. Foi realizado estudo de citotoxicidade em macrófagos peritoniais isolados de camundongos BALB/c, obtendo-se um valor de CE₅₀ de 5,73 µg/mL. A viabilidade celular de ambos os ensaios foi avaliada por meio do estudo da atividade oxidativa mitocondrial (MTT). Os estudos em formas amastigotas intracelulares demonstraram um valor de CE₅₀ de 1,47 µg/mL. Quanto a produção de citocinas por células desafiadas com o parasita e tratados com a melitina observou-se que houve tendência de aumento para as citocinas inflamatórias IL12 e TNF-α nas concentrações utilizadas e nos respectivos períodos de tempo. A melitina não interferiu na produção de IFN-γ e TGF-β, porém observamos diminuição significativa nos níveis de IL-10, fato semelhante observado na produção de H₂O₂ e NO. Conclui-se que a melitina demonstrou eficácia *in vitro* contra a espécie *Leishmania (L.) infantum chagasi*, podendo ter atuado de forma direta contra o parasita intracelular e/ou por meio da modulação da resposta imune levando a ativação de macrófagos, em que estes produziram outras substâncias que não NO e H₂O₂, proporcionando uma redução da carga parasitária dentro do macrófago, sem causar danos à célula. Estes resultados encorajam a realização de novos estudos por sugerir que a melitina seja uma possível molécula candidata ao tratamento da *Leishmania* spp.

Palavras- chave: Toxinas, prospecção, antiparasitário, *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the effect of natural melittin extracted and purified from the venom of *Apis mellifera* over an *in vitro* infection with *Leishmania (L.) infantum chagasi*, well as their effects on the production of proinflammatory and anti-inflammatory, and metabolites of oxygen and nitrogen. The fractionation of the venom was accomplished by high-performance liquid chromatography system (RP-HPLC) using C18 and C8 columns. These fractions were determined by peptide sequence using a combination of Edman degradation sequence analysis and electrospray ionization (ESI) mass spectrometry. The ascertainment of anti-leishmania activity against promastigote forms was conducted in a seriate form, beginning with an initial melittin concentration of 100µg/mL, noting an EC₅₀ value of 28.29 µg/mL. Cytotoxicity study was conducted in isolated peritoneal macrophages from BALB/c mice, obtaining an EC₅₀ value of 5.73µg/mL. The cell viability of both trials was assessed by means of the study of mitochondrial oxidative activity (MTT). The studies demonstrated an EC₅₀ value of 1.47µg/mL on intracellular amastigotes. As the cytokines production by cells challenged with parasite and treated with melittin, was observed that there was an increased tendency for inflammatory cytokines IL-12 and TNF-α at used concentrations and in the respective periods of time analyzed. The melittin did not interfered in the IFN-γ and TGF-β production, however were observed a significant decrease in the IL-10 levels, which was similarly observed in the H₂O₂ and NO production. It is concluded that melittin has shown *in vitro* efficacy against *Leishmania (L.) infantum chagasi* and may have a directly behavior against the intracellular parasite and/or by the immune response modulation, leading to an macrophages activation, and after, a production of other substances than NO and H₂O₂, providing a reduction in parasite load within the macrophage, without damaging the cell. These results aid further studies, by the suggestion that melittin is a possible candidate molecule for the treatment of *Leishmania spp.*

Keywords: Toxins, prospection, antiparasitic, cytokines

1 INTRODUÇÃO

A relevância epidemiológica das leishmanioses como doenças negligenciadas aumentou significativamente nos últimos anos. Como decorrência está havendo maior interesse e relacionamento entre os profissionais da saúde que atuam na área¹. Além disso, despertou-se grande preocupação quanto à carência de tratamentos eficientes para seres humanos e praticamente inexistentes para os animais. Por outro lado, a prospecção de novos fármacos exige estudos prévios tanto por meio de ensaios *in vitro* como *in vivo*. No tocante às leishmanioses, as ações das principais moléculas candidatas estão sendo investigadas tanto nos mecanismos diretos no parasita, quanto na inibição de vias metabólicas vitais e específicas². O interesse pelo estudo da ação imunomodulatória entre o parasita, a droga candidata e o hospedeiro também está na ordem do dia dos pesquisadores do mundo todo.

1.1 Leishmanioses

São zoonoses transmitidas por dípteros da família *Psychodidae*, seu agente etiológico um protozoário dimórfico da família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*^{3,4}. A importância das leishmanioses reside não somente na sua elevada incidência e ampla distribuição geográfica, mas principalmente pela sua capacidade de assumir formas graves e letais⁵.

No homem ocorrem sinais específicos que variam desde longos períodos febris até a caquexia em seu estágio final. Em cães as manifestações clínicas da leishmaniose visceral são variáveis, desde a presença, a gravidade ou ausência de sintomas⁶.

Estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a doença e aproximadamente dois milhões de novos casos ao ano são registrados dentre as diferentes formas clínicas⁷. No Brasil, a distribuição da leishmaniose visceral canina (LVC) apresenta-se em franco crescimento⁸.

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos contendo formas amastigotas de *Leishmania* spp. Após um período de oito a vinte dias do repasto sanguíneo, estas evoluem para forma promastigota no tubo digestivo do inseto, tornando-se infectante⁹.

Transmitidos por meio do repasto sanguíneo de flebotomínios, estes protozoários são organismos unicelulares que apresentam um ciclo de vida heteroxênico, apresentando-se sob duas formas evolutivas básicas: a promastigota que está presente no vetor, e a amastigota que é forma intracelular obrigatória no hospedeiro vertebrado^{10,11} (Figura 1).

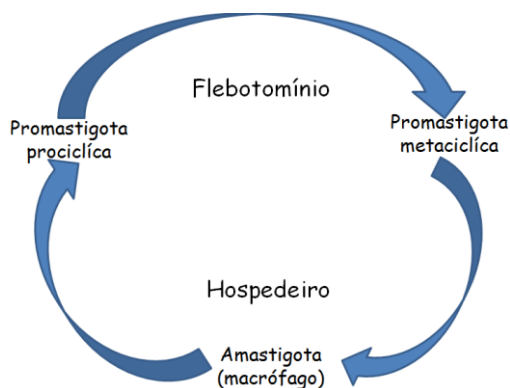


Figura 1. Ciclo evolutivo das espécies de *Leishmania* spp. FONTE: Adaptado de Descoteaux e Turco¹².

As formas promastigotas metacíclicas inoculadas na derme do hospedeiro mamífero são internalizadas por células fagocíticas residentes. Dentro do fagolisossomo se transformam em amastigotas que se multiplicam por divisão binária, rompendo a célula hospedeira e infectando outras células fagocíticas¹³. As formas amastigotas disseminam-se por meio dos sistemas linfático e vascular e, ocasionalmente se infiltram na medula óssea, fígado e baço¹⁴.

1.2 Imunopatologia e resposta imune na leishmaniose visceral

Durante o processo de diferenciação do parasita em formas promastigotas não infectantes para as formas promastigotas metacíclicos infectantes, ocorre uma série de modificações bioquímicas, tornando estes capazes de evadir do sistema de defesa do hospedeiro vertebrado, produzindo uma infecção persistente¹⁵. No entanto, pode ocorrer opsonização dos metacíclicos com os receptores C3b ou C3bi promovendo ativação das células fagocitárias pela ligação com receptores do complemento. Isto facilita a ligação do parasita com os receptores CR1 e CR3, respectivamente, e sua adesão ao macrófago hospedeiro^{16,17}. Uma vez dentro do macrófago, o parasita é protegido da degradação do fagolisossoma inibindo o mecanismo de defesa celular¹⁸. No entanto, o macrófago possui e utiliza uma série

de estratégias para controlar a infecção parasitária. Uma delas é a produção do estresse oxidativo por macrófagos após a fagocitose, em que neste processo são produzidos importantes oxidantes como radicais do oxigênio e do nitrogênio, que atuam no controle da infecção por meio da interação com os fosfolípidos de membrana do patógeno¹⁸.

Após a fagocitose da forma promastigota, os monócitos e células dendríticas liberam a IL-12, que estimula os linfócitos T CD4⁺ a secretarem o IFN- γ precocemente. Em combinação com esta citocina, a IL-12 induz a diferenciação e proliferação de células Th1, as quais produzirão mais IFN- γ . Macrófagos infectados secretam TNF- α , que age em sinergismo com o IFN- γ para ativar ou induzir a atividade antiparasitária desta célula, por meio da produção dos reativos intermediários do oxigênio¹⁸⁻²⁰ (Figura 3).

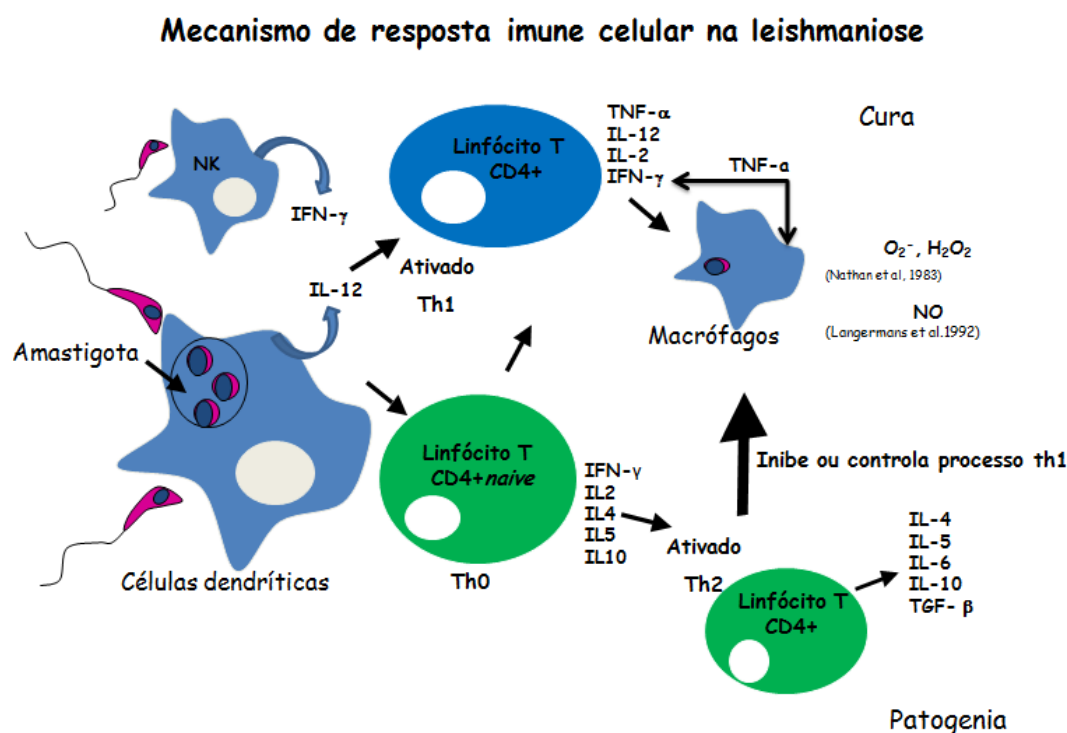


Figura 2. Resposta imune celular na Leishmaniose. Adaptado de Hernández-Ruiz (2006).

Por outro lado, a suscetibilidade é usualmente relacionada à indução de uma resposta Th2 e, conseqüentemente, com produção de IL-4 e de outros componentes que desativam macrófagos, como IL-10, TGF- β e prostaglandinas E2. A inibição da produção do RNA mensageiro da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) em macrófagos tem sido associada com a produção de TGF- β e IL-10, citocinas relacionadas com exacerbação da doença^{21,22}.

1.3 Terapia anti-leishmaniose e investigação de novos fármacos

Para o tratamento de quadros clínicos de *Leishmania visceral*, são usados antimoniais pentavalentes, (PVAs), cuja ação curativa foi descoberta pelo brasileiro Gaspar Vianna em 1912²³. Destacam-se o glucantime e o pentostan que são administrados por via parenteral além da pentamidina e anfoterincina B. Essas drogas vêm sendo utilizadas há mais de seis décadas e apresentam efeitos adversos, tais como: dores articulares, musculares e abdominal, cefaleia, dispnéia, erupção cutânea, edema facial, alterações das funções renal, hepática e pancreática^{6, 24}.

Considerando a gravidade desses efeitos, outras drogas como a miltefonisa, paromomicina, azóis, sitamaquina e análogos a nucleosídeos vem sendo testadas. Além disso, têm sido desenvolvidos estudos visando encontrar tratamentos alternativos para as leishmanioses humanas. Porém, o uso desses medicamentos não é considerado uma medida recomendada para cães pois não propiciam a cura parasitológica^{25,26}.

Tendo em vista estes fatos, alvos moleculares vêm sendo estudados para identificação de substâncias capazes de modular as atividades do parasita²⁴. Um bom alvo de drogas deve ser expresso em um estágio relevante do ciclo de vida do parasita e preencher um ou mais dos seguintes critérios: ser exclusivo do parasita; ser essencial para sua sobrevivência, inibir as vias metabólicas vitais e específicas do parasita; atuar inibindo o metabolismo de folatos, a síntese de poliaminas e tubulinas, a biossíntese de esteróides, do DNA topoisomerasas, dos complexos organometálicos e por fim da via do óxido nítrico^{2,27,28}.

Estudos utilizando produtos naturais têm sido realizados para encontrar uma terapia eficaz contra a leishmaniose, na tentativa de contornar os mecanismos de escape do parasita, bem como minimizar a exposição a drogas potencialmente tóxicas²⁹. Extratos de varias plantas medicinais coletadas nas regiões tropicais da Índia, Guiana Francesa, Sudão, Espanha entre outros países, foram eficazes em camundongos infectados com *L. amazonensis*, assim com a forma amastigota *in vitro* de *L. infantum* e *L. donovani*²⁹⁻³⁴.

Assim como efeito de venenos animais sobre este parasita tem sido amplamente investigado com exito³⁵⁻³⁷.

1.4 Melitina e seus mecanismos de ação

O veneno de abelha *Apis mellifera* tem sido usado há décadas para aliviar a dor e tratar doenças inflamatórias, incluindo a artrite reumatoide³⁶. Também tem sido utilizado na experimentação animal³⁷. O veneno bruto é um conjunto de moléculas biologicamente ativas tais como melitina, fosfolipase A₂ (PLA₂), histamina, hialuronidases, dopamina e noradrenalina³⁸. Trata-se de excelente ferramenta de estudo na busca por moléculas candidatas.

A melitina, principal componente tóxico do veneno, é um peptídeo citolítico composto por 26 resíduos de aminoácidos, formada por uma hélice anfipática altamente carregada com um terminal carboxila^{39,40}. A figura 4 mostra sua estrutura secundária constituída por duas alfa-hélice ligadas por um segmento flexível.

De acordo com Papo & Shai,⁴¹ a melitina é uma molécula muito sensível e pode adotar diferentes conformações e estados de agregação dependendo da solução em que está diluída. Assim, em meio aquoso apresenta uma conformação não estruturada e uma forma α -hélice na ligação com membranas lipídicas, em concentrações com baixa carga iônica apresenta-se como um monômero com conformação helicoidal aleatória, e em concentrações salinas apresenta-se como um tetrâmero de estrutura α -hélice⁴²⁻⁴⁴.

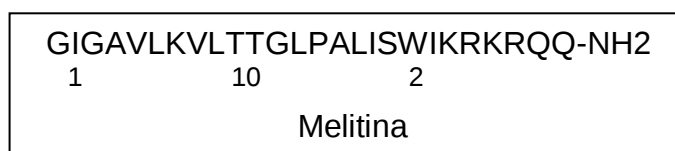


Figura 3. Estrutura primária da melitina constituída por 26 resíduos de aminoácidos.

A melitina apresenta um papel importante como surfactante, pois aumenta a permeabilidade de membranas plasmáticas, principalmente de hemácias⁴⁵. Tem a capacidade de interagir e extravasar células do tipo leucócitos e mastócitos e nas concentrações micromolares, induz a liberação de histamina⁴⁶. Causa também hemólise em diferentes espécies de mamíferos além de possuir atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiprotozoário⁴⁷.

Além disso, apresenta uma excelente atividade anti-inflamatória, atua inibindo os lipopolissacarídeos (LPS) e ativa o fator nuclear kappa B (NF- κ B) impedindo a translocação por meio da interação melitina-proteína⁴⁸.

Estudos realizados por Kwon et al,⁴⁹ confirmam que a melitina também suprime reações inflamatórias induzidas por lipopolissacarídeo (LPS), assim como, inibe a produção de TNF- α em vários tipos de células. Promove também a inibição da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e consequentemente a produção de óxido nítrico.

Vários estudos foram realizados avaliando a interação da melitina com as membranas lipídicas. Verificou-se que a ação deste peptídeo depende da sua concentração, da solução em que foi diluído, composição lipídica, nível de hidratação e do potencial das membranas⁵⁰⁻⁵⁸.

De acordo com Batenburg et al,⁴⁴ e Gonçalves et al,⁵⁹ a melitina apresenta uma maior afinidade com membranas carregadas negativamente e compostas por fosfolípidios tipo POPC (palmitoil oleoil fosfatidilcolina), ressaltando que nesse processo ocorrem interações hidrófobas e eletrostáticas^{51,59}. Tais interações formam poros ou canais que atravessam a camada lipídica da membrana.

O processo de formação de poros ocorre da seguinte forma: primeiro o peptídeo forma um tapete sobre a membrana, na qual vai se inserindo de forma perpendicular formando complexos com os grupos lipídicos. O peptídeo possui carga positiva e no momento da interação com a membrana, que possui carga negativa, ocorre uma repulsão entre seu monômero possibilitando ou causando o dobramento desta e consequentemente formação de poros toroidais^{56,60}. No entanto a melitina, pode também formar poros do tipo barril, onde a região hidrofóbica dos peptídeos se alinha com a região lipídica da bicamada e a parte hidrofílica dos peptídeos forma a região interior do poro^{56,60}.

Em baixas concentração, a ação da melitina sobre as membranas pode ser considerada detergente-like. Baseia-se na intercalação de peptídeos em bicamadas lipídicas e este representa um mecanismo para a atividade de moléculas anfipáticas⁶¹. Nesse caso a molécula se orienta de forma paralela, agregando-se à superfície da membrana lipídica formando um tapete ou carpete na superfície, deixando a membrana delgada e consequentemente formando um estado micelar bastante complexo^{62,67}.

A membrana das células eucarióticas são compostas por colesterol, que influencia diretamente na atividade da melitina sobre estas células ⁶⁷. Isto ocorre porque a melitina é composta de aminoácidos entre eles o triptofano que é responsável pela formação de um complexo estável com o colesterol, potencializando o mecanismo de ação da melitina sobre estas células, porém este aminoácido também inibe a atividade lítica da melitina ^{60,67}. Além disso, ainda pode causar agregação, fusão de membranas e “budding” ^{68,69}.

No entanto a melitina apresenta outros mecanismos de ação, podendo este ser usado como um coadjuvante auxiliando em outras terapias contra as leishmanioses como relatado por Velasco et al.,⁷⁰ assim como também pode exercer a sua atividade anti-leishmania por modulação do processo de morte celular semelhante a apoptose ou accidental (necrose) ⁷¹.

Tendo em vista a dificuldade de novas alternativas terapêuticas que atuem sobre os sistemas de transdução de sinais envolvidos na viabilidade, proliferação e diferenciação em tripanossomatídeos, os estudos científicos procuram desvendar os diferentes mecanismos de escape dos parasitas à resposta imune do hospedeiro e principalmente a capacidade deste em se manter por longo tempo na célula hospedeira ²⁷.

Desta forma, torna-se necessário também o conhecimento dos mecanismos de ação de novos fármacos, frente à forma intracelular deste parasita, no sentido de contribuir para a utilização racional, traçando novas estratégias terapêuticas para o seu uso no tratamento das Leishmanioses.

Sendo assim, encontrar uma terapia eficaz para as leishmanioses utilizando um produto natural de origem animal que apresente mecanismo de inibição de vias metabólicas essenciais para o parasita e que minimize os efeitos adversos em relação aos fármacos disponíveis no mercado, é de total relevância na terapêutica anti-leishmania ^{29,72}.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Avaliar o efeito da melitina natural sobre a atividade anti-leishmania, produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e metabólitos do oxigênio e do nitrogênio na infecção experimental por *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

2.2 ESPECÍFICOS

- 1- Extrair o veneno de abelhas africanizadas *Apis mellifera*;
- 2- Purificar e identificar a melitina por meio de cromatografia líquida de fase reversa (HPLC-RP) e espectrometria de massas (ESI)
- 3- Determinar a concentração efetiva da melitina (CE₅₀);
- 4- Determinar *in vitro* a atividade anti-leishmania contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmania (L.) infantum chagasi*;
- 5- Avaliar em macrófagos peritoniais de camundongos Balb/c a citotoxicidade do veneno total e da melitina;
- 6- Determinar os níveis das citocinas IL-12, IFN- γ , IL-10, TNF- α e TGF- β em sobrenadantes de culturas de macrófagos e células totais obtidas de camundongos Balb/c desafiados ou não com o parasita, e tratadas ou não com a melitina, por meio da técnica de Elisa;
- 7- Determinar a produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de oxigênio (H₂O₂) em sobrenadantes de culturas de macrófagos obtidos de camundongos BALB/c, desafiados ou não com o parasita, e tratadas ou não com a melitina, por meio da reação de Griess.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Trabalho aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP no dia 28/07/2011 sob protocolo CEEA 8932011.

3.1 Veneno

O veneno foi extraído de abelhas africanizadas *Apis mellifera* com idade entre 30 e 40 dias, por meio de estimulação elétrica⁷⁹, duas vezes por semana, no período de Dezembro de 2010 a Junho de 2011. As colméias do apiário localizado no Núcleo de Ensino, Ciência e Tecnologia em Apicultura Racional (NECTAR) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) localizado na Fazenda Experimental Edgárdia, da UNESP, campus de Botucatu, com as seguintes coordenadas geográficas: 22°49' de latitude Sul; 48°24' de longitude Oeste e altitude média de 623m foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Ricardo de Oliveira Orsi para extração de veneno.

3.2 Isolamento e purificação das frações por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

O isolamento e a purificação da melitina foram realizados no Laboratório Bioquímica e Biofísica – Butantan/ São Paulo, pelo pesquisador Dr. Daniel Carvalho Pimenta. Para tanto, utilizou-se técnicas cromatográficas de fase reversa em sistema binário Shimadzu 20A Proeminence HPLC por meio de colunas C8 e C18. O veneno bruto liofilizado foi solubilizado em 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético na concentração de 1 mg/mL. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi separado para análise cromatográfica. Uma alíquota de 20µL foi carregada em coluna C18 ACE (ACE 5µm, C18, 300A, 250×4mm). Para o fracionamento foi utilizado um sistema de dois solventes: (A) ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) e (B) ácido trifluoroacético 0,1% (v/v)/acetonitrila 90% (v/v). A eluição foi realizada em um fluxo constante de 0,2 mL/min para melitina e 3,5 mL/min para as demais frações, com um gradiente de 5-60% de solvente B. O material foi obtido a partir de sua detecção por um espectrofotômetro em absorbância UV de 214 nm. Em seguida, as frações isoladas foram submetidas ao sequenciamento peptídico por

química degradativa de Edman por meio de um sequenciador automático de proteínas (marca Shimadzu, modelo PPSQ-23A) para a identificação das moléculas biológicas isoladas.

3.2.1 Espectrometria de massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório Bioquímica e Biofísica – Butantan/ São Paulo, pelo pesquisador Dr. Daniel Carvalho Pimenta. As análises foram realizadas em um espectrômetro de massas de ESI (LCQDuoTM, ThermoFinnigan, EUA), equipado com uma fonte de nanospray e conectado ao sistema de nano HPLC (Ultimate Sistema HPLC, LC Packings, Dionex, EUA). As amostras foram diluídas em ACN a 5% contendo 0,2% de ácido fórmico e foram introduzidas no espectrômetro, a uma taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹. A tensão de pulverização foi mantida a 1,8 kV, a tensão capilar a 46 V, a temperatura capilar a 180°C. Os espectros de massas foram coletados na faixa de 50-2000 m/z. Instrumento de controle, aquisição de dados e processamento de dados foram realizadas com o software Suite Xcalibur.

3.3 Cepas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*

Foram utilizadas formas promastigotas, gentilmente cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz sob numero 579. E mantidas no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais (LEPDT), do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Estas formas são mantidas neste laboratório, por passagem a cada 21 dias, em meio bifásico Agar-sangue, Novy- MacNeal- Nicolle- NNN associado ao meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (SFB), 10 mg/mL de gentamicina, incubados em estufa BOD (Biologic Oxygen Demond TE-381) a 25°C, em tensão de 5% de CO₂^{74,75}.

3.4 Avaliação da sensibilidade *in vitro* da forma promastigota de *Leishmania (L.) infantum chagasi* frente ao veneno total e melitina

A avaliação da sensibilidade *in vitro* da forma promastigota frente ao veneno total e melitina foi realizada no Laboratório de Toxinologia Aplicada a Fármacos

Antiparasitários, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, sob a coordenação do professor Dr. André Gustavo Tempone.

A sensibilidade *in vitro* das formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* tratadas com a melitina e com o veneno total de *Apis mellifera* foi determinada pelo método colorimétrico, por meio do estudo da atividade oxidativa mitocondrial empregando o sal de tetrazólio MTT [3- (4,5- dimethtythiazol-2-yl) – 2,5 diphenyltetrazoliumbromide] na concentração de 5 mg/mL diluído em PBS, filtrado com membrana de metilcelulose de poro 0,22 µM (Millipore)⁷⁶.

As promastigotas em fase logarítmica tardia de crescimento foram lavadas três vezes em tampão de fosfato (PBS), e a concentração foi ajustada para 10⁶/mL, a partir da contagem em câmara de Neubauer. Após a contagem, a cultura contendo o parasita foi aplicada em microplacas de 96 orifícios com meio LIT suplementado com 10% de SFB.

A melitina e o veneno total foram dissolvidos em PBS, e diluídos de forma seriada a partir da concentração inicial de 100 µg/mL para a melitina e de 300 µg/mL para o veneno total⁷⁶. A seguir foram adicionadas individualmente às culturas. Para garantir a eficácia do ensaio, foi utilizado a Anfotericina B como controle positivo e o PBS sem fármaco como controle negativo.

As microplacas foram incubadas em estufa BOD (Biologic Oxygen Demond TE-381) a 25°C, e realizadas duas leituras no período de 24 e 48 horas em Microscópio invertido (Nikon- Eclipse- TS100). Posteriormente a última leitura, em capela de fluxo laminar, foi acrescentado 20 µL/orifício de MTT/mL diluído em PBS em cada orifício. A placa foi incubada por um período de 4 horas a 37°C para conversão do sal de tetrazólio em formazan. A reação enzimática foi paralisada e o precipitado de formazam foi solubilizado pela adição de 80 µL de SDS a 10% diluído em água Milli-Q. Em seguida a densidade óptica (DO) foi mensurada em um MS Multiskan (UNISCIENCE) a 550 nm e desta foi subtraído o valor da absorbância do branco.

A porcentagem de inibição para cada concentração das frações do veneno testadas foi determinada pela relação entre a absorbância da cultura tratada com as frações do veneno e a absorbância do controle não tratado. A concentração da melitina que reduziu em 50% a sobrevivência do parasita (CE₅₀) foi determinada por meio de análise de regressão não-linear (curva dose-resposta), utilizando o

software Prism Pad versão 5.0, e expressa com média $\pm$ desvio padrão. Este ensaio foi realizado em triplicata. A diferença de sensibilidade da fração isolada foi determinada pelo teste estatístico Mann-Whitney (GraphPad Prism versão 5.0) para comparação de medianas e nível de significância ($P < 0,05$).

3.5 Obtenção de células totais e macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c

Para obtenção de células totais e macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, cinco animais foram submetidos à eutanásia, em câmara de CO₂. Posteriormente, foi injetado RPMI-1640 completo com soro fetal bovino a 10% com vermelho fenol gelado ou meio de cultura de células completo (MCCC), na cavidade abdominal na região intraperitoneal, de modo a não atingir nenhum órgão ou vaso sanguíneo, usando uma agulha 25G com o bisel virado para cima. Foi realizada massagem abdominal durante um a dois minutos para facilitar a remoção dos macrófagos peritoneais para esta região. Após a massagem, foi realizada a coleta do líquido com seringas descartáveis de três mL, com agulhas 19G e bisel virado para cima. Para o isolamento das células totais e macrófagos o líquido recolhido da cavidade peritoneal dos animais foi centrifugado a 400 g, durante 10 minutos, a 4°C.

Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e o pellet foi ressuspenso com a adição de MCCC⁷⁷. As células foram avaliadas quanto a sua integridade em microscópio óptico e aliquotados em placas de 96 orifícios na proporção de (4×10^5) células/mL. Para obtenção de macrófagos, após duas horas de incubação as células não aderentes foram retiradas em seguida as células aderentes e células totais foram desafiadas com o veneno total e melitina nas concentrações citadas no item 3.4.

3.6 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c

A avaliação citotóxica em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c do veneno total e da melitina, foi realizada no Laboratório de Toxinologia Aplicada a Fármacos Antiparasitários, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, sob a coordenação do professor Dr. André Gustavo Tempone.

Após a obtenção dos macrófagos peritoniais, estes foram incubados com o veneno total e melitina, que foram diluídas de forma seriada e incubados a 37°C, em tensão de 5% de CO₂, por períodos de 24 e 48 horas⁷⁸.

Após estes períodos foram retirados de cada orifício 200 µL de meio e acrescentado a 200 µL de novo meio de cultura sem vermelho de fenol e na ausência de gentamicina. Após cada período, em capela de fluxo laminar foram acrescidos 20µL/ orifício de MTT/mL diluído em PBS em cada orifício por um período de 4 horas a 37°C para conversão do sal de tetrazólio em formazan. A reação enzimática foi paralisada e o precipitado de formazan foi solubilizado pela adição de 80 µL de SDS a 10% diluído em água *Milli-Q*. Em seguida a densidade óptica (DO) foi mensurada em um MS Multiskan (UNISCIENCE) a 550 nm e desta foi subtraído o valor da absorbância do branco.

A concentração das frações do veneno que reduziu em 50% a sobrevivência das células (CE₅₀) foi determinada por meio de análise de regressão não-linear (curva dose-resposta), utilizando o software Prism Pad versão 5.0, e expressa com média ± desvio padrão. Este ensaio foi realizado em triplicata. A diferença de sensibilidade às frações isoladas foi determinada pelo teste estatístico Mann-Whitney (GraphPad Prism versão 5.0) para comparação de medianas e nível de significância (P <0,05).

3.7 Avaliação da sensibilidade *in vitro* de formas amastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* frente à melitina

A avaliação da sensibilidade *in vitro* da forma amastigota frente à melitina foi realizada no Laboratório de Toxinologia Aplicada a Fármacos Antiparasitários, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, sob a coordenação do professor Dr. André Gustavo Tempone.

A forma amastigota de *L. (L.) infantum chagasi*, foi gentilmente cedida pelo professor Dr. André Gustavo Tempone. Esta cepa é mantida no Laboratório de Toxinologia Aplicada a Fármacos Antiparasitários, Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, em hamsters sírio dourado (*Mesocricetus auratus*).

As cepas são hospedadas nesses animais, por cerca de 60 a 70 dias, com passagem da cepa para outro animal realizada a cada dois meses.

As amastigotas de *L. (L) infantum chagasi* isoladas do baço de hamster foram submetidas à análise de susceptibilidade à melitina *in vitro* utilizando ensaios de infecção em macrófagos.

Para tanto, após a eutanásia desses animais, o baço foi retirado de forma cirúrgica, e em seguida, foi feito imprints do baço, fixados em metanol por 5 minutos, e coradas pelo método panótico rápido (Bioclin, Brasil), pesquisando-se a presença de formas amastigotas por exame microscópio direto (Nikon E-200).

Confirmado a infecção, o baço foi pesado e macerado com 5 mL de PBS, centrifugado a 100g por 5 minutos, após este processo o sobrenadante foi recolhido e transferido para outro tubo Falcon. Em seguida o sobrenadante foi centrifugado novamente a 1200g por 10 minutos e o pellet resultante dessa centrifugação foi ressuspenso em 5 mL de PBS estéril, que foi reservado até a realização da infecção em estufa a 37°C em tensão de 5% de CO₂ por um período de 24 horas.

As células peritoniais foram obtidas de camundongos BALB/c, conforme o item 3.5, e a concentração celular foi ajustada para 8×10^4 células/mL, em seguida, a suspensão celular foi aliquoteada nesta proporção em placas de microcultura de 16 orifícios Nunc (Lab-Tek® Chamber Slide™ System, USA), e incubadas em estufa a 37°C em tensão de 5% de CO₂ por um período de 24 horas.

Os macrófagos foram incubados com as formas amastigotas de *L. (L) infantum chagasi* na razão de 1:10 (macrófagos: amastigotas) diluída em RPMI-1640⁷⁶. A cultura foi mantida em estufa a 37°C em tensão de 5% de CO₂ por um período de 24 horas⁷⁶.

Após esse período, os parasitas extracelulares foram removidos da cultura por lavagem das células com MCCC em seguida, foi acrescentada a melitina diluída em PBS, a partir da concentração determinada no ensaio de citotoxicidade, descrita no item 3.6.

Culturas tratadas com o Glucantime® (Sb^V) foram utilizadas como controle positivo e culturas com PBS como controle negativo. A placa foi incubada em estufa a 37°C em tensão de 5% de CO₂ por um período de 24 a 120 horas⁷⁶. Os sobrenadantes foram recolhidos para posterior dosagem de citocinas e metabólitos do oxigênio. Finalizado esse período, o meio das placas foi descartado, e as culturas foram fixadas adicionando-se MeOH por 5 minutos e Giemsa 1:10 por 6

minutos, consecutivamente. Em seguida a placa foi lavada com água e removido o plástico e silicone que é colado na lâmina, para posterior leitura em microscópio ótico. A carga parasitaria foi verificada pelo número de macrófagos infectados em 200 células⁷⁸.

3.8 Determinação da produção de citocinas IFN- γ , IL-12, IL-10, TGF- β e TNF- α

As células peritoniais foram coletadas de camundongos Balb/c sadios, conforme o item 3.5. Centrifugadas a 400g por 10 minutos a 4°C e quantificadas em câmara de Neubauer. Posteriormente, alíquotas de 8×10^4 células/ mL de meio de cultura RPMI-1640 sem soro fetal bovino, foram distribuídas em triplicatas em placa de microcultivo com 96 orifícios (LabTech, Melbourn, Inglaterra). As células foram incubadas em novo MCCC por 24 horas em estufa a 37°C, em tensão de 5% de CO₂. Após este período as células totais e macrófagos foram infectados com as formas promastigotas de *L. (L) infantum chagasi* na razão de 1:10 (macrófagos: promastigotas) diluída em RPMI-1640, por um período de 24 horas⁷⁶. Em seguida, foi acrescentada a melitina diluída em PBS, a partir das concentrações determinadas no ensaio de citotoxicidade, em que T1 (2,5 μ g/mL); T2 (1,47 μ g/mL); T3 (0,7 μ g/mL). Os sobrenadantes foram recolhidos nos períodos de 24, 48 e 72 horas, mantidos a -80°C, em que escolhemos o tempo de 72 horas como período máximo para avaliação dos níveis de citocinas, pois a produção destas pelas células é reduzida ou mesmo perdida em períodos maiores. Posteriormente foi realizado a dosagem das citocinas IFN- γ , IL-12, IL-10, TGF- β e TNF- α , utilizando-se o kit Quantikine® HS, R&D Systems, conforme as instruções do fabricante.

3.9 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

A avaliação das concentrações do óxido nítrico foi realizada pela medida de nitritos (NO²) e nitratos (NO³-)⁷⁹. A dosagem de nitrito foi feita por meio da reação de Griess^{80,81}.

Em 100 μ L de sobrenadante da cultura de macrófagos, conforme o item 3.5, em que foram previamente desafiados ou não com o parasita e tratadas ou não com a melitina, em concentrações definidas no ensaio de citotoxicidade adicionado o

mesmo volume do reagente de Griess, que contém NEED 0,1% (m/v) (N-(1Naphthyl) ethyl-enediamine – Sigma Co. USA) diluído em água destilada e sulfanilamida a 1% (v/v) (Sigma Co. USA), diluída em ácido fosfórico (H_3PO_4) a 5% (v/v). Os dois reagentes foram misturados em volumes iguais no momento da reação e as amostras foram lidas em leitor automático de ELISA, com filtro de 540 nm, comparado a um branco constituído por reagente de Griess.

Todas as medições foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em micromoles de $\text{NO}/8 \times 10^4$ células, a partir de curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída com concentrações molares conhecidas de NO_2^- variando de 200 a $0,39 \mu\text{M}$.

3.10 Determinação da produção de água oxigenada (H_2O_2)

A produção de H_2O_2 foi determinada segundo o método descrito por Pick e Keisari,⁸² e adaptado por Pick e Mizel⁸³.

Após os períodos de incubação com os diferentes tratamentos descritos no item 3.7, os sobrenadantes das microculturas foram retirados e aos macrófagos aderidos nos orifícios da placa foram acrescentados $100 \mu\text{L}$ de solução tampão (vermelho fenol contendo: 140 mM de NaCl ; 10 mM de tampão fosfato pH 7; 5,5 mM de dextrose; 0,56 mM de vermelho fenol; 0,01 mg/mL de peroxidase de raiz forte tipo II - Sigma Chemical Co, ST Louis, MO, USA), contendo 10% de soro autólogo fresco. Após 4 horas, a reação foi interrompida pela adição de 0,01 mL de NaOH 1N. A absorbância foi determinada em leitor automático de ELISA, com filtro de 620 nm, contra um branco constituído de solução vermelho fenol e NaOH a 1N. Todas as medições foram realizadas em triplicado, e os resultados da dosagem de H_2O_2 foram expressos em nanomoles de H_2O_2 / 8×10^4 células, a partir de curva-padrão estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações molares conhecidas de H_2O_2 em tampão vermelho fenol. Em nossas condições experimentais a curva foi realizada com concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; e 8 nM de H_2O_2 .

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (D.P.M.). Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, quando o número de grupos era maior que dois. Dados não paramétricos foram expressos como mediana e foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. Toda a análise foi realizada com software GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Para todos os testes estatísticos foi considerado o nível de significância de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento e purificação das frações por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

O isolamento da fração melitina extraídas do veneno bruto foi realizado por meio da cromatografia líquida de fase reversa. Vinte picos foram detectados e submetidos ao sequenciamento peptídico N-terminal para auxiliar na localização das frações de interesse.

A figura 4 representa o perfil cromatográfico do veneno bruto identificando-se as frações apamina (A), fosfolipase A₂ (B) e melitina (C), respectivamente

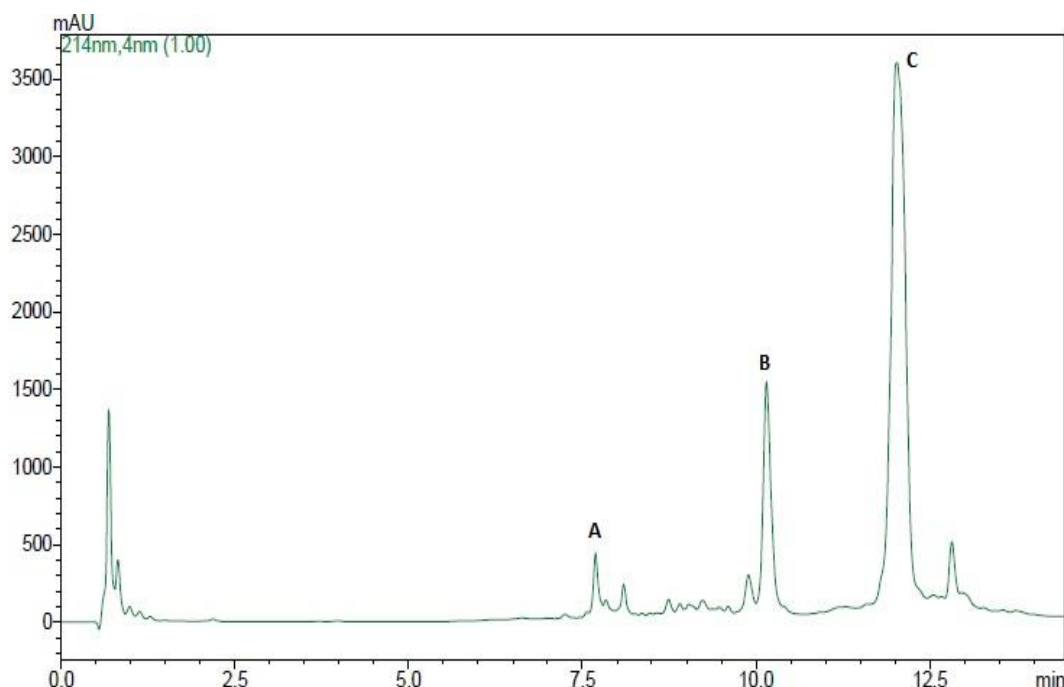


Figura 4. Perfil cromatográfico do veneno bruto obtido por cromatografia líquida de fase reversa. Picos: A (apamina); B (fosfolipase A₂) e C (melitina).

A massa molecular e a pureza da fração foi analisada por espectrometria de massas ESI, onde para a melitina foi evidenciada pelo íon $[M+3H]^{3+}$ (950,30); $[M+4H]^{4+}$ (722,54) e $[M+5H]^{5+}$ (568,78) resultando na massa molecular de 2.890,16 Da. Estes dados estão representados na figura 5.

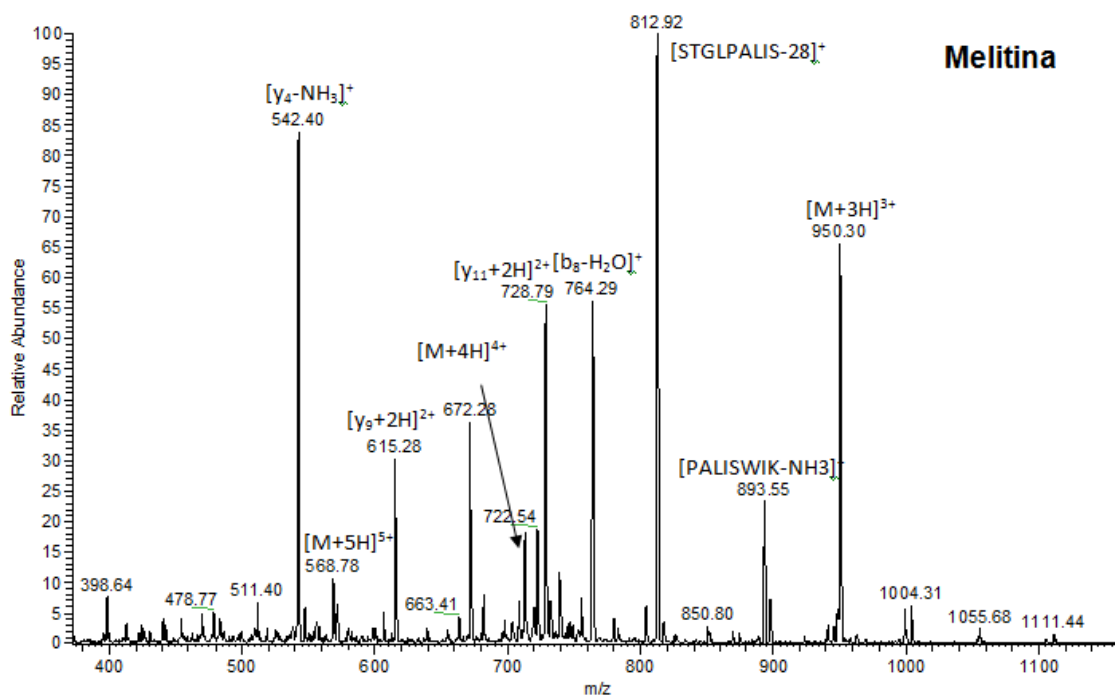


Figura 5. Espectro de massas da melitina obtido por ESI em tensão de pulverização de 1,8 kV mostrando íons $[M+H]$.

4.2 Efeito da melitina na sobrevivência da forma promastigota de *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*

A curva de crescimento das culturas de promastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* desafiadas com o veneno total, melitina e anfotericina B está representada na figura 6. Observou-se que a melitina é tóxica para formas promastigotas de *Leishmania* apresentando uma CE_{50} 28,29 $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança 95% = 23,97- 33,39 $\mu\text{g/mL}$) nos tempos de exposição de 24 e 48 horas. O veneno total apresentou valor de CE_{50} 87 $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança 95% = 76,91- 99,22 $\mu\text{g/mL}$) sendo que a diferença entre ambos os tratamentos foi significativa ($p < 0,05$). A anfotericina B apresentou valor de CE_{50} 0,089 $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança 95% = 0,03- 0,21 $\mu\text{g/mL}$) sendo que a diferença entre os três tratamentos foi significativa para $p < 0,05$. A melitina foi 3 vezes mais efetiva que o veneno total de *Apis mellífera*.

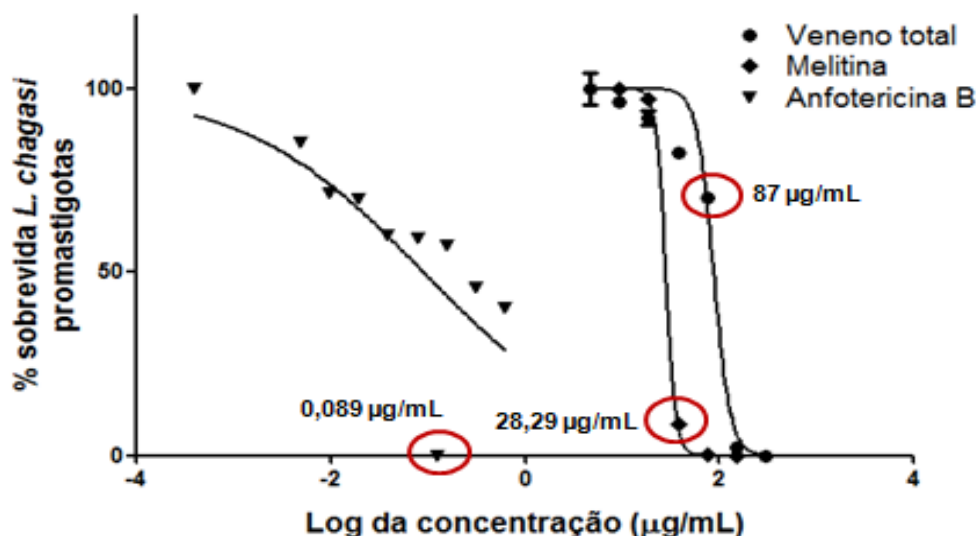


Figura 6. Efeito do veneno total, melitina e anfotericina B sobre parasitas de *L. (L.) infantum chagasi*.

4.3 Efeito da melitina sobre a citotoxicidade em macrófagos

Para a determinação da citotoxicidade da melitina sobre macrófagos, estas células foram expostas a diferentes concentrações nos tempos de 24 e 48 horas, em que a viabilidade celular foi avaliada por meio de ensaio colorimétrico MTT. O resultado obtido está representado na figura 7.

Para o período de 48 horas de exposição pode-se observar que houve citotoxicidade, o qual não diferiu estatisticamente do período de 24 horas, onde a melitina apresentou uma CE_{50} 5,73 µg/mL (intervalo de confiança 95% = 5,08 – 6,44 µg/mL) sem afetar os macrófagos, sendo considerada esta mais tóxica que o veneno total (Figura 7). No entanto o veneno total apresentou valor de CE_{50} 27,59 µg/mL (intervalo de confiança 95% = 20,63 - 36,90 µg/mL), diferindo significativamente do ensaio com a melitina ($p < 0,05$).

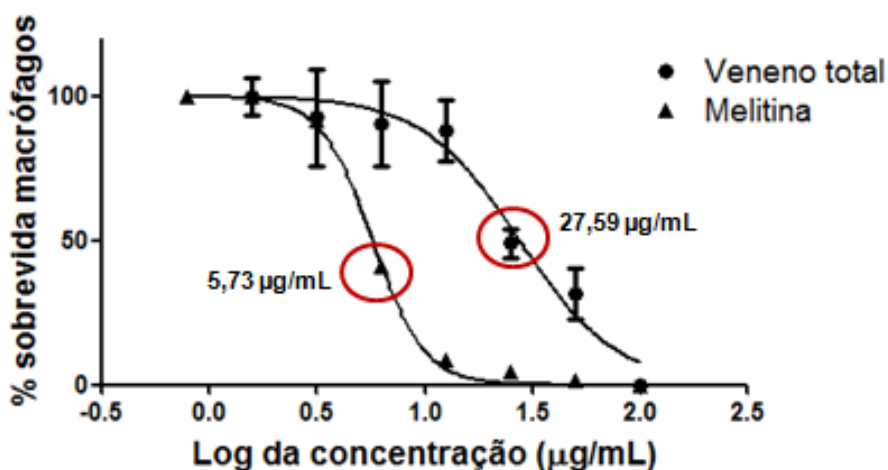


Figura 7. Efeito da melitina isolada e do veneno total de *Apis mellifera* sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

4.4 Efeito da melitina sobre a sensibilidade *in vitro* de formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*

Para avaliar a ação da melitina sobre a atividade anti- leishmania de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c contra a *Leishmania (L.) infantum chagasi*, inicialmente foi necessário a realização de ensaios para se definir a relação macrófagos/ amastigota, períodos de infecção, concentração de melitina em µg/mL, para uso na atividade anti- leishmania, tempo ideal para a ação anti- leishmania da melitina e as concentrações em µg/mL, respeitando os limites de citotoxicidade da melitina, segundo os resultados dos ensaios de MTT.

O tempo de infecção para amastigotas foi padronizado, por meio da realização previa da exposição dos macrófagos aos parasitas por 24 horas. As amastigotas foram internalizadas atingindo uma taxa média de infecção de 90% dos macrófagos. Esses foram expostos a concentrações a partir de 5 µg/mL de melitina, de acordo com o resultado obtido e descrito no item 4.3, esta concentração foi diluída de forma seriada. Observou-se que na presença da melitina, a morfologia celular foi alterada na concentração de 5 µg/mL e houve ruptura de macrófagos na concentrações de 5 e 2,5 µg/mL no período de 48 horas, tanto nas células infectadas quanto nas não infectadas. Os macrófagos infectados foram expostos a melitina por um período de 24 a 120 horas, respeitando os limites de citotoxicidade da melitina conforme definido anteriormente. Neste ensaio não observamos diferença significativa entre os períodos 72 a 120 horas.

Em macrófagos infectados, a melitina na concentração de 1,47 $\mu\text{g/mL}$ no período de 120 horas é capaz de reduzir significativamente a taxa de infecção, em comparação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 8).

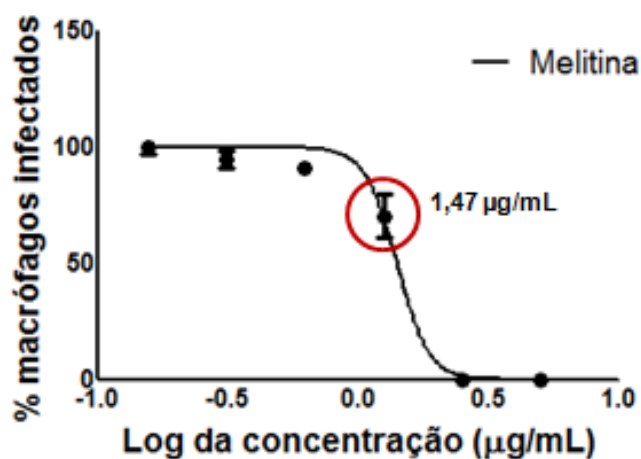
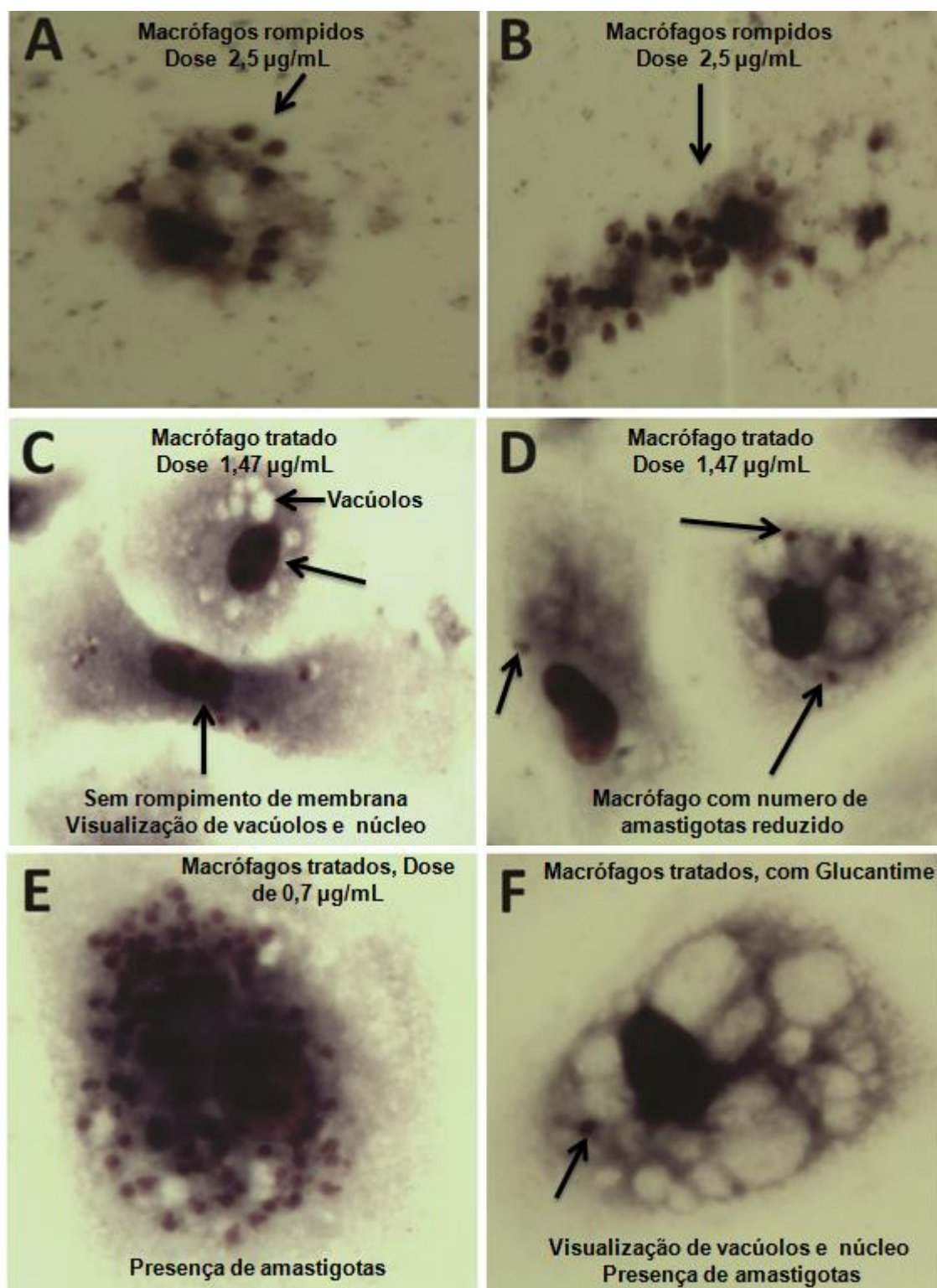
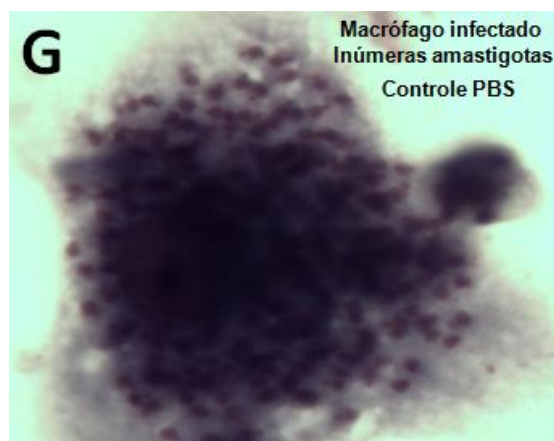


Figura 8. Efeito da melitina isolada e do veneno total de *Apis mellifera* sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com a forma amastigota de *L. (L.) infantum chagasi*.





Microscópio biológico trinocular Nikon E 200 (100x)

Figura 9. Efeito da melitina em diferentes concentrações sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com a forma amastigota de *L. (L.) infantum chagasi*. **A e B:** Tratamento com dose de 2,5 µg/mL (T1); **C e D:** Tratamento com dose de 1,47 µg/mL (T2); **E:** Tratamento com dose de 0,7 µg/mL (T3); **F:** Tratamento como glucantime; **G:** Controle PBS.

Observou-se claramente uma redução do número de amastigotas intracelulares, bem como a visualização de membrana dos macrófagos, vacuolização e núcleo definido, no tratamento com a dose de 1,47 µg/mL (Figura 9). Este efeito foi ligeiramente inferior ao observado em culturas tratadas com o glucantime quanto ao crescimento dos parasitas intracelulares.

Apresentando efeito significativo na concentração de 1,47 µg/mL, quando comparado com o controle negativo (PBS) células infectadas não tratadas, em que encontramos um percentual de infecção das células de 98%.

4.5 Efeito da melitina sobre a produção de citocinas inflamatórias (IL-12, IFN-γ e TNF-α)

Nas culturas de macrófagos desafiados com a forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi*, que se tornaram amastigotas intracelulares (infecção), observou-se menores níveis de IL-12, em relação às culturas de macrófagos sem tratamento (Figura 10 A).

Os resultados referentes à produção de IL-12 mostram que os macrófagos incubados somente com a melitina não foram capazes de produzir esta citocina. Os resultados relativos à produção de IL-12 podem ser analisados na figura 10 B.

As culturas de macrófagos desafiados com a forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi*, observou-se menores níveis de IL-12, em relação às culturas submetidas aos tratamentos com a melitina (Figura 11 C). Verificou-se uma tendência de aumento tanto com a dose de 1,47 $\mu\text{g/mL}$ (T2) no período de 72 horas quanto para a dose 0,7 $\mu\text{g/mL}$ (T3) nos três períodos de tempo avaliados em relação ao controle (Figura 10 C). Esta tendência não foi considerada significativa.

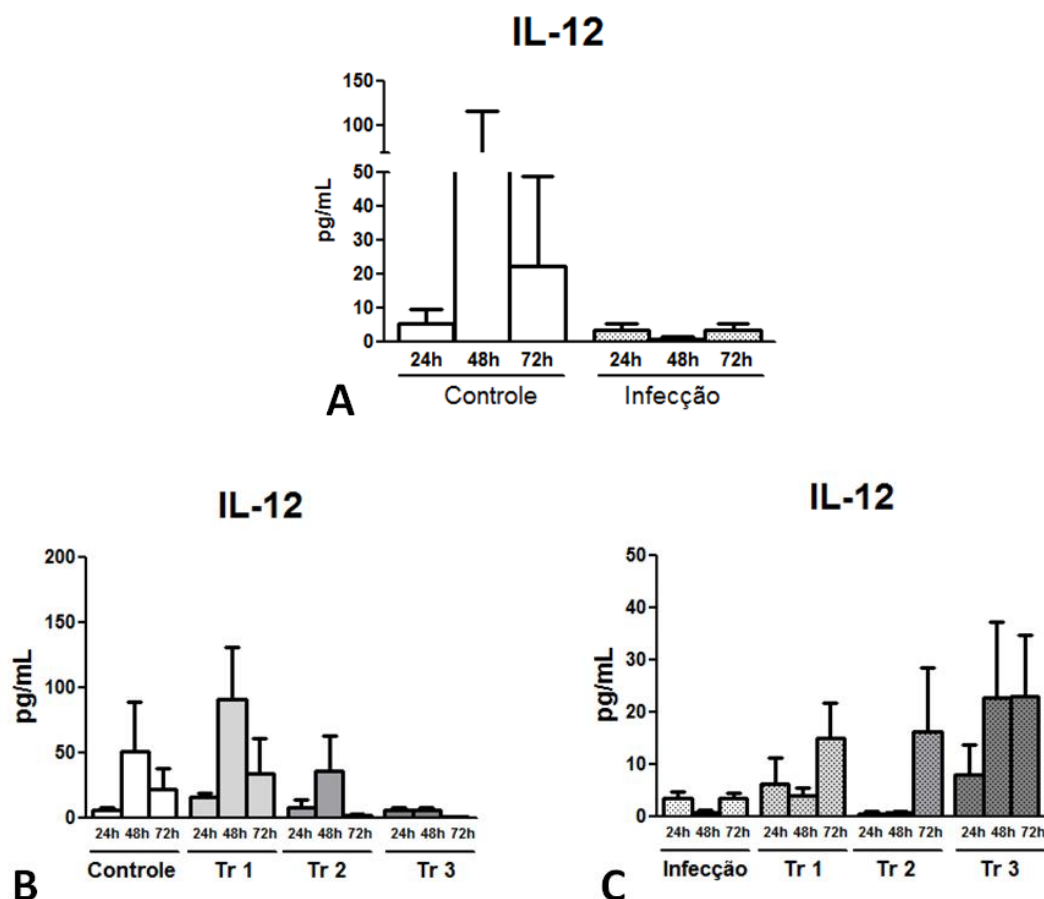


Figura 10. Produção de IL-12 em sobrenadante de cultura de macrófagos desafiados ou não com o parasita, tratadas e ou não com melitina. As médias referem-se a três experimentos independentes. **Figura A:** controles = Cultura de macrófagos sem tratamento; Infecção = culturas de macrófagos infectados com promastigotas sem tratamento com a melitina. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média. Onde: Tr = Tratamento; Tr₁ (2,5 $\mu\text{g/mL}$); Tr₂ (1,47 $\mu\text{g/mL}$); Tr₃ (0,7 $\mu\text{g/mL}$). Análise estatística: Teste de Tukey

Figura A - A controle (24, 48 e 72 hr) > A infecção (24, 48 e 72 hr) = $p < 0,05$

Figura B – B Tr₁ 48 hr > B Tr₃ 48 hr = $p < 0,05$

Nas culturas de células totais desafiadas com a forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi* (infecção), que se tornaram amastigotas intracelulares, observou-se maior nível de IFN- γ no período de 72 horas, em relação às culturas de células totais sem tratamento em todos os períodos (Figura 11 A).

Em relação à produção do IFN- γ os resultados mostram que nas culturas de células totais tratadas apenas com a melitina nas doses e nos períodos testados foi observado uma tendência de aumento na produção desta citocina no período de 48 horas, em relação às culturas não tratadas (Figura 11 B).

No entanto, não foi detectada produção significativa de IFN- γ nas culturas desafiadas com o parasita e tratadas com a melitina nas concentrações e nos respectivos períodos de tempo. Os resultados relativos à produção de IFN- γ podem ser analisados na figura 11 C.

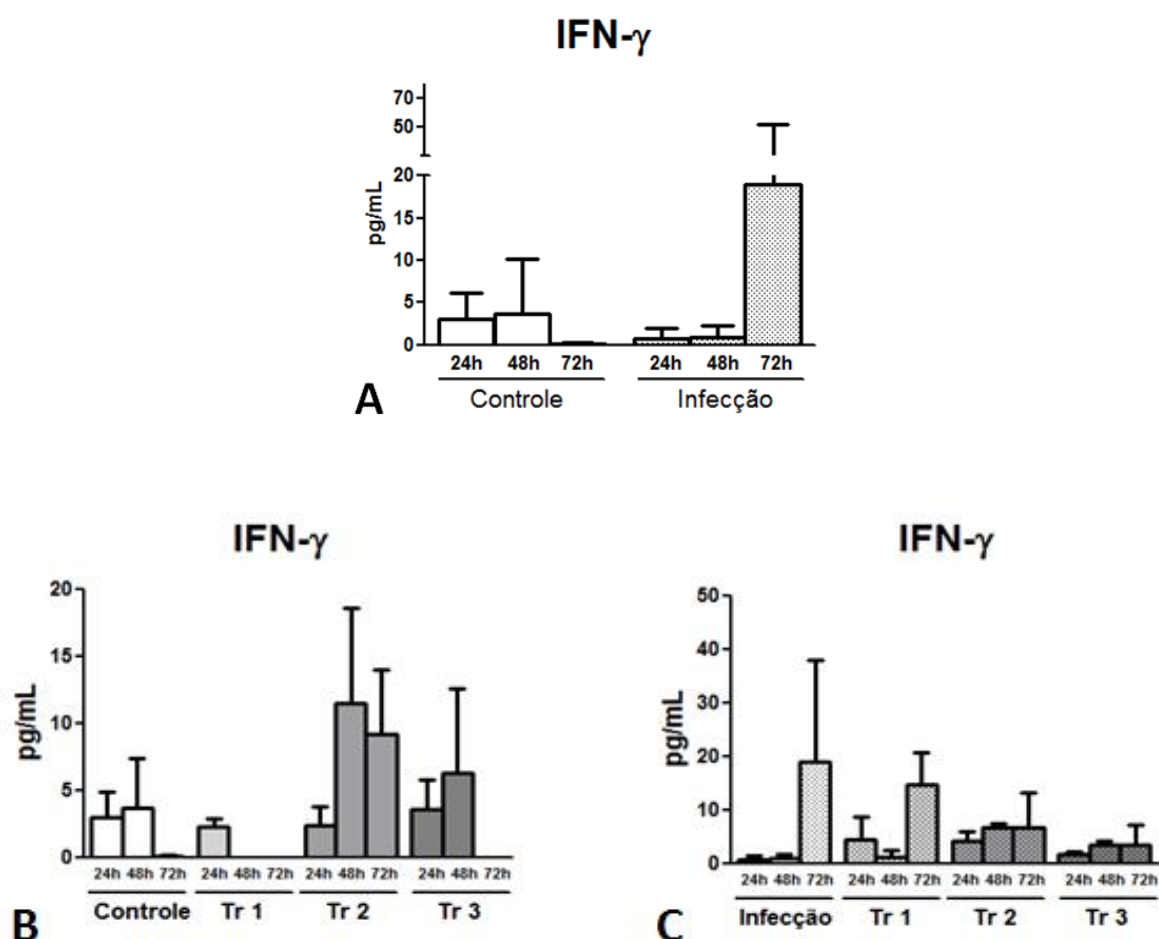


Figura 11. Produção de IFN- γ em sobrenadante de cultura de células totais desafiados ou não com o parasita, tratadas ou não com melitina. As médias referem-se a três experimentos independentes. **Figura A:** controles = Cultura de macrófagos sem tratamento; Infecção = culturas de macrófagos infectados com promastigotas sem tratamento com a melitina. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média. Onde: Tr = Tratamento; Tr₁ (2,5 μ g/mL); Tr₂ (1,47 μ g/mL); Tr₃ (0,7 μ g/mL). Análise estatística: Teste de Tukey

Figura A - A controle 72 hr < **A** infecção 72 hr = $p < 0,05$

As culturas de macrófagos sem tratamento em todos os períodos produziram maiores níveis de TNF- α , diferindo significativamente do período de 72 horas em relação à cultura de macrófagos desafiados com a forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi* (infecção) (Figura 12 A).

Em relação às culturas de macrófagos tratadas com a melitina, observou-se nível maior de TNF- α no período de 24 horas, em que estas células foram

submetidas ao tratamento na dose de 2,5 µg/mL, em relação às culturas não tratadas com a melitina (Figura 12 B).

No entanto, para as culturas de macrófagos desafiados com a forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi*, observou-se maiores níveis de TNF- α , em relação às culturas infectadas submetidas aos tratamentos com a melitina. Nos tratamentos com a melitina foi observado claramente uma diminuição significativa da produção desta citocina em relação ao controle sem tratamento nos respectivos períodos de tempo. Quando os macrófagos infectados foram incubados com a melitina nas concentrações de 1,47 µg/mL e 0,7 µg/, houve uma tendência de aumento na produção de TNF- α , quando comparada à detectada para as células sem o tratamento, porém não significativo. Os resultados relativos à produção de TNF- α podem ser analisados na figura 12 C.

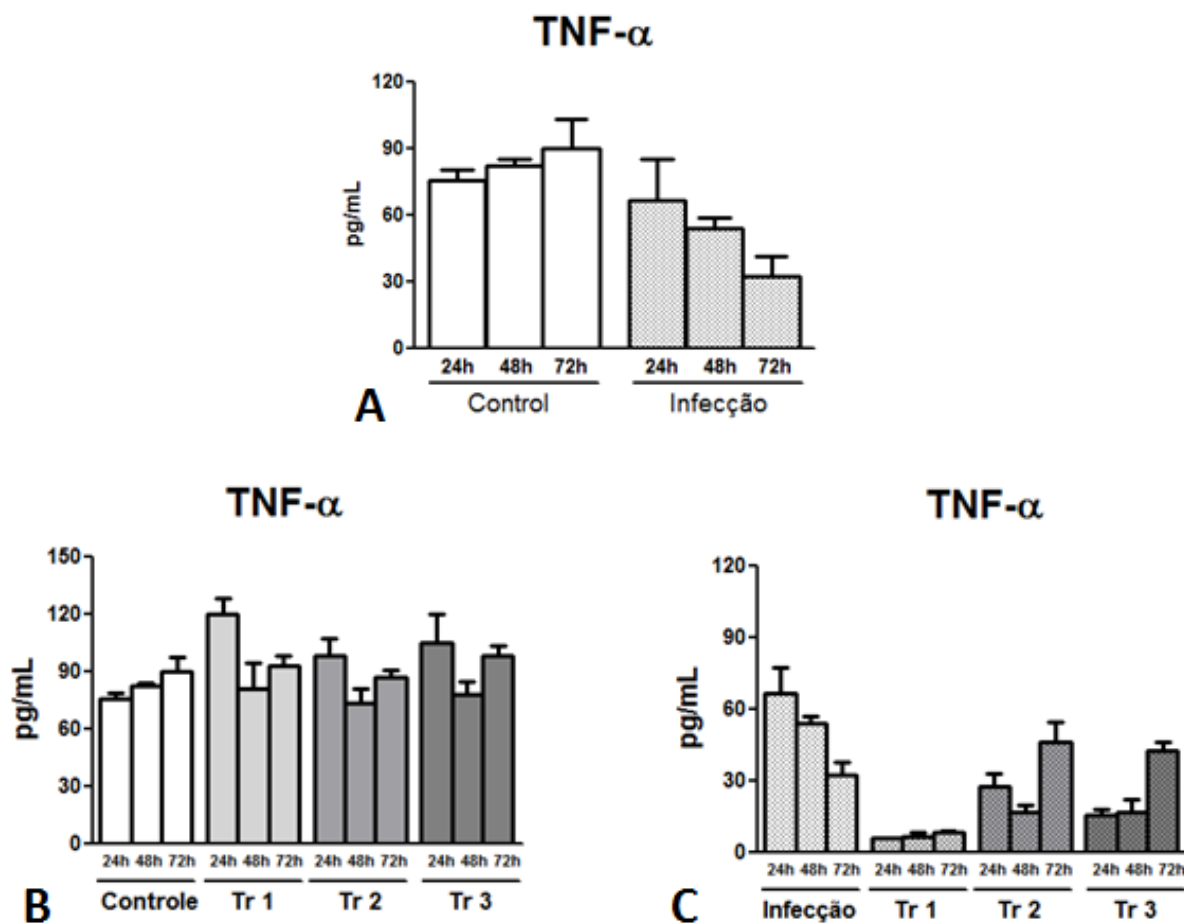


Figura 12. Produção de TNF- α em sobrenadante de cultura de células totais desafiados ou não com o parasita, tratadas ou não com melitina. As médias referem-se a três experimentos independentes. **Figura A:** controles = Cultura de macrófagos sem tratamento; Infecção = culturas de macrófagos infectados com promastigotas sem tratamento com a melitina. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média. Onde: Tr = Tratamento; Tr₁ (2,5 μ g/mL); Tr₂ (1,47 μ g/mL); Tr₃ (0,7 μ g/mL).

Análise estatística: Teste de Tukey

Figura A – A Controle (24, 48 e 72 hr) > **A** infecção 72 hr = $p < 0,05$

Figura B – B Controle (24, 48 e 72 hr) < **B** Tr₁ 24 hr = $p < 0,05$

Figura C – C Infecção (24, 48 e 72 hr) > **C** Tr₁ (24 hr, 48 e 72hr) = $p < 0,05$

Figura C – C Infecção 24hr > **C** Tr₂ 24 hr = $p < 0,05$

4.6 Efeito da melitina sobre a produção de citocinas antinflamatórias (IL-10 e TGF- β) por macrófagos

Nas culturas de macrófagos sem tratamento observou-se níveis substanciais de IL-10, não diferindo das culturas de macrófagos desafiados com a forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi* (infecção) (Figura 13 A).

Após o desafio com a melitina, os macrófagos liberaram níveis significativamente menores de IL-10 em todas as doses nos períodos de 48 e 72 horas. No entanto, observou-se aumento significativo nos níveis de IL-10 liberados por macrófagos em todos os tratamentos nos períodos de 24 horas, quando comparados aos liberados pelas culturas não tratadas, como observado na figura 13 B.

Quando as culturas de macrófagos foram desafiadas com a forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi* observou-se maiores níveis de IL-10, em relação às culturas submetidas aos tratamentos com a melitina, ressaltando-se claramente uma diminuição significativa da produção desta citocina em relação ao controle sem tratamento nos respectivos períodos de tempo. Os resultados relativos a esse ensaio são mostrados na figura 13 C.

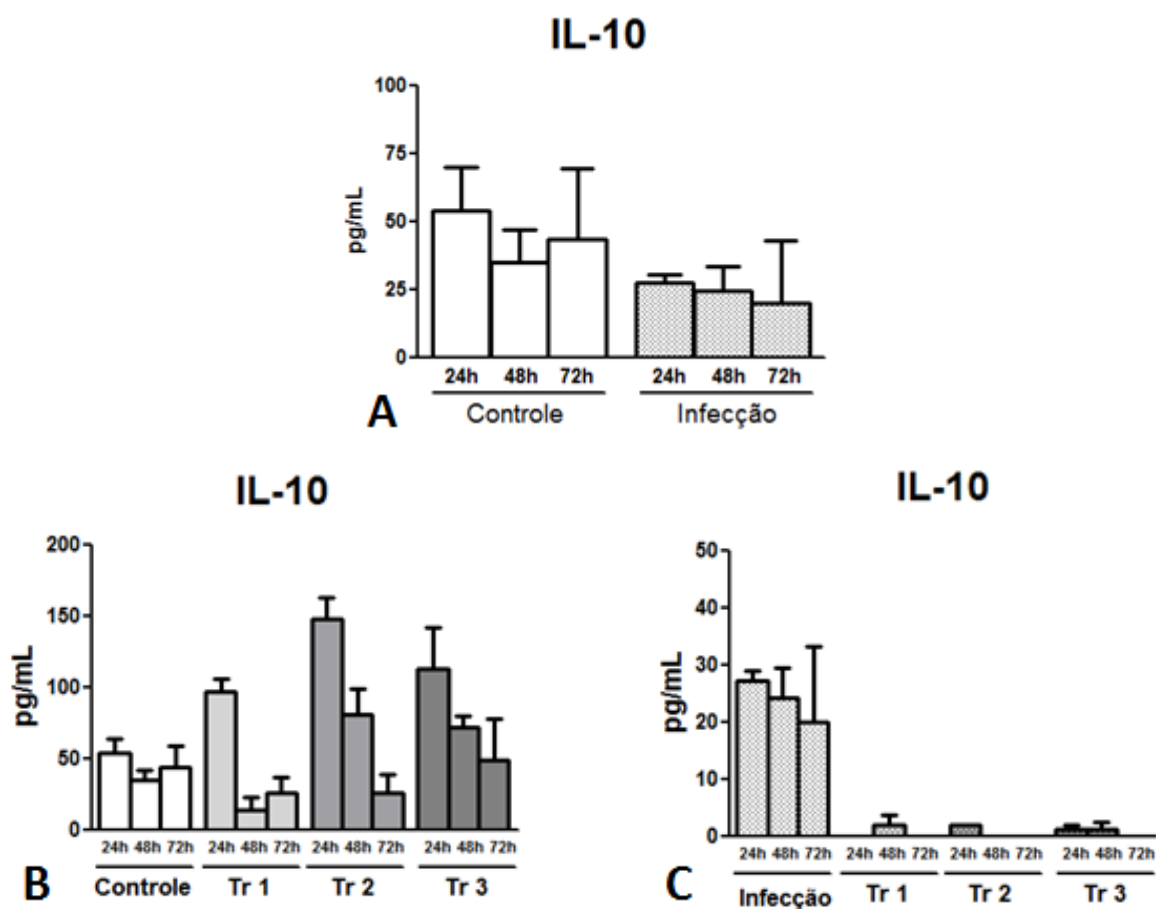


Figura 13. Produção de IL-10 em sobrenadante de cultura de células totais desafiados ou não com o parasita, tratadas ou não com melitina. As médias referem-se a três experimentos independentes. **Figura A:** controles = Cultura de macrófagos sem tratamento; Infecção = culturas de macrófagos infectados com promastigotas sem tratamento com a melitina. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média. Onde: Tr = Tratamento; Tr₁ (2,5 μ g/mL); Tr₂ (1,47 μ g/mL); Tr₃ (0,7 μ g/mL). Análise estatística: Teste de Tukey

Figura B – B Controle (48 e 72 hr) < **B Tr₁** 48 hr e 72hr = $p < 0,05$

Figura B – B Controle (24, 48 e 72 hr) < **B Tr₂** 24 hr = $p < 0,05$

Figura B – B Controle (24, 48 e 72 hr) < **B Tr₃** 24 hr = $p < 0,05$

Figura C – C Infecção (24, 48 e 72 hr) > **C Tr₁** (24 hr, 48 e 72hr) = $p < 0,05$

Figura C – C Infecção (24, 48 e 72 hr) > **C Tr₂** (24 hr, 48 e 72hr) = $p < 0,05$

Figura C – C Infecção (24, 48 e 72 hr) > **C Tr₃** (24 hr, 48 e 72hr) = $p < 0,05$

Os resultados referentes à produção de TGF- β mostram que, em todas as culturas de macrófagos desafiados ou não com o parasita, tratadas e não tratadas com melitina, a produção desta citocina foi semelhante, isto é, a melitina não interfere na produção desta citocina por macrófagos infectados ou não com o

parasita. Os resultados relativos à produção de TGF- β podem ser analisados na figura 14 A; B; C.

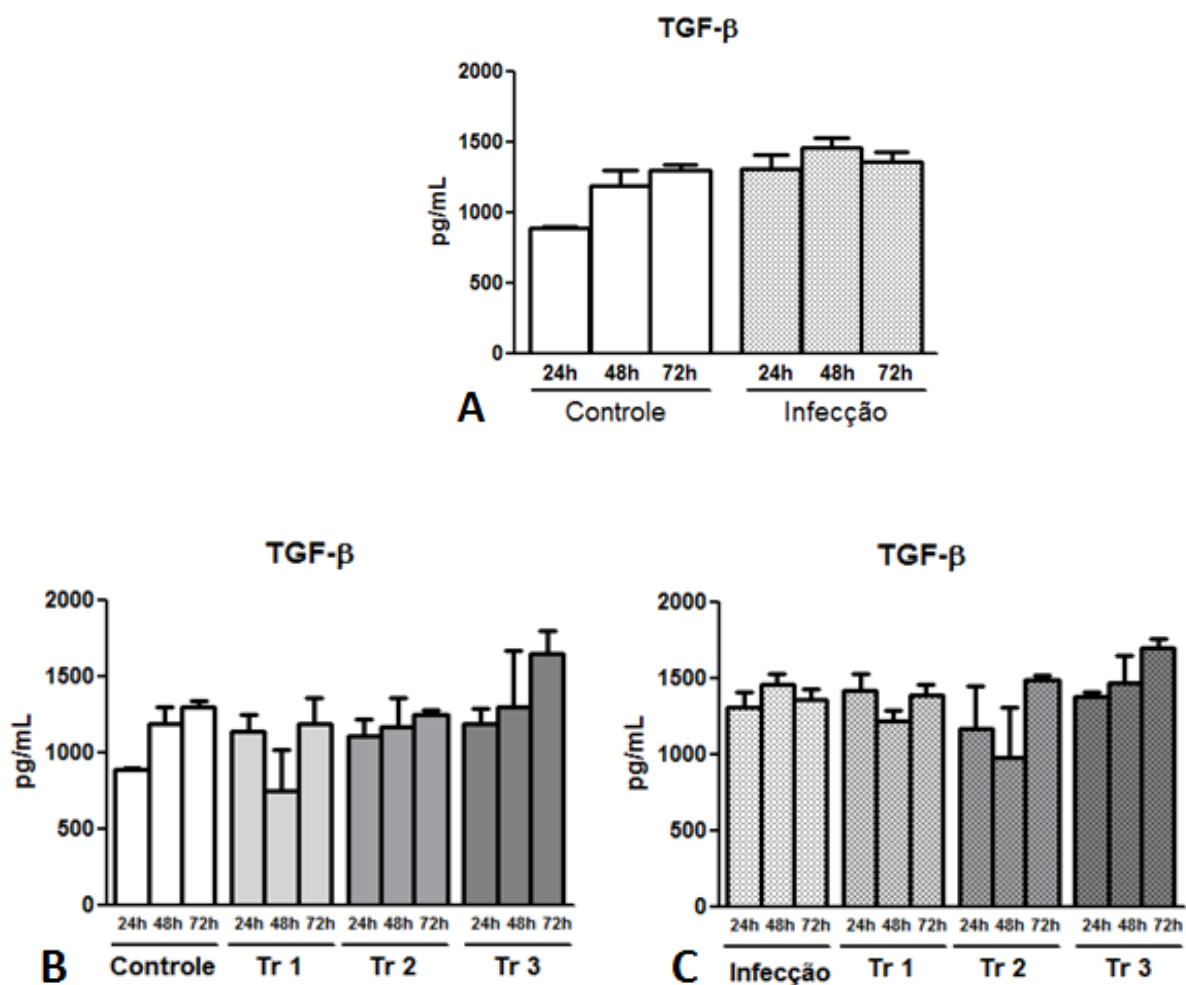


Figura 14. Produção de TGF- β em sobrenadante de cultura de macrófagos desafiados ou não com o parasita, tratadas ou não com melitina. As médias referem-se a três experimentos independentes. **Figura A:** controles = Cultura de macrófagos sem tratamento; Infecção = culturas de macrófagos infectados com promastigotas sem tratamento com a melitina. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média. Onde: Tr = Tratamento; Tr₁ (2,5 μ g/mL); Tr₂ (1,47 μ g/mL); Tr₃ (0,7 μ g/mL). Análise estatística: Teste de Tukey

4.7 Efeito da melitina sobre a produção de óxido nítrico pelos macrófagos

Nas culturas de macrófagos sem tratamento observou-se níveis menores de NO, diferindo das culturas de macrófagos desafiados com a forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi* (infecção) os quais produziram quantidades substanciais deste metabólito (Figura 15 A).

Após o tratamento com a melitina na dose de 1,47 µg/mL, os macrófagos liberaram níveis significativamente menores do metabólito, no período de 48 e 72 horas quando comparados aos liberados pelas culturas não tratadas nos mesmos períodos (Figura 15 B).

Em relação às culturas de macrófagos após o desafio com a forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi*, níveis significativamente maiores deste metabólito foi observado, em relação às culturas desafiadas e tratadas com a melitina em todas as doses e períodos analisados (Figura 15 C). No entanto, quando analisamos os resultados obtidos após o desafio, não detectamos diferenças importantes entre os tratamentos.

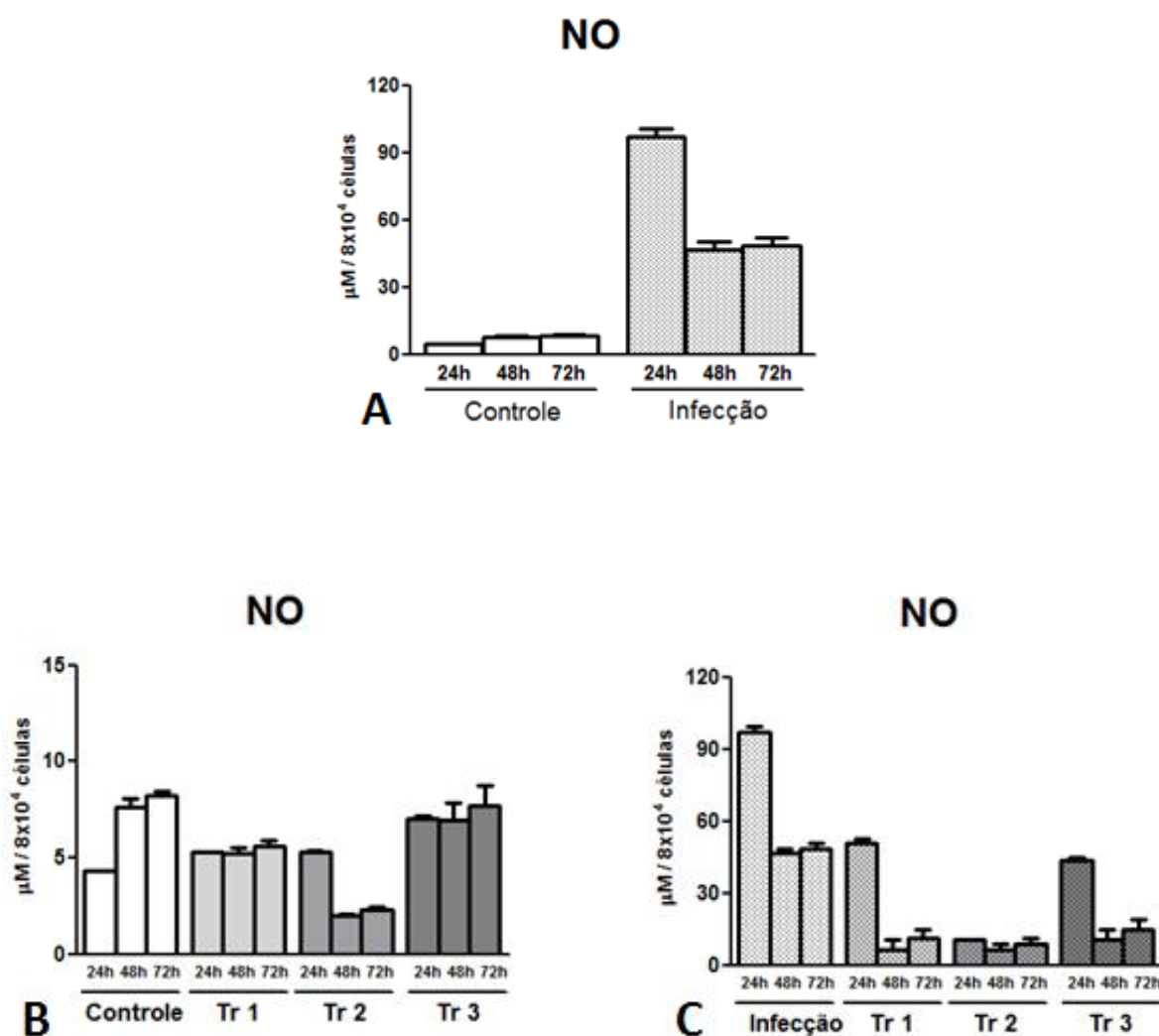


Figura 15. Produção de NO em sobrenadante de cultura de células totais desafiados ou não com o parasita, tratadas ou não com melitina. As médias referem-se a três experimentos independentes. **Figura A:** controles = Cultura de macrófagos sem tratamento; Infecção = culturas de macrófagos infectados com promastigotas sem tratamento com a melitina. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média. Onde: Tr = Tratamento; Tr₁ (2,5 µg/mL); Tr₂ (1,47 µg/mL); Tr₃ (0,7 µg/mL). Análise estatística: Teste de Tukey

Figura A – A Controle (24, 48 e 72 hr) < **A infecção** (24, 48 hr e 72hr) = $p < 0,05$

Figura B – B Controle (48 e 72 hr) > **B Tr₂** 48 e 72 hr = $p < 0,05$

Figura C – C Infecção (24, 48 e 72 hr) > **C Tr₁** (24 hr, 48 e 72hr) = $p < 0,05$

Figura C – C Infecção (24, 48 e 72 hr) > **C Tr₂** (24 hr, 48 e 72hr) = $p < 0,05$

Figura C – C Infecção (24, 48 e 72 hr) > **C Tr₃** (24 hr, 48 e 72hr) = $p < 0,05$

4.8 Efeito da melitina sobre a produção de água oxigenada (H₂O₂) por macrófagos

Os resultados referentes à dosagem de H₂O₂ mostram que, nas culturas de macrófagos sem tratamento níveis menores de H₂O₂ foram liberados, diferindo das culturas de macrófagos desafiados com a forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi* (infecção) os quais produziram quantidades substanciais deste metabólito (Figura 16 A). No entanto, a produção deste metabólito foi semelhante para as culturas de macrófagos tratadas com a melitina, em relação às culturas não tratadas nos respectivos períodos de tempo analisados em nossa pesquisa (Figura 16 B).

Após o desafio com a forma promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* os macrófagos sem tratamento liberaram níveis significativamente maiores desse metabólito, quando comparados aos liberados pelas culturas tratadas com a melitina ($P < 0,05$) (Figura 16 C). Assim, nenhum dos tratamentos empregados foi capaz de promover a produção desse metabólito.

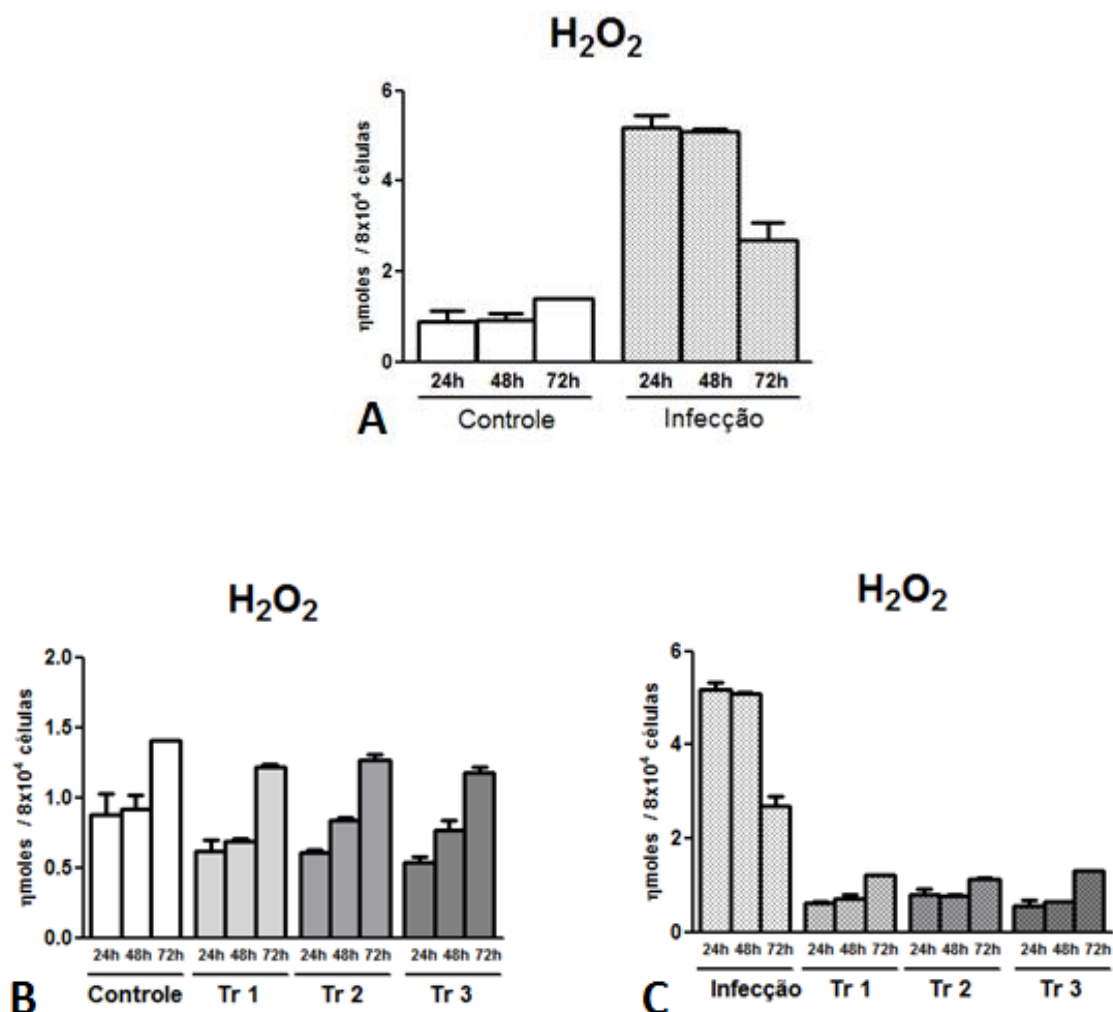


Figura 16. Produção de H₂O₂ em sobrenadante de cultura de células totais desafiados ou não com o parasita, tratadas ou não com melitina. As médias referem-se a três experimentos independentes. **Figura A:** controles = Cultura de macrófagos sem tratamento; Infecção = culturas de macrófagos infectados com promastigotas sem tratamento com a melitina. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média. Onde: Tr = Tratamento; Tr₁ (2,5 μ g/mL); Tr₂ (1,47 μ g/mL); Tr₃ (0,7 μ g/mL). Análise estatística: Teste de Tukey

Figura A – A Controle (24, 48 e 72 hr) < **A** infecção (24, 48 hr e 72hr) = $p < 0,05$

Figura C – C Infecção (24, 48 e 72 hr) > **C** Tr₁ (24 hr, 48 e 72hr) = $p < 0,05$

Figura C – C Infecção (24, 48 e 72 hr) > **C** Tr₂ (24 hr, 48 e 72hr) = $p < 0,05$

Figura C – C Infecção (24, 48 e 72 hr) > **C** Tr₃ (24 hr, 48 e 72hr) = $p < 0,05$

5 DISCUSSÃO

A melitina é o principal componente tóxico do veneno de *Apis melífera*. Trata-se de um peptídeo de cadeia longa, contendo 26 resíduos de aminoácidos, apresentando atividade hemolítica e um amplo espectro antimicrobiano, possivelmente devido a sua capacidade de romper membranas celulares^{40-42, 45, 47}.

Neste estudo avaliou-se o efeito da melitina natural sobre a atividade anti-leishmania, produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e metabólitos do oxigênio e do nitrogênio na infecção experimental por *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

Avaliou-se a atividade anti-leishmania da melitina por meio de ensaios de viabilidade celular, utilizando-se uma dose que não fosse tóxica para o macrófago e que reduzisse ou eliminasse o parasita no interior da célula.

Klocek e Seelig,⁸⁴ relataram que a melitina foi capaz de se ligar rapidamente às membranas celulares em concentração sub-micromolar induzindo por osmose a perda de cátions e ganho de ânions. Este processo provoca um edema celular e com consequente lise devido a ação citotóxica da molécula. Segundo estes autores, a concentração efetiva (CE₅₀) da melitina, determinada por ensaio de viabilidade celular, frente a células de ovário de hamsters (CHO) e células com deficiência de glicosaminoglicanos (CHO-745) foram de 9 e 15 µg/mL respectivamente. Da mesma forma Maher e McClean,⁸⁵ investigaram a citotoxicidade da melitina em células epiteliais do intestino HT29 e Caco-2 encontrando uma CE₅₀ de 3,6 µg/mL e 5,4 µg/mL respectivamente. Apesar de não evidenciarmos estudos quanto a atividade da melitina nativa em macrófagos, os nossos resultados corroboram os trabalhos descritos anteriormente. Em nossa pesquisa a melitina apresentou valor de CE₅₀ de 5,73µg/mL o que diferiu estatisticamente do observado nos resultados com o veneno total que apresentou valor de CE₅₀ 27,59µg/mL. Estes resultados permitem considerar que a melitina isolada é mais citotóxica que o veneno total.

A interação da melitina com as membranas lipídicas vem sendo investigada extensivamente, tanto na teoria quanto na prática⁵⁰⁻⁵⁷. No entanto, vários estudos mostram que esta interação com as membranas celulares ocorre por meio de interações hidrofóbicas e depende diretamente das propriedades do peptídeo, da solução em que está diluída, de sua concentração, da composição lipídica, do nível de hidratação e do potencial da membrana⁵⁷. Ensaios de acetilação, alquilação e

oxidação de resíduos de aminoácidos que compõe a melitina foram realizados, na tentativa de encapsula-la em lipossomos, sem causar lise⁸⁶⁻⁸⁸. No entanto observaram degradação da membrana, assim como, vazamento em 50% das vesículas lipossomais. Porém, outro fato importante observado foi 100% de inibição da atividade hemolítica após esta modificação no veneno, assim como redução potencial no mecanismo de ação da melitina^{50-56; 86-88}.

Esta interação da melitina com membranas vem sendo descritas a várias décadas, como efeito de ancoragem do péptido sobre a superfície da membrana^{43, 89}. Estudos sobre o mecanismo de ação da melitina em superfícies de membranas biológicas, demonstraram que em baixas concentrações esta forma poros nas membranas, e que o aumento de sua concentração promove a destruição das membranas em micelas mistas⁴³. Mecanismo este, responsável pela atividade hemolítica, anti-tumoral e microbida da melitina.

A melitina tem mostrado forte atividade inibitória contra parasitas como *Leishmanias* e *Tripanosoma cruzi*⁹⁰⁻⁹⁵. Como em estudos realizados por Diaz-Achirica,⁹¹ onde foi avaliada a atividade leishmanicida da melitina contra *Leishmania donovani*, verificou-se que esta foi toxica para o parasita principalmente nas concentrações que variaram entre 6 e 15 µg/mL. Apesar das concentrações serem consideradas baixas pelo autor, foram observados danos e bolhas na membrana plasmática do parasita. Estes resultados não são condizentes com os dados obtidos em nossa pesquisa, na qual evidenciamos a morte do parasita em uma CE₅₀ de 28,29 µg/mL. O mesmo autor não encontrou resultado significativo com a forma amastigota. Porém, quando avaliou a melitina sintética contra o parasita intracelular, observou que a atividade desse peptídeo foi 15 vezes maior que o peptídeo natural, apresentando CE₅₀ de 0,9 µg/mL, evidenciando lise nas células infectadas. Em contrapartida a CE₅₀ para o peptídeo nativo em nosso estudo foi de 1,47 µg/mL, nesta dose o parasita intracelular foi eliminado, e foi observado que esta não interferiu na viabilidade dos macrófagos.

No entanto, em nossa pesquisa utilizamos a molécula em sua forma natural. A forma sintética possui suas cadeias de aminoácidos alteradas ou mesmo retiradas, descaracterizando assim a molécula, fazendo com que em muitas situações esta perca suas funções, como vimos nos trabalhos citados.

Pérez-Cordero,⁹⁴ avaliaram a atividade anti-leishmania da melitina contra as espécies *Leishmania panamensis* e *Leishmania major*. Estes autores utilizaram a melitina sintética, que possui 24 aminoácidos e uma forma híbrida da mesma denominada cecropina A. Observaram que ambas foram citotóxicas apresentando CE₅₀ de 74,01 µg/mL e CE₅₀ de 100 µg/mL respectivamente. Salienta-se que ambas não apresentaram atividade contra a forma intracelular de *Leishmania major*. Os referidos autores observaram que, dependendo do local da cadeia do peptídeo em que foi realizada a acilação do resíduo de lisina, este provocou reações que variaram desde a potencialização da atividade, bem como inativação do seu mecanismo de ação. Este fato também foi reportado para outros microorganismos⁹⁵⁻⁹⁷.

É interessante ressaltar que, nas células eucariotas há predominância de lipídeos neutros (colesterol), que influencia diretamente na atividade da melitina. Este peptídeo possui em sua cadeia um resíduo de aminoácido triptofano que forma um complexo estável com o colesterol. Este promove uma interação eletrostática com a membrana, favorecendo a inserção do peptídeo e causando lise e morte do parasita. Tendo como resultado a formação de poros, com consequente perda de eletrólitos, e por fim a completa dissolução da membrana com extravasamento do conteúdo intracelular^{60, 67, 98, 99}. Neste sentido, a melitina pode destruir o parasita por mecanismos diretos sobre a forma promastigota, ou mesmo estar associada ao efeito imunomodulador capaz de induzir a ativação de fagócitos com capacidade de atuar diretamente sobre a forma amastigota, inibindo ou restringindo o processo de reinfeção destas em novas células, após lise.

O efeito de venenos animais sobre o sistema imune tem sido amplamente investigado. Estes tem capacidade de modular a resposta imune inata e adaptativa^{35,100,101}. Neste trabalho objetivamos investigar se a melitina apresenta papel imunomodulador, atuando sobre macrófagos quanto à produção de citocinas e metabólitos do oxigênio e do nitrogênio.

Nossos resultados mostraram que a melitina promoveu aumento significativo na produção de IL-12 pelos macrófagos não parasitados na dose de 2,5 µg/mL, ressaltando que nesta dose observamos lise. Após o tratamento com a melitina em macrófagos infectados com a leishmania verificamos uma tendência de aumento da produção de IL-12. Esta citocina desempenha papel importante nesta infecção,

por estar envolvida na ativação de células natural killer e linfócitos T. Ambos processos são fundamentais na produção de IFN- γ e consequentemente na regulação da resposta imunológica^{102,103}.

De acordo com Puentes e colaboradores,¹⁰⁴ durante a fagocitose as leishmanias se aderem aos macrófagos por meio do receptor CR3 do sistema complemento. Estas induzem a supressão da síntese da IL-12, além de inibir o estresse oxidativo no interior da célula fagocítica. Esta diminuição dos níveis de IL-12 em culturas de macrófagos desafiados com a forma promastigota de *L. (L.) infantum chagasi* foi observada em nossa pesquisa, corroborando com as observações de Puentes e colaboradores¹⁰⁴. Em contrapartida, houve uma tendência de aumento na produção de IL-12 nas culturas de macrófagos infectados submetidas aos tratamentos com a melitina nas doses de 1,47 $\mu\text{g/mL}$ e 0,7 $\mu\text{g/mL}$. Esta tendência de aumento na produção da IL-12, quando as culturas de macrófagos infectadas com o parasita foram tratadas com a melitina, possivelmente está envolvida na destruição do parasita intracelular.

Nas leishmanioses o IFN- γ desempenha um papel essencial no controle do crescimento do parasita e na progressão da doença. Entretanto, em nossos resultados, observamos também que a melitina promoveu uma tendência de aumento na produção de IFN- γ na dose de 1,47 $\mu\text{g/mL}$ período de 48 horas, em culturas de células totais não parasitadas. Porém, não detectamos produção significativa de IFN- γ nas culturas desafiadas com o parasita e tratadas com a melitina nas concentrações usadas neste projeto e nos respectivos períodos de tempo.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que desempenha papel chave na resposta imune, tanto na defesa contra microrganismos, quanto no processo inflamatório. É uma das citocinas envolvidas na ativação de macrófagos na leishmaniose o qual, juntamente com IFN- γ , contribui com a atividade antimicrobiana das células¹⁰⁵.

No presente estudo não foram detectadas diferenças significativas na produção do TNF- α em culturas de macrófagos tratadas ou não com melitina. Porém, em culturas de macrófagos infectadas com o parasita e tratados com a melitina, observou-se uma diminuição significativa da produção desta citocina em relação ao controle sem tratamento, nos respectivos períodos de tempo.

Nossos resultados mostraram que ocorreu redução do número de parasitas com dose não tóxica da melitina, além de modular a produção de citocinas inflamatórias.

O possível mecanismo imunomodulador da melitina ocorre por meio da presença de cálcio intracelular, produzido durante o processo de fagocitose. Este peptídeo age em sinergismo com o cálcio e neutraliza a ativação da enzima fosfodiesterase. Esta última promove a elevação do AMP-cíclico, e consequentemente a inibição da resposta imune mediada por células, por reduzir a produção de citocinas inflamatórias como IL-12, TNF- α e IFN- γ ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Processo este observado em nossa pesquisa apenas para TNF- α e IFN- γ , em culturas infectadas com o parasita e tratadas com a melitina.

Neste contexto, é importante ressaltar que durante o processo de fagocitose ocorre um aumento do cálcio intracelular, fato que facilita a replicação do parasita no interior das células⁷¹. Porém, associado à presença da melitina, promove a inativação da enzima fosfodiesterase e, consequentemente, a elevação do AMP-cíclico, diminuindo a produção destas citocinas. No entanto, mesmo com a diminuição destas citocinas importantes para o processo de eliminação do parasita via célula, observou-se uma redução da carga parasitária, sem aparentes danos às estruturas celulares. O que corrobora com Brito,¹⁰⁹ que realizou estudos *in vitro* e *in vivo* com Leishmaniose cutânea utilizando a pentoxifilina que é uma metilxantina, fármaco com ação inibidora da enzima fosfodiesterase, mecanismo semelhante ao observado com a melitina, em que verificou aumentou na taxa de cura da doença, associando este fato à inibição na produção de TNF- α . De acordo com alguns autores, a melitina adicionada a culturas celulares promove a supressão de citocinas pró-inflamatórias tais como: IL-1, IL-6 e TNF- α ^{110,111}. Desta forma, podemos sugerir que também pode ter ocorrido uma ação direta da melitina contra o parasita intracelular, assim como a participação de outras citocinas no processo de destruição do parasita.

Nossos achados demonstraram uma ação moduladora da melitina, por regular a secreção das citocinas pró e anti-inflamatórias que estão relacionadas com a exacerbação e ou controle da doença.

A IL-10 desempenha importante papel na infecção causada pelas leishmanioses¹¹². Considerada como supressora da resposta imune, a IL-10 inibe

muitas funções das células NK e T por impedir a apresentação de antígenos e produzir citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-12 e IFN- γ ¹¹².

Nossos resultados mostraram que ocorreu um aumento na produção de IL-10 em culturas de macrófagos não parasitados tratados com a melitina na dose de 1,47 $\mu\text{g/mL}$ no período de 24 horas. No entanto, observamos aumento na produção de IL-10 em culturas de macrófagos desafiadas com o parasita e não tratadas com a melitina em que, estes resultados corroboram as observações de Lapara & Kelly¹¹³, que verificaram aumento na produção de IL-10 em macrófagos infectados por *Leishmania*.

Tendo em vista que a IL-10 é capaz de inibir a morte do parasito mediada por IFN- γ ,^{22,114} da mesma forma favorecer o crescimento do parasito no interior dos fagolisossomos, por meio da produção de poliaminas geradas pelo parasita¹¹⁵⁻¹¹⁷.

No entanto, de forma semelhante ao que ocorreu com o TNF- α , as culturas de macrófagos infectados com o parasita sem tratamento apresentaram maiores níveis de IL-10, em relação culturas infectadas submetidas aos tratamentos com a melitina.

Para compreendermos o possível mecanismo de ação da melitina em relação à supressão da produção de IL-10, é necessário conhecermos a composição química da membrana do parasita. Esta membrana contém aproximadamente 60% de proteínas globulares e 40% de lipídeos, que associados a glicídios constitui as glicoproteínas e glicolipídios, conferindo carga negativa a membrana do parasita^{44,58}.

A melitina apresenta em sua cadeia de aminoácidos os componentes triptofano e tirosina, que são essenciais no processo de interação da melitina com a membrana do parasita, o qual atua formando um complexo (melitina/membrana)^{60,67}. O triptofano apresenta uma maior afinidade para membranas carregadas negativamente, e ricas em colesterol, fato que influencia ainda mais a atividade da melitina diretamente sobre estas células^{60,67}.

Atualmente sabe-se que a produção de IL-10 por macrófagos infectados com *Leishmania* pode estar associada à ativação de receptores, dentre eles o Fc γ que são glicoproteínas de membrana celular, fato este que confere carga negativa na membrana de macrófagos durante a fagocitose¹¹⁸. Considerando o processo de interação da melitina com membranas, observamos em nosso modelo que, após a

adição da melitina em culturas de macrófagos infectados com o parasita, ocorreu uma supressão da produção de IL-10.

Além disso, nosso estudo avaliou o efeito da melitina na produção de metabólitos do oxigênio (H_2O_2) e de nitrogênio (NO). Considerada molécula instável, o NO tem a propriedade de facilitar sua difusão através das membranas celulares sem o auxílio de transportadores específicos¹¹⁴. Desempenha papel fundamental nos processos de sinalização e infecção por leishmaniose, atuando como um agente tóxico para estes organismos¹¹⁹⁻¹²¹.

Nossos resultados mostram que ocorreu produção do NO e H_2O_2 em culturas de macrófagos não parasitados tratados com melitina. Porém, após o desafio com a forma promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e tratamento com a melitina, os macrófagos liberaram níveis significativamente menores destes metabólitos, quando comparados aos liberados pelas culturas infectadas e não tratadas com a melitina. Estas observações estão de acordo com Kwon,⁴⁹ e Moon e colaboradores,¹¹⁰ que afirmam que a melitina inibe a produção de óxido nítrico em alguns tipos celulares. Para um melhor entendimento do efeito inibidor exercido pela melitina sobre a diminuição da produção de NO, estes autores verificaram que esta molécula promove a inibição das proteínas quinases JNK (cinase da região N-terminal de c-jun) e Akt. Estas proteínas possuem ações que convergem para ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) que regula a expressão de genes envolvidos na resposta imune, estimulando a expressão de citocinas inflamatórias, e reativos intermediários do oxigênio¹²².

No entanto, existe uma dificuldade no tratamento das doenças causadas por tripanossomatídeos, devido peculiaridades que estes têm de alternância de formas nos vetores e em seus hospedeiros, havendo diferenciações na morfologia, bioquímica e nos mecanismos de escape^{123,124}. O principal mecanismo de escape do parasita frente ao estresse oxidativo produzido pela presença de metabólitos do oxigênio e do nitrogênio é por meio da enzima tripanotiona redutase. Esta foi descoberta por Fairlamb,¹²⁵ e tem por função manter a tripanotiona em sua forma reduzida, exercendo assim um papel central na proteção das *Leishmania spp.* contra espécies reativas produzidas pelos macrófagos¹²⁶⁻¹³⁰. Mecanismo que possivelmente explica a inibição do NO e H_2O_2 em nossa pesquisa. Entretanto,

outros mecanismos podem estar envolvidos, sendo responsáveis pela destruição do parasita intracelular.

A produção destes metabolitos foi mantida no grupo controle sem tratamento, porém não afetou a viabilidade das células, assim como não causou efeito tóxico contra a forma amastigota. Este dados estão de acordo com os de Romão e colaboradores,¹³⁰ que afirmam que isso pode ter ocorrido devido ao mecanismo de escape do parasita. Desta forma, a melitina pode favorecer a produção da enzima tripanotona redutase, mantendo reduzido o nível de NO e H₂O₂ e contribuindo para o mecanismo de escape do parasita.

No entanto, a diminuição da produção de NO e H₂O₂, também pode ter ocorrido devido a outro mecanismo de escape desenvolvido pelo parasita, no qual este modula a resposta das células hospedeiras através da ativação da arginase^{127,128}. A ativação da arginase leva a depleção de L-arginina, aminoácido importante na produção de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintetase em células hospedeiras. Além de aumentar produção de poliaminas essenciais ao crescimento e diferenciação do parasita intracelular^{131,132}.

Santos e colaboradores,¹³³ afirmam que em macrófagos murinos o óxido nítrico desempenha papel importante como um agente leishmanicida. No entanto, cepas resistentes de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania (L.) infantum chagasi*, isoladas de humanos e de cães, foram tratadas com doadores de óxido nítrico como nitrito de sódio (NaNO₂) e S-nitroso N-acetil penicilamina (SNAP). Estes autores demonstraram que esta resistência ao NO está associada com uma maior capacidade de sobrevivência do parasita. Também observaram uma maior carga parasitária em macrófagos murinos, independente da ativação com os doadores de NO e após ativação por IFN-γ e LPS em reinfecção¹³³. Apesar do potente mecanismo leishmanicida exercido pelos macrófagos por meio da liberação de metabólitos tóxicos, a *Leishmania* pode infectar e se multiplicar nestas células¹³⁴.

Estudos recentes identificaram alvos potenciais em tripanossomatídeos, que incluem enzimas importantes em diversas vias metabólicas como a via glicolítica, síntese de DNA, metabolismo de esteróis, entre outras^{135,136}.

Neste contexto, existe uma busca constante no que se refere à elaboração de um fármaco eficiente que determine a morte do parasita por meio de inibição de uma destas vias. Para isso deve-se levar em consideração as diferenças de

metabolismo entre o parasita e o hospedeiro. Tendo em vista as especificidades de ação do fármaco, no qual atuem sobre estas vias de alto nível de controle metabólico no parasita e baixo nível de controle metabólico no hospedeiro^{123,133}.

Em nossa pesquisa observamos que a melitina inibiu a produção de NO, assim como o H₂O₂ em macrófagos infectados. Assim, nossos resultados sugerem que a melitina não induziu a morte do parasita por essas vias. Além disso, podemos sugerir que a atividade anti-leishmania da melitina sobre macrófagos desafiados com o parasita pode envolver outros mecanismos, tais como: mecanismos enzimáticos por meio de ativação e ou inibição de enzimas; interações eletrostáticas com as membranas, onde por meio de uma ação direta proporciona bloqueio de canais iônicos acarretando danos em mitocôndria e consequentemente em DNA; bloqueio da liberação do ácido aracdônico; diminuição de proteínas apoptóticas como BCL-2 e aumento de proteínas pró-apoptóticas Bax e caspase 3; formação de poros em membranas e consequente apoptose¹³⁷⁻¹⁴¹.

No entanto, há uma procura por substâncias, que atuem inibindo a via do óxido nítrico, assim como outras vias capazes de potencializar outras terapias².

Estas terapias devem apresentar menos efeitos tóxicos para o hospedeiro, e também evidenciar a existência de um mecanismo *cross-talk*, ou seja, a habilidade de componentes de uma determinada via de transdução influenciar componentes de outra via, por meio de ações em alvos comuns ou ações em alvos separados^{2, 142}.

Porém, a intersecção destas vias produz ações idênticas ao final do processo em um único efector, envolvendo a óxido nítrico sintase (NOS) para que o parasita se proteja do ambiente inóspito do macrófago^{2,142,143}. Neste contexto, combinações terapêuticas entre substâncias que atuem inibindo vias vitais para o parasita vêm sendo estudadas experimentalmente, visando uso clínico principalmente para doenças virais, bacterianas como também parasitárias¹⁴⁴. Estas combinações, buscam aumentar o índice terapêutico, de forma a possibilitar uma intensa redução dos efeitos adversos para o hospedeiro por meio de uma liberação sustentada e direcionada à célula parasitada¹⁴⁴⁻¹⁴⁷.

Em nosso estudo evidenciamos a ação anti-leishmania *in vitro* da melitina, contra formas extracelulares e intracelulares do parasita. Ademais, outro aspecto importante observado, foi à atividade moduladora desta molécula sobre a produção

de citocinas, bem como na produção de NO e H₂O₂. Assim, podemos considerar que, em nosso estudo a melitina pode ter atuado de forma direta contra o parasita intracelular e/ou por meio da modulação da resposta imune levando a ativação de macrófagos, em que estes produziram outras substâncias que não NO e H₂O₂, proporcionando uma redução da carga parasitária dentro do macrófago, sem causar danos à célula. Outro aspecto importante foi a inibição da produção de TNF- α e IFN- γ assim como do NO e H₂O₂, que pode também ter ocorrido via inibição da enzima fosfodiesterase e/ou possível ativação da enzima tripanotona redutase.

Estes mecanismos de ação apresentados pela melitina em nossa pesquisa mostram a viabilidade desta molécula para estudos futuros, visando o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas contra infecções parasitárias.

Considerando os resultados obtidos e a importância epidemiológica da leishmaniose visceral, sugerimos uma investigação do perfil de expressão proteica de isolados de *L. (L.) infantum chagasi* antes e após tratamento com a melitina. A expressão de novas proteínas poderá evidenciar novas alternativas à pesquisa da ação da melitina.

Por outro lado, desafios químicos se impõem, haja vista que a melitina necessita de modificações estruturais na tentativa de se obter uma molécula menos tóxica, com menos atividade lítica, sem perder sua atividade antiparasitária.

Estudos voltados para o triptofano e tirosinas, aminoácidos que formam complexos estáveis com o colesterol, poderiam minimizar o efeito lítico da melitina sobre membranas celulares. Estas modificações químicas associadas com formulações lipossomais, evitaria o contato direto da melitina com o organismo, aumentando o seu potencial como molécula candidata para o emprego futuro em seres humanos.

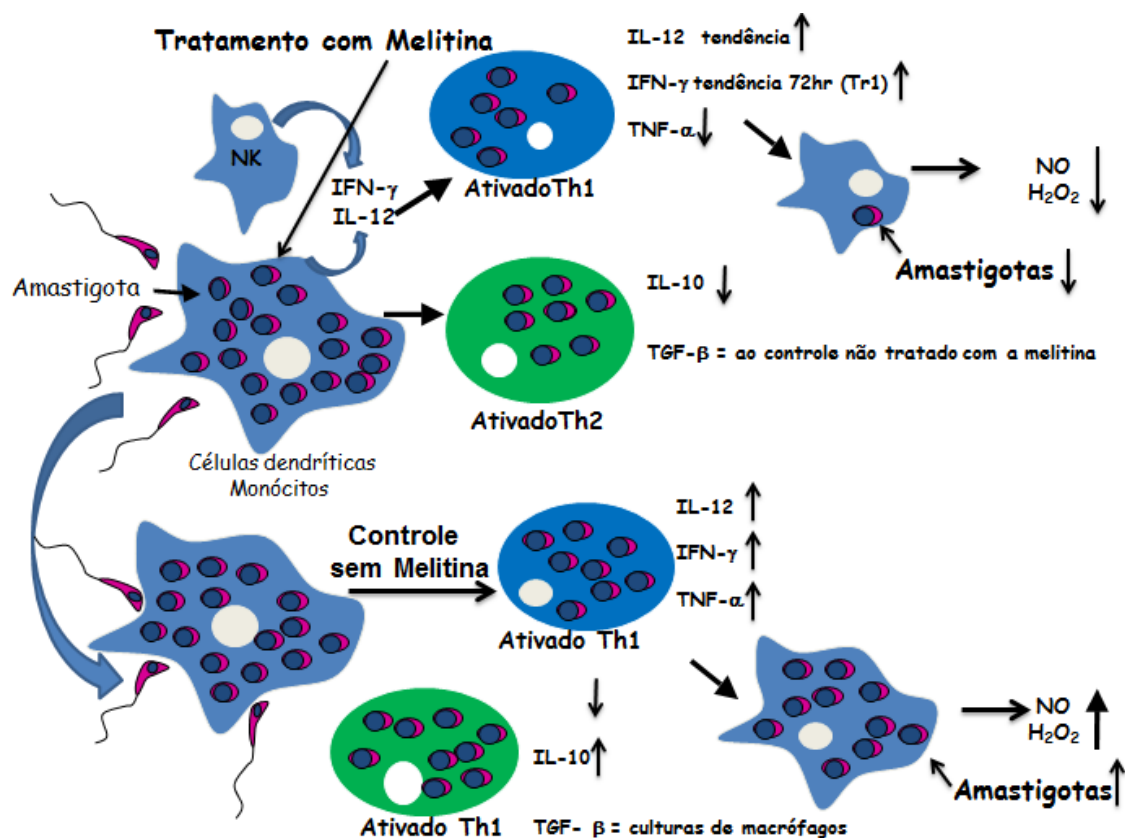


Figura 17. Esquematização do mecanismo modulador da melitina sobre macrófagos infectados com o parasita *L. (L.) infantum chagasi*.

Desafio	CP	H ₂ O ₂	NO	TNF- α	IL-10	IL-12	IFN- γ	TGF- β 1	Viabilidade e celular
MØ x Parasita	78% (parasita)	↑	↑	↓ (72h)	= controle	= controle	= controle	= controle	100% Infectadas
MØ x T1	-	= controle	= controle	↑(24h)	= controle	= controle	= controle	= controle	70% Rompidas
MØ x T2	-	= controle	= controle	= controle	↑(24h)	= controle	= controle	= controle	100% Viáveis
MØ x T3	-	= controle	= controle	= controle	= controle	= controle	= controle	= controle	100% Viáveis
[MØ + Parasita] x T1	Células infectadas 70%	↓	↓	↓24h e 48h	↓	↑tendência	↑tendência	= controle	30% tratadas
[MØ + Parasita] x T2	Células infectadas 49%	↓	↓	↓ (24h)	↓	↑tendência	= controle	= controle	51% Cel tratadas
[MØ + Parasita] x T3	Células infectadas 75%	↓	↓	= controle	↓	↑tendência	= controle	= controle	25% Cel tratadas

Figura 18. Quadro resumo do mecanismo modulador da melitina sobre macrófagos infectados com o parasita *L. (L.) infantum chagasi*.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados concluímos que a melitina apresenta atividade anti-leishmania *in vitro* contra *L. (L.) infantum chagasi*. Sua eficácia foi comprovada contra formas extracelulares e intracelulares, mostrando ser eficaz no controle da infecção.

A melitina apresentou ação moduladora, por regular a secreção das citocinas pró e antiinflamatórias que estão relacionadas com a exacerbação e ou controle da doença.

A melitina pode ter atuado de forma direta contra o parasita intracelular e/ou por meio da modulação da resposta imune levando a ativação de macrófagos, em que estes produziram outras substâncias que não NO e H₂O₂, proporcionando uma redução da carga parasitária dentro do macrófago, sem causar danos à célula.

Apesar das Leishmanias terem acionado os mecanismos de escape diminuindo o stress oxidativo intracelular, mesmo assim houve morte parasitária, evidenciando um descontrole dos mecanismos protetores parasitários certamente desencadeados pela melitina.

7 REFERÊNCIAS

1. Langoni H, Vasconcelos CGC, Nitsche MJT, Olbrich SRLR, Carvalho LR, Silva C. Fatores de risco para zoonoses em alunos do curso de medicina veterinária, residentes e pós-graduandos. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, 2009; 12: 115-21.
2. Genestra M, Echevarria A, Cysnefinkelstein L, Vignolio-Alves L, Leon LL. Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by *Leishmania amazonensis* promastigotas and axenic amastigotes. Nitric Oxide Biol. Chem 2003; 8: 1-6.
3. Oliveira CI, Teixeira MJ, Gomes R, Barral A, Brodskyn C. Animal models for infectious diseases caused by parasites:Leishmaniasis. Drug Discovery Today: Disease Models 2004; 1: 81-86.
4. Feitosa MM. Avaliação Clínica de Animais Naturalmente infectados. In: Forum Sobre Leishmaniose Visceral Canina, Anais. 2006; 8-13.
5. Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil:quadro atual, desafios e perspectivas Visceral. Revista brasileira de epidemiologia 2004; 7:338.
6. São Paulo (Estado) Secretaria de Estado da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral do Estado de São Paulo / Coordenação Vera Lúcia Fonseca de Camargo-Neves – São Paulo: A Secretaria, 2006; 23.
7. Marcolino MMK. Avaliação de Atividade Leishmanicida in vitro de Heteropolissacarídeos Ácidos: Não Sulfatados e Naturalmente Sulfatados. Universidade Federal do Paraná 2010; 80.
8. Guerra JAO, Barros MLB, Fé, NF, Guerra MVF, Castellon E, Paes MG, Sherlock IA. Leishmaniose visceral entre índios no Estado de Roraima,

- Brasil. Aspectos clinico epidemiológicos de casos observados no período de 1989 a 1993. *Revista da Sociedade de Medicina Tropical* 2006; 37: 305-311.
9. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, 2006.
 10. Bates PA. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 1994; 79: 215-218.
 11. Schlein Y. *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitology. Today* 1993; 9: 255-257.
 12. Descoteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in *leishmania* infectivity. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1455: 341–352.
 13. Russell DG. *Mycobacterium* and *Leishmania*: stowaways in the endosomal network. *Trends Cell. Biol* 1995; 5: 125-28.
 14. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 229-243.
 15. Sacks D. e Kamhawi S. "Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis", *Ann Rev Micro* 2001; 55: 453-483.
 16. Russell DG, Talamas-Rohama P. *Leishmania* and macrophage: a marriage of convenience. *Immunology Today* 1989; 10: 328-333.
 17. Laurenti MD. Patologia e patogenia das leishmanioses. Pathology and pathogenesis of leishmaniasis. Tese. Faculdade de medicina veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo 2010; 84.

18. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology* 2002; 72: 132-41.
19. Campbell KA, Owendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG, Maliszewski C.R. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity* 1996; 4: 283-289.
20. Tuon FF, Amato VS, Bacha H, Aalmusawi T, Duarte MI, Neto VM. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infection and Immunity* 2008; 76: 866-72.
21. Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 23301-23308.
22. Vouldoukis I, Bécherel PA, Riveros-Moreno V, Arock M, Da Silva O, Debré P, Mazier D, Mossalayi MD. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *European Journal of Immunology* 1997; 27: 860-865.
23. Fiocruz. A Leishmanioses. 2013.
[Http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/tratamento.htm](http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/tratamento.htm),
acesso em 10 de março.
24. Cruz, AK Toledo JS, Falade M, Terrão MC, Kamchonwongpaisan S, Kyle DE, Uthairipibull C. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. And *plasmodium* spp.: A review. *Curr Drug Targets* 2009; 10: 178–192.
25. Baneth G, Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2002; 106: 315-324.

26. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 2002; 18: 399-405.
27. Soares-Bezerra RJ, Leon L, Genestra M. Recent advances on leishmaniasis chemotherapy: intracellular molecules as a drug target. *Rev. Bras. Cienc. Farm* 2004; 40: 2.
28. Kedzierski L, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Andrews PC, Junk PC, Kedzierska K. Leishmaniasis: Current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Curr. Med. Chem.* 2009; 16: 599–614.
29. Rocha LG, Almeida JRGS, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 2005; 12: 314-535.
30. Savornin BM, Elias R, Diaz-Lanza AM, Balansard G, Gasquet M, Delmas F. Saponins of the ivy plant, *Hedera helix*, and their leishmanicidal activity. *Planta Medica* 1991; 57: 260-262.
31. Singha UK, Guru PY, Sen AB, Tandon JS. Antileishmanial activity of traditional plants against *Leishmania donovani* in golden hamsters. *Int. J. Pharmacog* 1992; 30: 289-295.
32. Fournet A, Barrios AA, Munoz, V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol* 1994; 41:19-37.
33. Tahir AE, Ibrahim AM, Satti GMH, Theander TG, Kharazmi A, Khslid AS. The potential antileishmanial activity of some Sudanese medicinal plants. *Phytother. Res* 1998;12: 576-579.
34. Martin T, Villaescusa L, Gasquet M, Delma F, Bartolome C, Diaz-Lanza AM, Ollivier E, Balansard, G. Screening for protozoocidal activity of Spanish plants. *Pharm. Biol.* 1998; 36:56-62.

35. Passero LFD, Laurenti MD, Tomokane TY, Corbett CEP, Toyama MH. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on Leishmania (*Leishmania*) *amazonensis* Infection. *Parasitol Res* 2008; 102: 1025–1033.
36. Peichoto ME, Tavares FL, Dekrey G, Mackessy SP. A comparative study of the effects of venoms from five rear-fanged snake species on the growth of Leishmania major: identification of a protein with inhibitory activity against the parasite. *Toxicon* 2011; 58:28-34.
37. Nunes DC, Figueira MM, Lopes DS, DE Souza DL, Izidoro LF, Ferro EA, Souza MA, Rodrigues RS, Rodrigues VM, Yoneyama KA. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A2 from Bothrops pauloensis snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of Leishmania (*Leishmania*) *amazonensis*. *Parasitology*. 2013;140: 844-54.
38. Billingham ME, Morley J, Hanson JM, Shipolini RA., Vernon CA. Letter: an anti-inflammatory peptide from bee venom. *Nature* 1973; 245:163–164.
39. Terwilliger TC, Eisenberg D. The structure of melittin. I. Structure determination and partial refinement. *J Biol Chem* 1982; 257:6010-6015.
40. Hoffman DR, Golden DB. Standardized extracts. Stinging and biting insects. *Clinical Reviews Allergy* 1987; 5:75-88.
41. Papo N, Shai Y. Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides, *Biochemistry* 2003; 42: 458-466.
42. Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L., and Huang, H. W. Barrelstave model or toroidal model? A case study on melittin pores, *Biophys J* 2001; 81:1475-1485.
43. Dempsey CE. The actions of melittin on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1990; 7: 143-161.

44. Batenburg AM, Van EIJH, Kruijff B. Melittin-induced changes of the macroscopic structure of phosphatidylethanolamines, *Biochemistry* 1998; 27: 2324-2331.
45. Habermann E. Bee and wasp venoms. *Science* 1972; 177:314–322.
46. Kuhn-Nentwig L. Antimicrobial and cytotoxic peptides of venomous arthropods. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2003; 12: 2651-2668.
47. Conlon JM, Kolodziejek J, Nowotny N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of therapeutic agents. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1:1-14.
48. Park HJ, Lee SH, Son DJ, Oh KW, Kim KH, Song HS, Kim GJ, Oh GT, Yoon DY, Hong JT. Antiarthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappaB through interaction with the p50 subunit. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3504.
49. Kwon YB, Lee HJ, Han HJ, Mar WC, Kang SK, Yoon OB, Beitz AJ, Lee JH. The water-soluble fraction of bee venom produces antinociceptive and anti-inflammatory effects on rheumatoid arthritis in rats. *Life Sciences* 2002; 71: 191–204.
50. Ladokhin AS, Selsted ME, and White SH. Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulated markers: pore formation by melittin, *Biophys Journal* 1997; 72:1762-1766.
51. Rex S, Schwarz G. Quantitative studies on the melittin-induced leakage mechanism of lipid vesicles. *Biochemistry* 1998; 37: 2336-2345.
52. Allende D, Simon SA, and McIntosh TJ. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores. *Biophys Journal* 2005; 88; 1828-1837.

53. Ladokhin AS, White SH. Protein chemistry at membrane interfaces: non-additivity of electrostatic and hydrophobic interactions. *Journal Mol Biol* 2001; 309:543-552.
54. Monette M, and Lafleur M. Modulation of melittin-induced lysis by surface charge density of membranes, *Biophys Journal* 1995; 68: 187-195.
55. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides, *Biopolymers* 2002; 66: 236-248.
56. Bechinger B, Lohner K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 1529-1539.
57. Glattli A, Chandrasekhar I, Gunsteren W F. A molecular dynamics study of the bee venom melittin in aqueous solution, in methanol, and inserted in a phospholipid bilayer, *Eur Biophys Journal* 2006; 35: 255-267.
58. Beschiaschvili G, Seelig J. Melittin binding to mixed phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry* 1990; 29: 52-58.
- 59- Gonçalves E, Kitas E, and Seelig J. Structural and thermodynamic aspects of the interaction between heparan sulfate and analogues of melittin. *Biochemistry* 2006; 45: 3086-3094.
60. Gomez J, Hilser VJ, Xie D, Freire E. The heat capacity of Proteins. *Proteins* 1995; 22: 404-412.
61. Verly RM. Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaios Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos. Tese.. Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte/ MG. 2010; 206.

62. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 5449-5453.
63. Breukink E, Ganz P, Kruijff B, Seelig J. Binding of Nisin Z to bilayer vesicles as determined with isothermal titration calorimetry. *Biochemistry* 2000; 39: 10247-10254.
64. Record MT Jr, Anderson CF, Lohman TM. Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity. *Q Rev Biophys* 1978; 11: 103-178.
65. Manning GS. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Q Rev Biophys* 1978; 11:179-246.
66. Lohman TM, Haseth PL, Record MT Jr. Pentylsinedeoxyribonucleic acid interactions: a model for the general effects of ion concentrations on the interactions of proteins with nucleic acids. *Biochemistry* 1980; 19: 3522-3530.
67. Mascotti DP, Lohman TM. Thermodynamics of single-stranded RNA binding to oligolysines containing tryptophan. *Biochemistry* 1992; 31: 8932-8946.
68. Ferre R, Melo MN, Correia AD, Feliu L, Bardají E, Planas M, Castanho M. Synergistic effects of the membrane actions of cecropin-melittin antimicrobial hybrid peptide BP100. *Journal Biophys* 2009; 96:1815–1827.
69. Stromstedt AA, Wessman P, Ringstad L, Edwards K, Malmsten M. Effect of lipid headgroup composition on the interaction between melittin and lipid bilayers. *J Colloid Interface Sci* 2007; 311: 59–69.

70. Velasco M, Oiaz-Guerra MJM, Diaz-Achirica P, Andreu D, Rivas L, Bosci L. Macrophage Triggering with Cecropin A and Melittin-Derived Peptides Induces Type I Nitric Oxide Synthase Expression' The Journal of Immunology 1997; 158: 4437-4443.
71. Castiti R, Uyemura AS, Docampo R, Vercesi A. Calcium mobilization by arachidonic acid in trypanosomatids. Molecular and Biochemical Parasitology 1999, 105:261-271.
72. Hannaert V, Saa Vedra E, Duffieux F, Szikora JP, Rigden DJ, Michels PA, Opperdoes FR. Plant-like traits associated with metabolism of trypanosoma parasites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003; 100: 1067-1071.
73. Benton AW, Morse RA, Stewart JD. Venom collection from honey bees. Science 1963; 142:228–230.
74. Nicolle C. Nouvelles acquisitions sur Le kala-azar: cultures, inoculations auchien, étiologie. C R Acad Sci Paris 1908; 146:498-499.
75. Novy FG., Mcneal, W.J. The cultivation of *Trypanosome brucei*. A preliminary note. J Am Med assoc 1903; 21: 1266-1268.
76. Tempone A G, Pimenta D C, Lebrun I, Sartorelli P, Taniwaki NN., Andrade Jr HF, Antoniazzi MM, Jared C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. Toxicon 2008; 52:13–21.
77. Sampaio SC, Santos MF, Costa EP, Rangel-Santos AC, Carneiro SM, Curi R, Cury Y. Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages. Toxicon 2006;15:909–919.

78. Reimão JQ, Colombo FA, Pereira-Chiocola VL, Tempone AG. In vitro and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: Detection of viable *Leishmania* (L.) *chagasi* by real-time PCR. *Experimental Parasitology* 2011; 128:111–115.
79. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 1982; 126:131- 138.
80. Griess JP. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 1864; 154:667 731.
81. Griess P. *Ber. Dtsch. Ges.* 1879; 12:426-428.
82. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 36(1-2): 61-70.
83. Pick E, Mizel D. Rapid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods* 1981; 46(2): 211-226.
84. Kloczek G, Seelig J. Melittin interaction with sulfated cell surface sugars. *Biochemistry* 2008; 47:2841–2849.
85. Maher S, McClean S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 1289.
86. Lundquist A, Wessman P, Rennie RA, Edwards K. Melittin Lipid interaction: A comparative study using liposomes, micelles and bilayer disks *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; 1778: 2210- 2216.

87. Popplewell JF, Swann MJ, Freeman NJ, McDonnell C, Ford RC. Quantifying the effects of melittin on liposomes. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768:13-20.
88. Silva TPM, Sergio R, Araujo HP, Costa MHB, Bueno CMH. Design of a Modern Liposome and Bee Venom Formulation for the Traditional VIT-Venom Immunotherapy. *Journal of Liposome Research* 2008; 18:353-368.
89. Shorina EA, Dolgova NV, Rubtsov AM, Storey KB, Lopina OD. Melittin induces both time-dependent aggregation and inhibition of Na,K-ATPase from duck salt glands however these two processes appear to occur Independently. *Biochimica et Biophysica Acta- Biomembranes* 2004; 1661:188-195.
90. Asthana N, Yadav SP, Ghosh J. Dissection of Antibacterial and Toxic Activity of Melittin. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 55042–55050.
91. Diaz-Achirica P, Ubach J, Guinea A, Andreu D, Rivas 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; 330: 453–60.
92. Fieck A, Hurwitz I, Kang AS, Durvasula R. *Trypanosoma cruzi*: synergistic cytotoxicity of multiple amphipathic anti-microbial peptides to *T. cruzi* and potential bacterial hosts. *Exp Parasitol.* 2010; 125: 342-347.
93. Adade CM, Oliveira IR, Pais JA, Souto-Pradrón T. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon* 2013; 69:227-39.

94. Pérez-Cordero JJ, Lozano JM, Cortés J, Delgado G. Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. *Peptides* 2011; 32: 683–690.
95. Yianni YP, Fitton JE, Morgan CG. Lytic effects of melittin and d-haemolysin from *Staphylococcus aureus* on vesicles of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1986; 856: 91–100.
96. Saberwal G, Nagaraj R. Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: facets of their conformational features, structure–function correlation and membrane-perturbing abilities. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1197: 109–131.
97. Fieck A, Hurwitz I, Kang AS, Durvasula R. *Trypanosoma cruzi*: Synergistic cytotoxicity of multiple amphipathic anti-microbial peptides to *T. cruzi* and potential bacterial hosts. *Experimental Parasitology* 2010; 125: 342–347.
98. McPhee JB, Hancock RE. Function and therapeutic potential of host defence peptides. *J Pept Sci.* 2005; 11:677-87.
99. Maher S, McClean S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro, *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 1289-1298.
100. Petricevich VL, Teixeira CFP, Tambourgi DV, Gutiérrez JM. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon* 2000; 38:1253-1266.
101. Perez-Santos JL, Talamas-Rohana P. In vitro indomethacin administration upregulates interleukin-12 production and polarizes the immune response towards a Th1 type in susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol* 2001; 23:599–606.

102. Badaro R, Nascimento C, Carvalho JS, Badaro F, Russo D, Ho JL, Reed SG, Johnson WD, Jones TC. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reverses neutropenia and reduces secondary infections in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1994; 170: 413-18.
103. Murray HW. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004 . *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 787- 94.
104. Puentes SM, Sacks DL, da Silva RP, Joiner KA. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J Exp Med* 1998; 167: 887-902
105. Coelho-Castelo AAM, Trombone APF, Rocha CD, Lorenzi JCC. Immune response to infectious diseases. *Medicina* 2009; 42: 127-42.
106. Comte M, Maulet Y, Cox JA. Ca²⁺-dependent high-affinity complex formation between calmodulin and melittin. *Biochem J* 1983; 209: 269-72.
107. Raskovalova T, Huang X, Sitkovsky M, Zacharia LC, Jackson EK, Gorelik E. Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells. *J.Immunol* 2005; 175:, 4383-4391.
108. Abbracchio MP, Ceruti. P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signalling* 2007; 3: 13-25.
109. Brito MGO. Imunoterapia na Leishmaniose Cutânea. Dissertação. Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia 2012; 86.
110. Moon DO, Park SY, Lee KJ, Moon SH, Kim KC, Kim MO, Lee JD, Choi YH, Kim GY. Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *International Immunopharmacology* 2007; 7: 1092–1101.

111. Stuhlmeier KM. Apis mellifera venom and melittin block neither NF-kappa B-p50-DNA interactions nor the activation of NF-kappa B, instead they activate the transcription of proinflammatory genes and the release of reactive oxygen intermediates. *J Immunol.* 2007; 179: 655.
112. Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med* 2007; 204: 239-43.
113. Lapara NJ III, Kelly BL. Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with *Leishmania*. *J Inflamm* 2010; 7: 8.
114. Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol* 2001; 166: 1141-1147.
115. Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Corraliza I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med* 2001; 193: 777-784.
116. Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelén J, Mirón C, Alonso C, Corraliza I. (2002) Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol* 2002; 24: 113-118.
117. Iniesta V, Carcelén J, Molano I, Peixoto PM, Redondo E, Parra P, Mangas M, Monroy I, Campo ML, Nieto CG, Corraliza I. Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infect Immun* 2005; 73: 6085-6090.
118. Sutterwala FS, Noel GJ, Salgame P, Mosser DM. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc gamma receptor type I. *J Exp Med* 1998; 188: 217-222.

119. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci* 1997; 22: 477-481.
120. Bogdan C. The function of nitric oxide in the immune system. *Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. Nitric Oxide* 2000; 32: 443–492.
121. Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2007; 51: 443-452.
122. Hao J, Liu MG, Yu YQ, Cao FL, Li Z, Lu ZM, Chen J. Roles of peripheral mitogen-activated protein kinases in melittin-induced nociception and hyperalgesia. *Neuroscience* 2008; 152:1067-1075.
123. Bonnefoy M, Draï J, Kostka T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives *Presse Med* 2002; 31: 1174.
124. Melos JLR, Echevarria A. Sistemas enzimáticos de tripanossomatídeos como potenciais alvos quimioterápicos. *Revista Virtual Química* 2012; 4: 4.
125. Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A. Trypanothione: a novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* 1985; 227: 1485-1487.
126. Sainz J, Wangensteen R, Rodriguez G, Moreno IJM, Chamorro V, Osuna A, Bueno P, Vargas F. Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition. *Am J Hypertens* 2005; 18: 871.
127. Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, Oliver M, Papadopoulou B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *Embo J.* 1997; 16:2590-2598.

128. Tovar J, Cunningham ML, Smith AC, Croft SL, Fairlamb AH. Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: Effect on parasite intracellular survival. *Proceedings. Proc. Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5311-5316.
129. Schmidt A, Krauth-Siegel RL. Enzymes of the Trypanothione Metabolism as Targets for Antitrypanosomal Drug Development. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2002; 2: 1239-1259.
130. Romão PR, Tovar J, Fonseca SG, Moraes RH, Cruz AK, Hothersall JS, Noronha-Dutra AA, Ferreira SH, Cunha FQ. Glutathione and the redox control system trypanothione/ trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. Against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 355-363.
131. Wu G. ,and S. M. Morris, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond . *Journal Biochem* 1998; 336; 1:1-17.
132. Gil ES, Cunha LC; Paula JR, Bezerra JCB, Aguiar FA. Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares . *Vita et Sanitas* 2007; 1: 90.
133. Santos PL, Costa RV, Braz JM, Santos LFVC, Batista AC, Vasconcelos CRO, Rangel MR, Ribeiro de Jesus A, de Moura TR, Leopoldo PTG, Almeida RP. *Leishmania (L.) infantum chagasi* naturally resistant to nitric oxide isolated from humans and dogs with visceral leishmaniasis in Brazil. *Nitric Oxide* 2012; 27: 67–71.
134. Silva F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *RevistaTrópica–CiênciasAgráriaseBiológicas* 2007; 1:20.
135. Genestra M, Guedes-Silva D, Souza WJS, Cysne-Finkesltein L, Soares-Bezerra RJ, Monteiro FP, Leon LL. Nitric Oxide Synthase (NOS)

Characterization in *Leishmania amazonensis* Axenic Amastigotes, Archives of Medical Research 2006; 37: 238.

136. Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. Acta Trop 2010; 115: 55.
137. Kataoka M, Headt JF, Seatont BA, Engelman DM. Melittin binding causes a large calcium-dependent conformational change in calmodulin. Proc. Nati. Acad. Sci 1989; 86: 6944-6948.
138. Guidarelli A, Sestili P, Fiorani M, Cantoni O. Arachidonic acid induces calcium-dependent mitochondrial formation of species promoting strand scission of genomic DNA. Free Radical Biology & Medicine 2000; 28: 1619–1627.
139. Hong SJ, Rim GS, Yang HI, Yin CS, Koh HG, Jang MH, Kim CJ, Choe BK, Chung JH. Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. Toxicon 2005; 46: 39-45.
140. Krauson AJ, He J, Wimley WC. Determining the mechanism of membrane permeabilizing peptides: Identification of potent, equilibrium pore-formers. Biochimica et Biophysica Acta 2012; 1818: 1625–1632.
141. Park JH, Kim KH, Lee WR, Han SM, Park KK. Protective effect of melittin on inflammation and apoptosis in acute liver failure. Apoptosis 2012; 17:61–69.
142. Fonseca-Geigel L. A via do óxido nítrico em *Leishmania amazonensis*. Dissertação de Mestrado. Fundação Instituto Oswaldo Cruz 2000; 89.

143. Genestra MS, Echevarria A, Cysnefinkelstein L, Leon LL. Protein kinase A of *Leishmania amazonensis* as a potential target for methoxy-amidine. Drug Res. 2001; 11: 920-923.
144. Tempone AG, Perez D, Rath S, Vilarinho AL, Mortara RA, de Andrade HF. Targeting *Leishmania* (L.) *chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2004; 54: 60–68.
145. Persichini T, Cantoni O, Suzuki H, Colasanti M. Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: an update. Antioxid Redox Signal 2006; 8: 949-54.
146. Tempone AG, Mortara RA, de Andrade HF, Reimão JQ. Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. International Journal of Antimicrobial Agents 2010; 36: 159–163.
147. Reimão JQ, Colombo FA, Pereira-Chioccola VL, Tempone AG. Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*. Experimental Parasitology 2012; 130: 195–199.
148. Blondelle SE, Ostresh JM, Houghten RA, Pérez-Payá E. Induced conformational states of amphipathic peptides in aqueous/lipid environments. Biophys Journal 1995; 68: 351–359.
149. Ulmschneider MB, Sansom MS. Amino acid distributions in integral membrane protein structures. Biochimica et Biophysica Acta 2001; 1512:1-14.

150. Sanderson JM. Peptide-lipid interactions: insights and perspectives. *Organic and biomolecular chemistry* 2005; 3: 201-212.
151. Raghuraman H, Chattopadhyay A. Cholesterol inhibits the lytic activity of melittin in erythrocytes. *Chem Phys Lipids* 2005; 134:183-189.

* Segundo normas de Vancouver: "Uniform Requirements for Manuscripts to Biomedical Journals" (International Committee of Medical Journal Editors, 2008. <http://www.icmje.org>) e por deliberação do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

ANEXO 1





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
 CAMPUS DE BOTUCATU
 FACULDADE DE MEDICINA

Comissão de Ética em Experimentação Animal

Criada através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99

Certificado

Certificamos que (Protocolo CEEA 893-2011) "Determinação da atividade antiparasitária e imunomodulatória in vitro e in vivo da fosfolipase A2 e da melitina extraídas do veneno de abelhas africanizadas (*Apis Melifera*) na infecção experimental por *Leishmania chagasi*", a ser conduzido por Andréia Vieira Pereira, orientada pelo Prof. Titular Benedito Barravieira, Co-orientada pelo Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior, com a colaboração de Gustavo Adolfo Calsolari de Barros, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "camundongos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 28/07/2011.


 Profª Drª Maria Rosa Bet Moraes Silva
 Presidente da CEEA


 Alberto Santos Capelluppi
 Secretário da CEEA