



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Farmácia



Camundongos *Hairless* como modelo experimental da infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e tratamento de lesões cutâneas com a fração polar da extração sequencial de *Selaginella sellowii* em camundongos BALB/c

Vanessa Carneiro Pereira de Araujo

Campo Grande – Mato Grosso do Sul

Julho/2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Programa de Pós- Graduação em Farmácia

Vanessa Carneiro Pereira de Araujo

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Farmácia, da
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul como requisito
parcial para obtenção do título
de Mestre.

Sob orientação da Prof^ª Dr^ª Carla Cardozo
Pinto de Arruda.

Julho/2014

Vanessa Carneiro Pereira de Araujo

Camundongos *Hairless* como modelo experimental da infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e tratamento de lesões cutâneas com a fração polar da extração sequencial de *Selaginella sellowii* em camundongos BALB/c

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Farmácia, da
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul como requisito
parcial para obtenção do título
de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Carla Cardozo Pinto de Arruda
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof^a. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

Prof^a. Dra. Doroty Mesquita Dourado
Universidade Anhanguera-UNIDERP

Julho 2014

Dedicatória

Aos meus pais Suzel e Wilson por terem me proporcionado a oportunidade de estudar, e alcançar mais um degrau na minha caminhada, por terem me incentivado à bater asas, mesmo que esta oportunidade pudesse causar a dor da distância. Ao meu noivo Ricardo pela cumplicidade. E a minha irmã Tatiana por ser sempre minha melhor amiga.

Agradecimentos

Durante a minha vida acadêmica assisti a algumas defesas de dissertações e teses e sempre me chamava muita atenção o espaço destinado aos agradecimentos. Impressionava-me o cuidado de seus autores em mencionar todos aqueles que, de alguma forma, foram fundamentais para a realização daquele trabalho. E desta forma sempre pensei que agradecer a quem participou dessa jornada fosse tão importante quando finalizá-la com êxito. Agora que me vejo no desempenho dessa tarefa, confesso que entendo a responsabilidade de realizá-la.

Agradeço à minha mãe Suzel, pela incansável função de mãe, mulher, guerreira e protetora. Por todas as vezes que me ajudou no “dever de casa”, que conferiu minha mochila, que “tomou” o conteúdo da prova, mesmo depois de três jornadas diárias de trabalho. Agradeço também por todas as vezes que você saiu do conforto do seu lar e das suas tarefas diárias pra vir até Campo Grande quando precisei. Obrigada!

Ao meu pai Wilson, que me cobrava sempre a obrigação de ser uma boa aluna, de dar o exemplo no colégio, e sempre me acordava com o barulho do saquinho de pão batendo na porta do quarto dizendo “Bom Dia amores, vamos levantar!” e em seguida vinha com o copo de leite.

À minha irmã Tatiana, por ser o meu espelho. Meu exemplo de determinação, inteligência, sensibilidade e coragem. A ela reservo o meu mais sincero amor.

Ao meu noivo Ricardo, que desde a defesa do meu trabalho de monografia divide comigo todas as minhas angústias, minhas fraquezas, meus sorrisos, minhas lágrimas. Obrigada, você tem sido muito mais do que um dia eu esperei.

À minha orientadora Carla, pelo prazer de um dia ter conhecido e ter tido a satisfação de poder conviver com alguém como você. Eu já tinha conhecido pessoas de alma boa nesta vida, mas como você? Ninguém. Talvez seja você a figura fundamental desta caminhada. Se hoje estou aqui foi porque você, com a sua bondade infinita, me permitiu fazer parte da sua equipe. Permitiu-me, depois, concorrer à vaga do mestrado, mesmo já tendo as duas alunas destinadas às duas vagas disponíveis. Acompanhou-me em todos os momentos como mãe, amiga, confidente e me ensinou muito mais do que lições de Parasitologia Humana, Leishmaniose e Camundongos. Obrigada, perto ou longe estarei sempre torcendo por Você.

Gostaria de agradecer aos meus avós Vô Roldan, Vó Maria e Vô Alexandrino (*in memorian*), que hoje não estão mais entre nós, mas foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Às minhas amigas(os) Keth, Andressa, Laís, Thaís, Mari, Rick e Cézar, por serem os irmãos que um dia Deus colocou em minha vida.

E ao laboratório de Parasitologia Humana, vocês fizeram meus últimos quatro anos inesquecíveis. Foram a família que eu não pude ter por perto.

E ao Programa de Pós Graduação em Farmácia, pelo oportunidade.

Obrigada!

Sumário

1. Revisão de Literatura	9
1.1 Leishmanioses	9
1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana	13
1.2.1. Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)	15
1.2.2. Leishmaniose Mucocutânea (LMC)	15
1.2.3. Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)	16
1.3. Modelos experimentais para a LT	16
1.3.1. Camundongos Hairless como modelos experimentais	18
1.4 Tratamento da LT	20
2. Objetivos	24
2.1 Objetivos Gerais	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3. Referências Bibliográficas	26
MANUSCRITO 1	31
1. Introdução	34
2. Materiais e Métodos	35
3. Resultados e Discussão	37
4. Conclusões	44
5. Agradecimentos	44
6. Referências	45
MANUSCRITO 2	49
1. Introdução	52
2. Materiais e Métodos	53
3. Resultados	56
4. Discussão	63
5. Conclusões	65
6. Agradecimentos	65
7. Referências	65

1. Revisão de Literatura

1.1 Leishmanioses

As Leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania* Ross 1903 (Família Trypanosomatidae, Ordem Kinetoplastida), com mais de 20 espécies conhecidas capazes de infectar os seres humanos (Monzote, 2009). O parasito foi observado por Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna, porém o gênero *Leishmania* foi proposto por Ronald Ross, em 1903 (Ross, 1903; WHO, 2010).

As leishmanioses representam um grande problema de saúde pública devido ao seu amplo espectro clínico e sua diversidade epidemiológica (Brasil, 2010). Estima-se um número de novos casos mundiais por volta de 1,3 milhões, com 20 a 30 mil mortes a cada ano nas diferentes formas clínicas e cerca de 310 milhões de indivíduos expostos ao risco de infecção (WHO, 2014) (Figura 1).

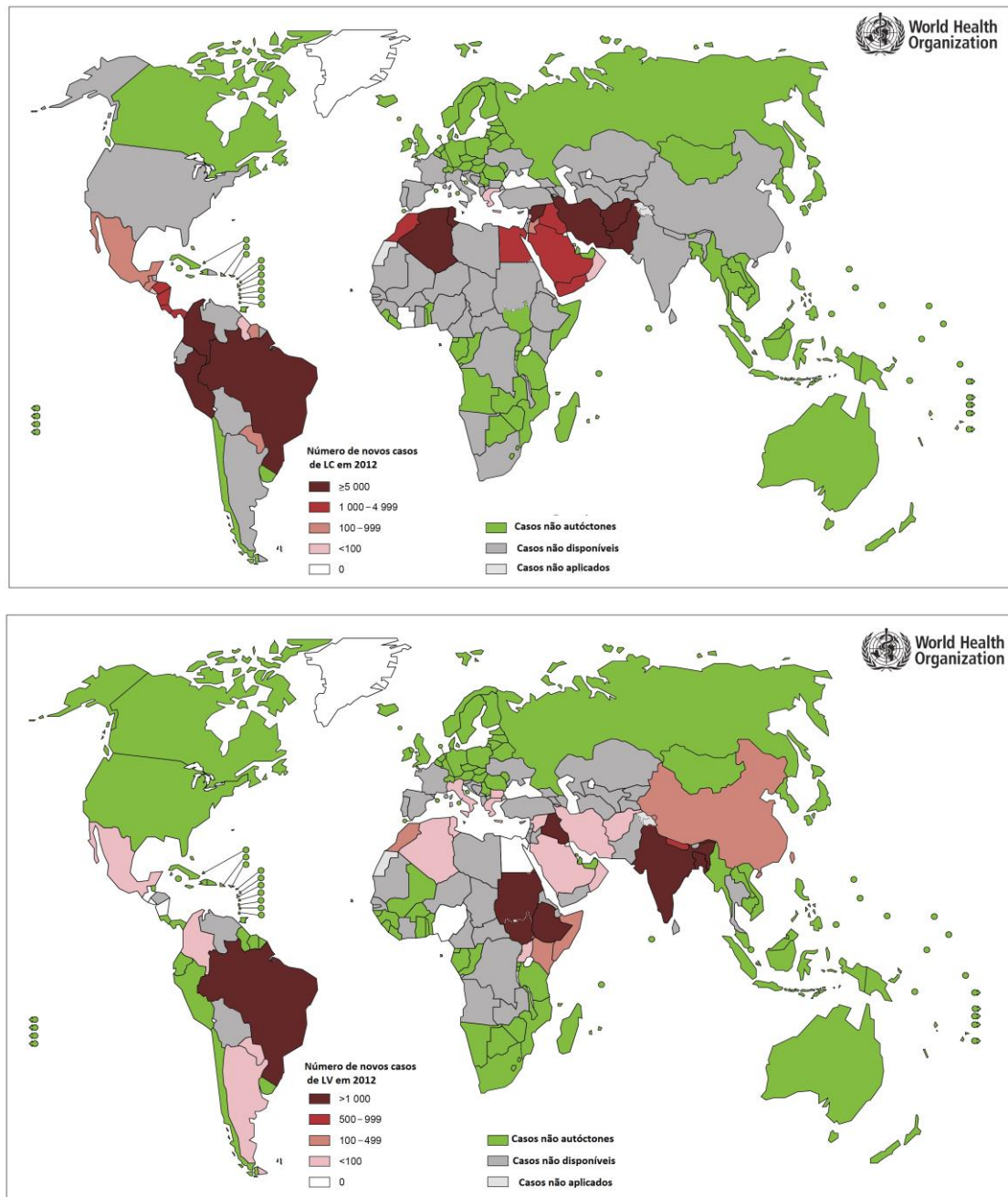


Figura 1. Distribuição mundial de casos de Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Visceral (LV) no ano de 2012.
(Adaptado de <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>)

Os parasitos são transmitidos através da picada dos vetores, flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* spp (Novo Mundo) ou *Phlebotomus* spp (Velho Mundo), que anteriormente picaram um animal infectado (Ready, 2013). Das mais de 900 espécies de flebotomíneos conhecidas, o número de espécies incriminadas como vetores das Leishmanioses não ultrapassa 70 (Ready, 2013). As fêmeas hematófagas são as responsáveis pelo repasto e infecção de

todas as espécies do gênero *Leishmania* para os hospedeiros vertebrados (Peterson e Shaw, 2003).

Os hospedeiros vertebrados são comumente mamíferos silvestres como a preguiça, o tamanduá, marsupiais e roedores. Em espécies domésticas, o parasito é muito frequente em cães, sendo encontrado também em gatos e equinos (Souza et al., 2005; Souza et al., 2009).

O mecanismo de transmissão está associado a duas hipóteses principais. A primeira se refere à ingestão de formas amastigotas, durante o repasto sanguíneo pela fêmea, a partir de um hospedeiro infectado. Em regiões distintas do tubo digestivo do vetor, sob diferentes condições, como aumento no pH e diminuição da temperatura, a amastigota se diferencia em promastigota metacíclica, responsável por infectar novos hospedeiros suscetíveis. Inicialmente acreditava-se que as formas infectantes migravam para o aparelho bucal do vetor, denominado de probóscida, promovendo uma obstrução mecânica e impedindo a ingestão de sangue. Tal obstrução faria com o que o inseto tentasse se alimentar por diversas vezes; no entanto, após cada tentativa de sucção, os músculos responsáveis por essa ação relaxariam, promovendo a regurgitação do material ingerido, sendo posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada (Dostálová e Volf, 2012).

Além da já tradicional obstrução mecânica decorrente da presença das formas promastigotas metacíclicas na probóscida do inseto, mais especificamente junto à válvula estomodeal, recentemente demonstrou-se que estes parasitos secretam moléculas específicas, criando um gel aderente lipofosfoglicano (LPG) que promove danos à válvula; como interferência em sua função, o gel facilita o refluxo de sangue e a inoculação das formas promastigotas presentes durante o repasto sanguíneo (Bates, 2007; Dostálová e Volf, 2012; Rogers et al., 2004;)

Nos hospedeiros vertebrados (mamíferos), os parasitos são interiorizados por células do sistema fagocítico mononuclear, especialmente os macrófagos, células dendríticas e/ou fibroblastos. Uma vez no interior dos macrófagos, formam os chamados vacúolos parasitóforos, compartimentos responsáveis por albergar a nova forma parasitária formada. Neles, as formas amastigotas adquirem um formato circular, sem flagelo livre, dividindo-se sucessivamente por divisões binárias, levando ao rompimento do macrófago e liberação das

amastigotas; estas são fagocitadas por novos macrófagos, propagando assim a infecção (Antoine et al., 1998; Courret et al., 2002; Sacks e Kamhawi, 2001) (Figura 2).

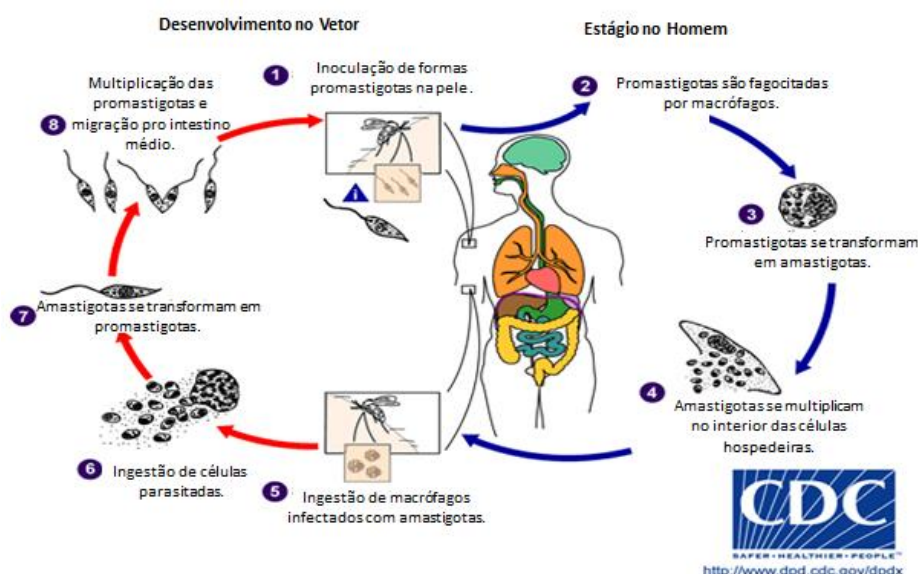


Figura 2. Ciclo Biológico de *Leishmania* sp (Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), existem quatro formas clínicas principais da doença: a forma cutânea ou tegumentar, caracterizada por úlceras na pele, apresentando cura espontânea após alguns meses; a forma cutânea difusa, evidenciada por lesões cutâneas crônicas disseminadas; a mucocutânea, que atinge e pode destruir as mucosas da região nasobucofaringea e, por fim, a forma visceral, também conhecida por calazar (*Kala-azar*, termo de origem indiana) (WHO, 2014).

Nas Américas, as leishmanioses ocorrem desde a região Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina, sendo o foco mais relevante na América do Sul. No Brasil, a incidência vem aumentando nas últimas décadas, disseminando-se por todos os Estados brasileiros (PAHOWHO, 2014).

Em Mato Grosso do Sul, as leishmanioses são endêmicas, atingindo proporções epidêmicas. Analisando o banco de dados a partir de 2002, é possível observar uma expansão em relação ao padrão de urbanização da doença nos municípios do Estado. Segundo dados do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN, 2012) foram confirmados 2.526 casos de Leishmaniose Visceral (LV) entre 1999 e 2011. No ano de 2011, foram notificados 273 casos de LV distribuídos em 26 municípios do estado, onde

mais da metade dos casos (50,14%) concentravam-se na capital, Campo Grande. Nesse mesmo período, foram notificados 80 casos autóctones com a forma cutânea da doença, estando a grande maioria desses casos também localizados na capital do estado (Mato Grosso do Sul, 2012).

1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana

A epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar (LT) nas Américas, onde recebe o nome de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), faz-se complexa devido à variedade de espécies de *Leishmania* circulantes. Variações no ciclo de transmissão, nas manifestações clínicas e, conseqüentemente, na resposta à terapêutica, são também verificadas (WHO, 2014).

Por muito tempo, a LTA foi considerada uma doença ocupacional, atingindo predominantemente homens que trabalhavam próximo ou dentro de regiões de mata; no entanto, com a adaptação dos vetores aos peridomícios e a expansão das cidades para regiões anteriormente ocupadas por vegetação, assim como para assentamentos próximos a áreas de mata, o perfil epidemiológico tem sido alterado (Desjeux, 2001; Peterson e Shaw, 2003; Shaw, 1999).

Alguns fatores são associados ao risco da população em adquirir a doença, como o sexo masculino, fator que normalmente determina a atividade ocupacional com maior exposição ao vetor, a idade, o local de residência e a presença de animais domésticos (Desjeux, 2001). Estudos recentes sugerem um novo padrão epidemiológico para a doença, atingindo agora mulheres e crianças, com alto índice de acometimento (Murbach et al., 2011).

No Brasil, a LTA é a infecção dermatrópica de maior magnitude, podendo afetar psicologicamente o indivíduo ao levar a deformidades anatômicas. Apresenta uma ampla distribuição, com autoctonia em todos os estados brasileiros (Brasil, 2010).

São reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana nas Américas. São elas: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) panamensis*, *L. (Viannia) peruviana*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) colombiensis*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (Leishmania) pifanoi*, *L. (Leishmania) venezuelensis*

e *L. (Leishmania) garnhami*. Mais especificamente no Brasil, foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. Mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram descritas em estados da região amazônica do Brasil. No entanto, já está bem estabelecido que as três principais espécies circulantes são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (Brasil, 2010; Reithinger et al., 2007).

As manifestações clínicas da LTA são determinadas pela espécie de *Leishmania* em causa e por características específicas de cada hospedeiro. Dividem-se classicamente em Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Mucosa (LCM) e Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) (Reithinger et al., 2007).

Um dos principais mecanismos que determinam o perfil da infecção é a resposta imunológica do hospedeiro. Sabe-se que esta resposta está associada às células T, de forma complexa (Almeida e Santos, 2011).

De forma geral, acredita-se que a resposta inflamatória de padrão Th1, mediada por células *T-helper*, previne a exacerbação da doença e a proliferação do parasito. Ela é capaz de ativar células de defesa como linfócitos T CD4+ e T CD8+, que secretam citocinas proinflamatórias como Interferon- γ (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α). Em contrapartida, citocinas características de padrão de resposta Th2, como as Interleucinas 10, 4 e 13 (IL-10, IL-4, IL-13), impedem a ativação dos macrófagos, contribuindo para a disseminação dos parasitos (Scott, 2005).

Estudos indicam que, logo após a infecção, há uma ausência na produção de IFN- γ , o que permite a multiplicação do parasito, e, posteriormente, inicia-se a produção do mesmo na tentativa de controle da infecção. No entanto, a produção exacerbada de IFN- γ e TNF- α , também importantes no controle da infecção, pode ser prejudicial, causando expressiva lesão tecidual. Isso mostra que as mesmas citocinas importantes para a morte do parasito também podem estar envolvidas na patogenia da LT (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998).

1.2.1. Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)

A forma cutânea localizada é ocasionada principalmente pelas espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, com acometimento exclusivo da pele. A lesão primária se forma no local da picada do inseto flebotomíneo, ocorrendo normalmente de maneira única, exceto pela presença de inúmeras picadas do vetor. Após o período de incubação, que pode variar de 10 dias a três meses, há formação de uma pápula eritematosa com bordas elevadas, endurecidas e fundo com tecido de granulação, que pode evoluir lentamente para uma um nódulo ou regredir de forma espontânea. As lesões podem vir acompanhadas de sinais como linfadenopatia regional e linfangite nodular. Possuem uma boa resposta ao tratamento quando não há regressão de forma espontânea, sendo que a cura da lesão pode estar restrita a algumas espécies de *Leishmania* (Gontijo e Carvalho, 2003; Reithinger 2007).

1.2.2. Leishmaniose Mucocutânea (LMC)

A leishmaniose cutânea mucosa ou mucocutânea ocorre em 3 a 5% dos pacientes acometidos pela LT, sendo mais comumente causada por *L. braziliensis*. Em 1% dos casos, pode levar o paciente a óbito. Tem como característica lesões destrutivas nas mucosas da região nasobucofaringeana, sendo que nos casos mais evoluídos pode levar a deformações e mutilações na face. De forma geral, apresenta lesão indolor com início no septo nasal anterior, cartilaginoso, também podendo originar-se da lesão cutânea adjacente ou de uma região semimucosa exposta, como os lábios (Brasil, 2010).

A lesão do tipo mucosa pode desenvolver-se a partir de uma lesão simples com evolução crônica, curada sem tratamento ou tratamento inadequado. Acredita-se que ela ocorra por disseminação hematogênica ou linfática dos parasitos para as mucosas nasais, abrangendo orofaringe, palato, lábios, língua, laringe e, excepcionalmente, traqueia e árvore respiratória superior. O grupo de maior risco envolvido são homens adultos com lesões múltiplas, extensas e com mais de um ano de evolução, localizadas acima da cintura (Brasil, 2010).

1.2.3. Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)

Silva (1958) descreveu o primeiro caso de LCD no Brasil, no estado do Pará, na Amazônia brasileira. Entre 1970 e 1990, esta nova forma ganhou destaque, com cerca de 20 casos notificados neste estado. Características de alta gravidade são atribuídas à LCD, que tem por agente etiológico *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Lainson e Shaw, 1987; Silveira, 2009).

Até o presente momento, ainda são realizadas inúmeras pesquisas com o objetivo de complementar a clínica com informações sobre o comportamento imunológico e parasitológico da doença, que se caracteriza por lesões múltiplas papulares que se formam a partir do local da infecção, acometendo normalmente face e tronco. O aparecimento de múltiplas lesões ocorre provavelmente pela disseminação do parasito por via hemática e/ou linfática, podendo se estabelecer em poucos dias ou até mesmo em 24 horas, levando ao aparecimento de lesões distantes do local da picada. Concomitantemente, tem sido observado acometimento mucoso em 30% dos casos, acompanhado de manifestações sistêmicas como febre, mal-estar geral e dores musculares (Brasil, 2010; Reithinger et al., 2007; Silveira, 2009).

Comparada à LCL, a LCD é mais difícil de ser tratada e os pacientes não apresentam cura espontânea. Possui uma forte expressão imunológica de perfil Th2, padrão este responsável pela disseminação da doença, já que age desativando macrófagos e impedindo a produção constante de citocinas associadas à proteção (Reithinger et al., 2007).

1.3. Modelos experimentais para a LT

Os modelos experimentais são de suma importância para a Ciência, pois auxiliam no estudo dos diferentes mecanismos relacionados à doença (Falu et al., 2009), assim como na compreensão de fenômenos naturais. Especificamente na área da saúde, permitem o melhor conhecimento da fisiologia e da etiopatogenia das doenças, da ação dos medicamentos e até mesmo dos efeitos das intervenções cirúrgicas (Hochman et al., 2004).

O termo “modelos” (do latim, *pequenas medidas*) indica qualquer exemplar utilizado pelo método analítico para pesquisar e investigar uma hipótese (Ferreira e Ferreira, 2003). Especificamente em relação aos animais

experimentais (modelos experimentais), é importante que reúnam condições naturais ideais para o desenvolvimento de uma hipótese e sejam mantidos em ambientes adequados atendendo aos padrões sanitários, uma vez que as condições sob as quais o animal é mantido podem interferir diretamente nos resultados do experimento em questão. Outro fato também relevante ao uso destes animais em pesquisa diz respeito à uniformidade das linhagens em relação às variações ambientais, genéticas e experimentais, visto que, quanto mais uniforme for o grupo experimental, menor poderá ser a quantidade amostral (Ferreira et al., 2005).

A experimentação animal se reveste de grande importância nas pesquisas científicas, contribuindo sobremaneira para o desenvolvimento da ciência e tecnologia. Como exemplo, os modelos murinos para a leishmaniose cutânea surgiram para o estudo do desenvolvimento e controle da resposta imunológica mediada por células, sendo a susceptibilidade a *Leishmania* geneticamente determinada entre as diferentes linhagens de camundongos (Pearson e Wilson, 1988; Wilson e Pearson, 1990). Desde então, são utilizados na LT experimental, sendo importantes tanto para o estudo e compreensão da patogênese quanto para o desenvolvimento de vacinas (Oliveira e Barral-Netto, 2005).

Dentre os modelos para a LT experimental, o paradigma Th1/Th2 explica as diferenças entre as linhagens suscetíveis (BALB/c e C57BL/10) e resistentes (C57BL/6J e CBA). É tradicionalmente conhecida como suscetível à infecção por *L. amazonensis* a linhagem de camundongos *inbred* BALB/c. Como na *L. major*, espécie causadora da forma tegumentar no velho mundo, a susceptibilidade está relacionada à formação da lesão cutânea, acompanhada de um padrão de reposta do tipo Th2. Por outro lado, animais C57BL/6, com padrão de resistência, apresentam uma típica e duradoura resposta Th1 e por isso são também alvos de estudos para melhor compreensão dos mecanismos de cura da doença (Loría-Cervera e Andrade-Narváez, 2014; Falu et al., 2009).

Após mais de 40 anos de pesquisas em modelos murinos, tem-se como estabelecido que o mecanismo mais eficiente para a morte de *Leishmania* e consequente cura da doença envolve a produção contínua de IFN- γ e TNF- α por células T CD4+, de padrão Th1. Estas, por sua vez, estimulam a indução da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), produzindo assim o Óxido Nítrico (NO),

uma citotoxina que age inibindo o parasito (Loría-Cervera e Andrade-Narváez, 2014).

Em contrapartida, a susceptibilidade observada em camundongos BALB/c e outras linhagens de camundongos *inbred* traduz-se em uma lesão primária progressiva e, posteriormente, múltiplas lesões metastáticas, que evoluem podendo levar o animal infectado a óbito. Essa progressão ocorre devido à produção de citocinas de padrão Th2, tais como IL-4, IL-10 e TGF- β , que impede a ativação de macrófagos e consequente produção do NO (Loría-Cervera e Andrade-Narváez, 2014).

A infecção induzida por *L. amazonensis* em camundongos C3H tem evidenciado baixos níveis na produção de IL-12 e IFN- γ por células T CD4+ antígeno-específicas. Além disso, resultados mostrando a carga parasitária exacerbada e o desenvolvimento da lesão na presença das células T CD4+ justificam a ativação desse tipo celular na infecção por *L. amazonensis*, contribuindo significativamente para a imunopatologia da doença crônica (Loría-Cervera e Andrade-Narváez, 2014).

1.3.1. Camundongos Hairless como modelos experimentais

Classicamente, a LT tem sido estudada em modelos experimentais que utilizam vias de administração subcutânea ou intradérmica, em pata, base de cauda e orelha (Wege et al., 2012; Arruda et al., 2009; Moura et al., 2010). Estes modelos têm sido utilizados em testes de novas formulações para o tratamento da LT, sejam elas de uso tópico, oral, intradérmico, intralesional ou em forma de tatuagem (Shio et al, 2014; Moura et al., 2010; Arruda et al., 2009)

A exemplo destes testes, Shio et al. (2014) mostraram resultados satisfatórios com o método de tatuagem, aplicando uma formulação de oleylphosphocholine (OLPC) na forma lipossomal na base da cauda de camundongos BALB/c, que precisaram ser previamente depilados para o bom emprego do método proposto. O tratamento na base da cauda com o método de tatuagem deu-se após a inoculação de formas promastigotas de *L. major* e *L. mexicana*, tendo sido esta comparada a demais vias de administração: sistêmica, intraperitoneal e uso tópico. O trabalho mostrou-se vantajoso pela baixa quantidade de droga utilizada e pela formulação lipossomal alcançar os parasitos intracelulares, afirmando sua eficácia comparada a outras vias tanto

ao nível clínico quanto parasitológico. Neste caso, um modelo animal sem o crescimento de pelos eliminaria os riscos de cortes e reações alérgicas potencialmente causadas pela depilação indispensável para realização do teste, além de permitir uma avaliação mais prolongada do tratamento. Costa Filho et al. (2008). utilizaram a observação da cicatrização da ferida como critério clínico para auxiliar na avaliação de possível cura após o tratamento em que os animais foram submetidos. Assim como o trabalho de Shio et al. (2014), Wadi et al. (2011) e Arruda et al. (2009) utilizaram a base da cauda para inoculação de *Leishmania* sp, evidenciando mais uma vez que o uso do modelo sem pelos poderia otimizar os testes de possíveis opções terapêuticas.

Os trabalhos citados acima justificam o emprego promissor de um novo modelo animal, sem pelos, na LT experimental. Em vista disso, apresentamos os camundongos *Hairless*.

Os camundongos conhecidos como *Hairless* (mutantes sem pelos) pertencem à linhagem *inbred* HRS/J. A mutação *Hairless* (Hr^{hr}) foi encontrada em um camundongo capturado em um aviário em Londres, em 1924, e levada ao Jackson Laboratory em 1956 pelo Dr. E.L. Green, que cruzou este mutante com uma fêmea de camundongo BALB/c. Desde então, o acasalamento é feito entre um macho hr/hr e uma fêmea $hr/+$, gerando filhotes homozigotos (Santos, 2002). Os camundongos homozigóticos para a mutação *hr* têm maior incidência e início precoce de leucemia, assim como menor quantidade de células T *helper*, prejudicando a resposta imunológica do tipo celular; no entanto, não apresentam deficiências imunológicas severas como os camundongos da linhagem *Nude* (The Jackson Laboratory, 2014).

Os mutantes *Hairless* têm sido amplamente utilizados para estudar o ciclo deficiente de pelos, por apresentarem perda progressiva dos mesmos, sendo também utilizados para testar produtos que reduzem o envelhecimento da pele, danos causados pelos raios UVB e tratamento com ácidos (Massironi et al., 2005). Devido à ausência de pelos, o que facilitaria o estudo das lesões cutâneas, poderia vir a ser um bom modelo para o estudo da infecção induzida por espécies de *Leishmania* associadas à LT. Além disso, camundongos sem pelos são excelentes para estudos de cicatrização de feridas associadas à inflamação, pois a ausência de pelos no local da lesão facilitaria a avaliação da cura da ferida (Benavides et al., 2009).

Um novo modelo experimental, sem pelos, para a LT, possibilitaria a utilização de sítios de inoculação com menor possibilidade de interferências como infecções secundárias, além de um melhor acompanhamento do desenvolvimento da lesão cutânea. Além disso, este modelo poderia vir a ser utilizado em ensaios *in vivo* de potenciais fármacos para a LT.

1.4 Tratamento da LT

Os quimioterápicos são a forma de tratamento mais utilizada e recomendada para as leishmanioses. Dentre eles, os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) são os medicamentos de primeira escolha, seguidos pela anfotericina B, a pentamidina, a miltefosina e a aminosidina. É importante salientar que uma vacina totalmente eficaz contra a doença não está disponível, principalmente para a população humana (Monzote, 2009).

Para o tratamento da LT preconizado pela OMS, deve-se levar em consideração a espécie de *Leishmania* em causa, recomendando-se tratamento endovenoso, intramuscular ou intralesional. Para a espécie *L. amazonensis*, é preconizado o uso de primeira escolha de 20 mg/kg/dia de antimoniais pentavalentes por 20 dias consecutivos, por via endovenosa ou intramuscular; caso não haja cicatrização completa três meses após o tratamento, o esquema terapêutico deverá ser repetido, agora por 30 dias consecutivos, preferencialmente em ambiente hospitalar (WHO, 2010).

O antimoniato de meglumina (Glucantime®, Sb^{+5}) e o estibugluconato de sódio (Pentostam®), este não comercializado no Brasil, interferem nos processos bioenergéticos, ligando-se a proteínas do parasito, especialmente enzimas envolvidas na glicólise e na oxidação dos ácidos graxos, gerando assim uma redução na produção de energia (ATP e GTP). Já a Pentamidina e a Anfotericina B agem por mecanismos distintos. Enquanto a Pentaminidina se liga ao DNA do parasito, interferindo em moléculas responsáveis pelo ciclo celular, a Anfotericina B se liga a uma fração do ergosterol presente na membrana parasitária, aumentando desta forma sua permeabilidade (Chan-Bacab e Peña-Rodriguez, 2001).

Considerando o cenário de resistência às principais drogas utilizadas, procuram-se novas drogas menos tóxicas, com maior disponibilidade e ao

alcance da população menos favorecida, acometida pela parasitose. Cabe salientar que o tratamento da doença raramente erradica toda a carga parasitária, apesar da maioria dos pacientes apresentar cura clínica. Tal fato gera uma falsa impressão de cura total ou esterilizante, o que pode provocar uma reativação pela presença residual do parasito (WHO, 2010; Monzote, 2009).

O difícil acesso aos medicamentos e aos centros de saúde onde são ministrados é o principal responsável pelo uso da medicina popular, fazendo com que a grande parte das pessoas residentes em áreas endêmicas a ela recorram para aliviar os sintomas causados pela doença. Dentre os principais métodos utilizados pela população, incluem-se processos de cauterização usando sulfato de cobre, ácido de bateria ou aplicação de superfícies quentes como objetos de metais aquecidos ou água fervente. Apesar da terapêutica alternativa ser reportada em alguns casos como tão eficiente quanto o Glucantime® na cicatrização das úlceras, o uso dos objetos de metal aquecido e ácidos fortes pode resultar em danos e cicatrizes mais sérias do que as desencadeadas pela própria doença (Chan-Bacab e Peña-Rodriguez, 2001).

Algumas culturas utilizam massivamente plantas medicinais para o tratamento da LT, seja o seu extrato bruto por via oral ou aplicação dos mesmos nas lesões cutâneas. Desde 1978, a OMS tem valorizado o uso de plantas medicinais no âmbito sanitário, levando em conta o elevado percentual de pessoas (80%) que fazem uso destas ou de produtos delas derivadas na atenção primária à saúde. Destacam-se, nesse perfil, os países em desenvolvimento, que já possuem 67% das espécies vegetais do mundo (Brasil, 2006).

Na busca por novos e melhores agentes terapêuticos para a LT, essenciais para o seu controle, produtos de origem vegetal têm sido testados, uma vez que são facilmente obtidos e apresentam baixo custo.

A formulação de uma nova droga com ação leishmanicida enfrenta diversos obstáculos, incluindo a capacidade de penetrar no interior da célula parasitada, além de vencer os fatores de impedimento usuais essenciais à droga desejada, como a capacidade de resistir à degradação intracelular (Shio et al., 2014). O desenvolvimento de novas drogas recai sobre ensaios de

screening de compostos potencialmente efetivos sobre o crescimento/multiplicação dos parasitos, através de sistemas *in vitro* e *in vivo*.

Os parasitos de *Leishmania* podem ser cultivados *in vitro* como promastigotas e amastigotas, e ambos os estágios evolutivos podem ser explorados para o *screening* primário de fármacos. Os ensaios *in vitro* podem ser úteis para compostos com ação letal direta sobre os parasitos, mas não para compostos que são efetivos através de seus metabólitos ou têm ação mediada pelo sistema imunológico do hospedeiro. Desta forma, sistemas *in vitro* muitas vezes não podem ser transferidos diretamente para os sistema *in vivo* (Gupta e Nishi, 2011).

Alguns metabólitos oriundos de plantas como as quinonas, biflavonoides, alcaloides e terpenos já são usados no tratamento de doenças causadas por protozoários. A busca por estes metabólitos tem se concentrado em compostos que já evidenciaram atividade biológica antimalárica e amebicida (Chan-Bacab e Peña-Rodriguez, 2001). Kunert et al. (2008) observaram atividade antileishmania em biflavonoides isolados do gênero *Selaginella*.

Pertencem ao gênero *Selaginella* aproximadamente 750 espécies distribuídas principalmente em áreas tropicais, constituindo o único gênero das pteridófitas da Família Selaginellaceae (Kramer e Green, 1990). No Brasil são encontradas 46 espécies, sendo 16 endêmicas (Alston et al. 1981).

Já se sabe que a *Selaginella* sp contém compostos fenólicos e que os biflavonoides são considerados seus principais compostos bioativos, apresentando atividades citotóxica (Cao et al., 2010; Chen et al., 2005, Lin et al., 2000), antifúngica (Jung et al., 2006; Lee et al., 2009), antiplasmódica e leishmanicida (Kunert et al., 2008).

Selaginella sellowii Hieron., 1900 é uma espécie amplamente encontrada em países do continente americano como México, Cuba, Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Uruguai, Argentina, Paraguai e Bolívia. No Brasil, é encontrada no Pantanal brasileiro, nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, distribuindo-se também pelos estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul (Assis e Labiak, 2009). Características específicas a diferenciam das outras espécies do gênero, como a disposição espiralada dos microfilos monomorfos. São plantas de médio porte, com cerca

de 1,3 a 2 mm de comprimento por 0,6 a 0,8 mm de largura, terrícolas, com caule horizontal prostrado (Figura 2).

S. sellowii vem sendo estudada em conjunto pelos Laboratórios de Farmacognosia e Parasitologia Humana do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). A análise fitoquímica de diferentes formulações como extratos e suas frações tem sido associada às diferentes atividades biológicas, principalmente antileishmania. Queiroz (2013) investigou a atividade da fração polar proveniente da extração sequencial de *S. sellowii in vitro* contra amastigotas intracelulares e *in vivo* em hamsters infectados com *L. amazonensis*. No presente trabalho, investigamos a ação da mesma fração *in vivo* em camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *L. amazonensis*, tratados por via oral e intralesional. Além disso, propomos a utilização dos camundongos *Hairless* como modelo na LT experimental, modelo este que pode vir a ser utilizado em ensaios *in vivo* para avaliação de novos fármacos para esta parasitose.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Diante das características evidenciando camundongos mutantes sem pelos como promissores modelos para doenças de pele, o objetivo deste trabalho foi investigar camundongos *Hairless* (HRS/J) como modelos na infecção experimental induzida por *L. amazonensis*. Concomitantemente, descrever a atividade antileishmania da fração polar obtida da extração sequencial (SSHE) da pteridófito *Selaginella sellowii*, *in vivo*, em camundongos BALB/c experimentalmente infectados com a mesma espécie.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1. Em relação à investigação de camundongos *Hairless* como modelos experimentais na LT:

- Acompanhar a cinética de desenvolvimento da lesão cutânea em camundongos *Hairless* e BALB/c experimentalmente infectados com *L. amazonensis*;
- determinar a carga parasitária no sítio de inoculação, linfonodo drenante e baço em diferentes tempos após a infecção experimental de camundongos *Hairless* e BALB/c;
- realizar estudo histopatológico do sítio de inoculação (pata), linfonodo poplíteo drenante e baço dos animais mencionados acima;
- avaliar a expressão *in situ* de citocinas no sítio de inoculação dos animais.

2.2.2. Em relação ao tratamento com SSHE de camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *L. amazonensis*:

- Acompanhar a cinética de desenvolvimento da lesão cutânea em camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *L. amazonensis* e tratados intralesionalmente ou oralmente com SSHE, utilizando como controle camundongos tratados com Glucantime ou PBS;
- determinar a carga parasitária no sítio de inoculação, linfonodo drenante e baço sete dias após o término dos diferentes tratamentos;

- realizar estudo histopatológico do sítio de inoculação (pata), linfonodo poplíteo drenante e baço dos animais submetidos aos diferentes tratamentos;
- Determinar a concentração de NO produzida por macrófagos peritoneais isolados dos animais infectados e submetidos aos diferentes tratamentos.

3. Referências Bibliográficas

- Almeida, O. L. S., Santos, J. B., 2011. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 86, 497-506.
- Alston, A. H. G., Jermy, A. C. e Rankin, J.M., 1981. The genus *Selaginella* in tropical South America. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany*. 9, 233-330.
- Antoine, J. C., Prina, E., Lang, T., Courret, N., 1998. Review: the biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends in Microbiology*. 7, 10.
- Arruda, D.C., Miguel, D.C., Yasunaka-Yokoyama, J. K.U., Katzin, A.M., Uliana, S.R.B., 2009. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacology*. 63, 643-649.
- Assis, E. L. M., e Labiak, P. H., 2009. Lycophyta da borda oeste do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Acta Botânica Brasileira* 23, 703-712.
- Bates, P. A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sandflies. *International Journal for Parasitology* 37, 1097–1106.
- Benavides, F., Oberyszyn, T. M., VanBuskirk, A.M., Reeve, V.E., Kusewitt, D.F., 2009. The Hairless mouse in skin research. *Journal of Dermatological Science* 53, 10-18.
- Brasil. Ministério da Saúde, 2006. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil, 2010. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 180 p.: il. Serie A. Normas e Manuais Técnicos.
- Cao, Y., Tan, N.H., Chen, J.J., Zeng, G.Z., Ma, Y.B., Wu, Y.P., Yan, H., Yang, J., Lu, L.F., Wang, Q., 2010. Bioactive flavones and biflavones from *Selaginella moellendorffii* Hieron. *Fitoterapia* 81, 253-258.
- Costa Filho, A., V., Lucas, I.C., Sampaio, R.N.R., 2008. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41, 424-427.
- Courret, N., Fréhel, C., Gouhier, N., Pouchelet, M., Prina, E., Roux, P., Antoine, J.C., 2002. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of metacyclic promastigotes or amastigote stages of the parasites. *Journal of Cell Science*. 115, 2303-2316.

- Chan-Bacab, M.J., Peña-Rodriguez, L.M., 2001. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Products Reports* 18, 674-688.
- Chen, J.J., Duh, C.Y., Chen, J.F., 2005. New cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. *Planta Medica* 71, 659-665.
- Desjeux, P., 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95, 239-243.
- Dostálová, A., Volf, P., 2012. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors* 5, 276.
- Falu, M. A., Bustos, M. F. G., Ramoneda, C. M. P., Raspi, E. M., Cardozo, R. M., Cimino, R., Gil, J. F., Vasvari, J. L., Basombrio, M. A., 2009. Susceptibility of different mouse strains to *Leishmania amazonensis* infection. *Dermatología Argentina* 15, 334-339.
- Ferreira, L. M., Hochman, B., Barbosa, M. V. J., 2005. Experimental models in research. *Acta Cirurgica Brasileira* 20, 28-34.
- Gontijo, B., Carvalho, M. L. R., 2003. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36, 71-80.
- Gupta, S., Nishi, S., 2011. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. *Indian Journal of Medical Research* 133, 27-39.
- Hochman, B., Ferreira, L.M., Villas Bôas, F.C., Mariano, M., 2004. Experimental model in hamster (*Mesocricetus auratus*) to study heterologous graft of scars and cutaneous diseases in plastic surgery. *Acta Cirurgica Brasileira* 19, 69-78.
- Jung, H.J., Sung, W.S., Yeo, S.H., Kim, H.S., Lee, I.S., Woo, E.R., Lee, D.G., 2006. Antifungal effect of amentoflavone derived from *Selaginella tamariscina*. *Archives of Pharmacal Research* 29, 746-751.
- Killick-Kendrick, R., 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*. 4, 1-24.
- Kunert, O., Swamy, R.C., Kaiser, M., Presser, A., Buzzi, S., Rao, A.V.N.A., Schuhly, W., 2008. Antiplasmodial and leishmanicidal activity of biflavonoids from Indian *Selaginella bryopteris*. *Phytochemistry Letters* 1, 171-174.
- Lainson, R., Shaw, J.J., 1987. Evolution, classification and geographical distribution in the Leishmaniasis. In: Peters, R., Killick-Kendrick, R. (eds). *The leishmaniasis in biology and medicine. Clinical aspects and control*. London: Academic Press. pp. 11-120.
- Lee, J., Choi, Y., Woo, E.R., Lee, D.G., 2009. Isocryptomerin, a novel membrane-active antifungal compound from *Selaginella tamariscina*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379, 676-680.

Lin, L.C., Kuo, Y.C., Chou, C.J., 2000. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. *Journal of Natural Products* 63, 627-630.

Loría-Cervera, E., N., Andrade-Narváez, F. J., 2014. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 56, 1-11.

Massironi, S.M.G., Giacóia, M.R., Maiorka, P.C., Kipnis, T.L., Dagli, M.L.Z., 2005. Skin morphology of the mutant *Hairless* USP mouse. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38, 33-39.

Mato Grosso do Sul. Secretaria de Estado de Saúde. Informe epidemiológico das leishmanioses n°1/2012. Disponível em: <http://www.saude.ms.gov.br/controle/ShowFile.php?id=113329>. Acesso em 11/02/2014.

Monzote, L., 2009. Current Treatment of Leishmaniasis: a review . *The Open Antimicrobial Agents Journal*. 1, 9-19.

Moura, T.R ., Oliveira, F., Rodrigues, G.C., Carneiro, M.,W., Fukutani, K.F., Novais, F.O., Miranda, J.C., Barral-Netto, M., Brodskyn, C., Barras, A., Oliveira, C.I., 2010. Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis*. *Plos Neglected Tropical Diseases* 4, 1-9.

Murback, N. D. N., Nascimento, R. A. F., Dorval, M. E. M. C., Hans-Filho, G., Nakazato, K. R. O., 2011. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 86, 55-63.

Oliveira, C.I., Barral-Neto, M., 2005. Experimental models of infections caused by *L. amazonensis* and *L. braziliensis*. *Gazeta Médica Bahia* 75, 34-45.

Pan American Health Organization (PAHO) / World Health Organization (WHO). The Pan American Health Organization report 2014. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=40250. Acesso em 30/06/2014.

Pearson, R. D., Wilson, M. E., 1988. Host defenses against prototypical intracellular protozoans, the Leishmania. In: Walzer, P.D. & Genta, R.M. (Eds.). *Parasite infections in the compromised host. Immunological mechanisms and clinical applications*. New York: Marcel Dekker, pp. 31-81.

Peterson, A. T., Shaw, J., 2003. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *International Journal for Parasitology* 33, 919–931.

Ready, P. D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *The Annual Review of Entomology* 58, 227-250 .

Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., 2007. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* 7, 581-596.

Ribeiro-de-Jesus, A., Almeida, R. P., Lessa, H., Bacellar, O., Carvalho, E. M., 1998. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31, 143-148.

Rogers, E. M., Llg, T., Nikolaev, V. A., Ferguson, M. A. J., Bates, P. A., 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of PPG. *Nature*. 30, 463-467.

Ross, R., 1903. Further Notes on Leishmania's bodies. *British Medical Journal*. 11, 1401.

Sacks, D., Kamhawi, S., 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review Microbiology*. 55, 453-83.

Santos, B.F., 2002. Criação e manejo de camundongos. In: Andrade, A., Pinto, S.C., de Oliveira, R.S. (Orgs). *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 388 p.

Scott, P., 2005. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. *Cellular Microbiology* 7, 1707- 13.

Shaw, J.J., 1999. The relationship of sand fly ecology to the transmission of sand fly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular reference to Brazil. *Memoirs on International*. 14, 503-517.

Shaw. J.J., Lainson, R. 1987. Ecology and epidemiology: New World. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1. London: Academic Press. pp. 291-363.

Shio, M.T., Paquet, M., Martel, C., Bosschaerts, T., Stienstra, S., Olivier, M., Fortin, A., 2014. Drug delivery by tattooing to treat cutaneous leishmaniasis. *Nature Scientific Reports* 4156:, 1-7..

Silva D., 1958. Leishmaniose tegumentar queloidiana com lesões ósseas. *Anais Brasileiro de Dermatologia e Sifilografia*, 33, 3-7.

Silveira. T. F, 2009. Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Gazeta Médica da Bahia*. 79, 25-29.

Souza, A.I., Barros, E.M.S, Ishikawa, E., Ilha, I.M.N., Marin, G.R.B., Nunes, V.L.B., 2005. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 128- 41-45.

Souza, A.I., Nunes V.L.B., Borralho V.M., Ishikawa E.A.Y., 2009. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul State, Brazil: A case report. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 15, 359-365.

The Jackson Laboratory. JAX Mice Database. Disponível em: [HTTP://jaxmice.jax.org/strain/000673.html](http://jaxmice.jax.org/strain/000673.html). Acesso em: 20/08/2013.

Wadi, M., Obeid, A.F.A., Khalid, S., 2011. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis by Topical Application of Honey. *Journal of Bacteriology & Parasitology* 2, 1-5.

Wege, A. K., Florian, C., Ernst, W., Zimara, N., Schleicher, U., Hanes, F., Schmid, M., Ritter, U., 2012. *Leishmania major* infection in humanized mice induces systemic infection and provokes a nonprotective human immune response. *Plos Neglected Tropical Diseases* 6, 1-12.

Wilson, M.E.; Pearson, R.D. Immunology of leishmaniasis. In: Wyler, D.J. (Ed.). *Modern parasite biology: cellular, immunological aspects*. New York: WH Freeman, 1990. p. 200-221.

World Health Organization (WHO). The world health report 2010. <http://www.who.int/leishmaniasis>. Acesso em: 10/02/2014.

World Health Organization (WHO). The world health report 2014. <http://www.who.int/leishmaniasis>. Acesso em: 10/02/2014.

4. Manuscrito 1



Camundongos *Hairless* como modelo experimental da infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*

**Vanessa Carneiro Pereira de Araujo^a, Elisa Teruya Oshiro^a, Yasmin Silva Rizk^a,
Kyioshi Ferreira Fukutani^b, Patrik Oening Rodrigues^c, Carla Cardozo Pinto de
Arruda^a**

^aLaboratório de Parasitologia Humana, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

^bLaboratório de Imunoparasitologia, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ/BA, Salvador, Brasil.

^cLaboratório de Tecnologia Farmacêutica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

Resumo

Camundongos HRS/J, conhecidos como *Hairless*, têm sido amplamente utilizados como modelos para testar produtos que reduzem o envelhecimento da pele, danos causados pelos raios UVB e alterações cutâneas devido ao tratamento com ácidos. Devido à ausência de pelos, o que facilitaria o estudo das lesões cutâneas, e por ser um modelo novo e promissor por conta de suas características imunológicas peculiares, foi investigado seu uso como modelo na leishmaniose tegumentar experimental induzida por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. Camundongos *Hairless* foram inoculados com 10^6 formas promastigotas no coxim plantar da pata direita, acompanhando-se o curso da infecção por 30, 60 e 90 dias. Camundongos BALB/c foram infectados e utilizados como controle nos pontos de análise. Foram realizados o acompanhamento da cinética da lesão cutânea e o estudo histopatológico no sítio de infecção, bem como a avaliação da carga parasitária nas patas infectadas, linfonodos poplíteos drenantes e baços. Também foi avaliada a expressão dos genes de IL-10, IFN- γ e TNF- α , através de RT-PCR, no sítio de inoculação após 60 dias. Os camundongos *Hairless* mostraram-se suscetíveis à infecção por *L. amazonensis*, tendo sido detectado um aumento progressivo no número de parasitos, bem como na espessura das patas ao longo dos tempos avaliados. Sinais de disseminação e visceralização foram confirmados pela presença do parasito no linfonodo drenante da lesão, bem como no baço, em tempos distintos após a infecção. IL-10 foi significativamente mais expressa nos camundongos *Hairless*, corroborando com o padrão de sensibilidade. Estes resultados evidenciam esta linhagem como modelo sensível promissor para o estudo da infecção experimental induzida por *L.*

amazonensis, permitindo a utilização de outros sítios de infecção que minimizem interferências secundárias, bem como o melhor acompanhamento da lesão cutânea, como no caso de ensaios *in vivo* de potenciais fármacos para a leishmaniose tegumentar.

Palavras-chave: leishmaniose cutânea; infecção experimental; modelo murino.

Abstract

Hairless* mice as experimental model of infection induced by *Leishmania (Leishmania) amazonensis

HRS/J mice, known as Hairless mice, have been widely used as models to test products that reduce skin aging, damage caused by UVB rays, and skin changes due to acid treatments. Due to the absence of hair, which would facilitate the study of skin lesions, and because of their peculiar immunological characteristics, we investigated its use as a model in experimental cutaneous leishmaniasis induced by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Hairless mice were inoculated with 10^6 promastigotes in the right hind footpad, and followed by 30, 60 and 90 days. BALB/c mice were infected and used as controls at the same points. Kinetics of cutaneous lesion and the histopathological study were performed in the site of infection. Parasite load was determined in infected footpads, draining lymph nodes and spleens. The gene expression of IL-10, IFN- γ e TNF- α was evaluated in the site of infection by RT-PCR after 60 days. Hairless mice were found susceptible to infection by *L. amazonensis*, with a progressive parasite load associated to a progressive footpad thickness among time. Signals of visceralization were confirmed by the detection of parasites in draining lymph nodes and spleens at some points after infection. IL-10 was significantly more expressed in Hairless mice, and corroborated the susceptibility profile exhibited by the animals. The results demonstrate Hairless mice as a promising model of susceptibility for the study of experimental infection induced by *L. amazonensis*. This model would permit the use of other sites of infection that could minimize interferences such as secondary infections, and the development of cutaneous lesions, which is useful in *in vivo* tests of potential drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: cutaneous leishmaniasis; experimental infection; murine model.

1. Introdução

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), transmitidos ao homem através da picada do inseto vetor flebotomíneo (Monzote, 2009; WHO, 2010). A Leishmaniose Tegumentar (LT) apresenta um amplo espectro de manifestações, evoluindo para lesões crônicas na pele ou eventualmente a cura espontânea (Brasil, 2010). Estas manifestações clínicas da LT estão associadas às características específicas de cada hospedeiro, assim como à espécie de *Leishmania* e à resposta imunológica do indivíduo infectado (Brasil, 2010; Reithinger et al., 2007). *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é um dos agentes etiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), ocasionando lesões cutâneas associadas à Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), ou, em indivíduos anérgicos, múltiplos nódulos não ulcerativos (Leishmaniose Cutânea Difusa - LCD).

A leishmaniose cutânea murina surgiu como um modelo para o estudo do desenvolvimento e controle da resposta imunológica mediada por células, sendo a susceptibilidade a *Leishmania* geneticamente determinada entre as diferentes linhagens de camundongos (Pearson e Wilson, 1988; Wilson e Pearson, 1990). Desde então, estes modelos são importantes tanto para o estudo e compreensão da patogênese quanto para o desenvolvimento de vacinas (Oliveira e Barral-Netto, 2005).

Os camundongos conhecidos como *Hairless* pertencem à linhagem *inbred* HRS/J e apresentam perda progressiva dos pelos. Devido a esta característica, têm sido amplamente utilizados para estudar o ciclo deficiente dos pelos, bem como para testar produtos que reduzem o envelhecimento da pele, danos causados pelos raios UVB e alterações ocasionados pelo tratamento com ácidos (Benavides, 2009; Massironi et al., 2005; Perez et al, 2012). Além disso, camundongos sem pelos são excelentes para estudos de cicatrização de feridas associadas à inflamação (Benavides et al., 2009). Devido à ausência dos pelos, o que facilitaria o estudo das lesões cutâneas, poderiam vir a ser um bom modelo para o estudo da infecção induzida por espécies de *Leishmania* associadas à LT.

Diante dessas características evidenciando esta linhagem como modelo promissor para doenças de pele, o objetivo deste trabalho foi investigar camundongos *Hairless* como modelos na infecção experimental induzida por *L. amazonensis*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Foram utilizados 55 camundongos *inbred* da linhagem HRS/J, conhecidos como *Hairless*, provenientes da Universidade de São Paulo – *Campus* de Ribeirão Preto, e mantidos em cruzamento no Biotério Central do CCBS/UFMS, machos, com 4-6 semanas de idade. Os animais foram mantidos em mini-isoladores acoplados a rack ventilado, no Setor de Criação do Laboratório de Parasitologia Humana/CCBS/UFMS, em boas condições de higiene, sendo alimentados com ração comercial balanceada (Nuvilab®, Nuvital®) e hidratados com água *ad libitum*. Como controles para acompanhamento da infecção, foram utilizados 55 camundongos BALB/c, provenientes do Biotério Central do CCBS/UFMS e mantidos nas mesmas condições citadas. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS (Nº 412/2012).

2.2. Parasitos

Para o estabelecimento da infecção, foi utilizada a cepa padrão de *L. amazonensis* IFLA/BR/1967/PH8, gentilmente cedida pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ-BH). As formas parasitárias foram cultivadas a 25°C em *Schneider's Insect Medium* (Sigma) completo, suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab®) e 140 µg/mL de gentamicina (Sigma), sendo mantidas *in vivo* por meio de passagens seriadas em hamsters (*Mesocricetus auratus*) da linhagem Golden.

2.3. Infecção e acompanhamento da cinética da lesão cutânea

Camundongos de ambas linhagens foram infectados com formas promastigotas (1×10^6 /0.1 mL/PBS) de *L. amazonensis* por via subcutânea no coxim plantar do membro posterior direito, sendo distribuídos em grupos de 5 animais. A cinética da lesão cutânea foi avaliada 30, 60 e 90 dias após a infecção, por meio da aferição da espessura da pata infectada em cada ponto, com um paquímetro digital com precisão de 0,01mm (Worker®), sendo expressas como a diferença entre o tamanho da pata infectada e a média de cinco patas contralaterais não infectadas.

2.5. Avaliação da carga parasitária

Cinco animais de cada grupo experimental infectado foram eutanasiados em tempos distintos da infecção para remoção das patas, bem como dos linfonodos poplíteos drenantes e baços, a fim de estimar a carga parasitária. Após pesagem, os

órgãos foram homogeneizados em 1 mL de meio *Schneider's Insect Medium* (Sigma), suplementado com SFB (Sigma) a 20% e 140 µg/mL de gentamicina (Sigma). O ensaio de diluição limitante foi realizado conforme previamente descrito por Titus et al. (1985), em duplicata. Sob condições estéreis, a diluição foi preparada e distribuída em placas de 96 poços de microtitulação (TPP®) incubadas a 25°C. Os poços foram examinados em até 14 dias, em microscópio invertido (Motic AE20), com objetiva de 40x, para a detecção da presença de promastigotas. O título final foi a última diluição que continha apenas um parasito no poço. A carga parasitária foi calculada por meio da média geométrica dos títulos positivos obtidos para cada órgão homogeneizado, dividida pelo peso do órgão, sendo calculado então o número de parasitos por nanograma.

2.6. Estudo histopatológico

Cinco animais de cada grupo experimental foram utilizados para o estudo histopatológico das patas infectadas, linfonodos drenantes e baços. Cinco animais de cada linhagem, não infectados, foram eutanasiados paralelamente aos infectados. Os órgãos foram removidos e fixados em formalina a 10% tamponada, sendo posteriormente clivados, processados em histotécnico (Lupetec PT05), incluídos em parafina histológica e seccionados em micrótomo (Zeiss Hyrax M25) com 5 µm de espessura. Após desparafinização em estufa, os cortes foram corados por Hematoxilina-Eosina (HE) e examinados ao microscópio de luz com objetivas de 40x e 100x, sendo analisados quanto à natureza e à intensidade do infiltrado inflamatório e ao parasitismo tecidual. As fotomicrografias foram realizadas em microscópio de captura de imagens Leica modelo DM5500B.

2.7. Extração de RNA e Real Time - PCR

Aos 60 dias de infecção, animais de ambas linhagens foram eutanasiados e as patas infectadas retiradas e recolhidas em um eppendorf contendo micropérolas e solução tampão (TRIZOL®, Invitrogen), onde foram mecanicamente lisadas em MagNALyzer® (Roche Molecular Systems), de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade total de RNA extraído foi quantificada através do Nanodrop ND-1000 (Thermocientific®), sendo utilizada 1 µg para síntese de c-DNA. O c-DNA foi utilizado para detecção das citocinas por PCR em tempo real. Os níveis de expressão dos genes (INF- γ , TNF- α e IL-10) foram calculados utilizando como gene *Housekeeping* o GAPDH. A reação iniciou-se com a ativação da enzima presente no Mastermix (SYBR Green®, Invitrogen) por 10 minutos a 50°C e um minuto a 95°C. A ciclagem ocorreu com anelamento e extensão de forma sequencial,

por 15 segundos a 95°C e um minuto a 60°C, sendo repetida de 40 a 50 vezes. A análise foi calculada em triplicatas utilizando Abi Prism 7500 (Applied Biosystems, Inc., Fullerton, CA, USA); Os valores do *threshold* (C_t) foram normalizados de acordo com a amplificação do gene GAPDH determinado por $\Delta C_t = C_t$ (gene alvo) - C_t (gene GAPDH). A expressão relativa foi calculada utilizando os valores $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (alvo) - ΔC_t , em comparação aos animais não infectados (controles).

2.8. Análise estatística

Os resultados de cinética da lesão cutânea, carga parasitária e expressão dos genes das citocinas foram expressos como a média $\pm$ desvio-padrão e analisados através de ANOVA e pós-teste de Tukey quando a observação ocorreu intralinhagem (*Hairless* x *Hairless*), e teste t-Student, para interlinhagem (*Hairless* x BALB/c).

3. Resultados e Discussão

O presente estudo apresenta os primeiros resultados da utilização da linhagem murina HRS/J (*Hairless*) como modelo na leishmaniose tegumentar experimental induzida por *L. amazonensis*.

A inoculação das formas promastigotas promoveu um aumento progressivo da espessura das patas dos animais das duas linhagens estudadas. Quando avaliada a linhagem *Hairless*, o aumento foi significativo ($p < 0,001$) entre os pontos de infecção (30, 60 e 90 dias), fato também observado em camundongos BALB/c, com o mesmo nível de significância para os tempos 30 e 60 dias e 30 e 90 dias. Comparando-se as duas linhagens, observou-se que as patas dos camundongos BALB/c foram significativamente maiores nos tempos 30 ($p = 0,0311$) e 60 ($p = 0,0041$) dias; no entanto, 90 dias após a infecção, a espessura das patas dos camundongos *Hairless* foi maior ($p = 0,0116$) que a dos BALB/c (Figura 1).

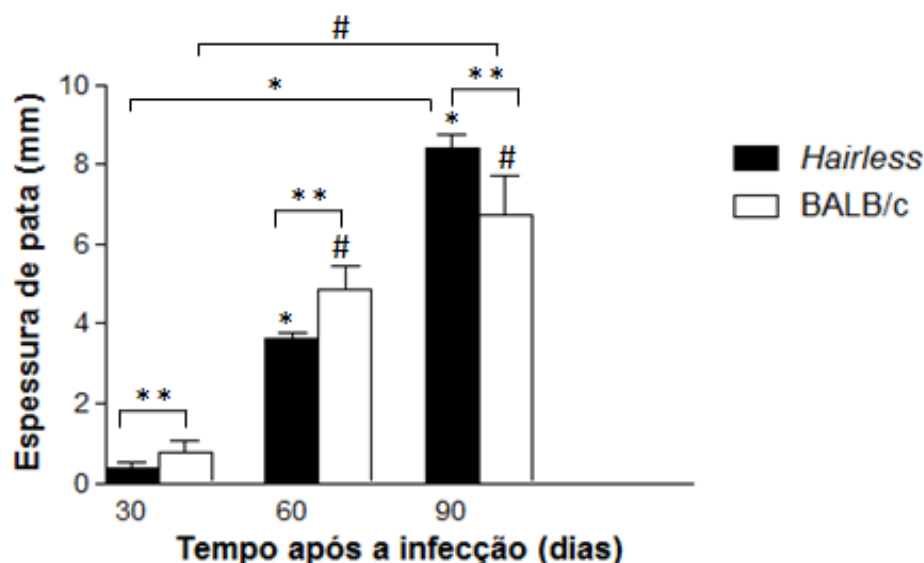


Figura 1. Cinética da lesão cutânea induzida por *L. amazonensis*. Os animais foram infectados por via s.c. no coxim plantar direito com 10^6 formas promastigotas. Os dados representam as médias $\pm$ DP de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$ para *Hairless* 30x60 dias, 30x90 dias e 60x90 dias (ANOVA seguida de pós-teste de Tukey). # $p < 0,001$ para BALB/c 30x60 dias, 30x90 dias e # $p < 0,05$ para BALB/c 60x90 dias (ANOVA seguida de pós-teste de Tukey). ** $p = 0,0311$ para *Hairless* x BALB/c aos 30 dias de infecção, ** $p = 0,0041$ *Hairless* x BALB/c aos 60 dias de infecção e ** $p = 0,0116$ para *Hairless* x BALB/c aos 90 dias de infecção (teste t de Student).

A cinética da lesão cutânea no sítio de inoculação mostrou-se semelhante à encontrada por Cupolilo et al. (2003), que inocularam três linhagens suscetíveis de camundongos com *L. amazonensis* e observaram uma lesão de aumento progressivo até os 90 dias de infecção em todas as linhagens. Em nosso estudo, os camundongos *Hairless* apresentaram maior amplitude na espessura da pata, tornando-se mais precisa a distinção entre os tempos estudados. Essa amplitude possibilitaria definir clinicamente o melhor período para uso do modelo experimental proposto em função de determinado objetivo, tornando o uso dos *Hairless* vantajoso em relação aos BALB/c. Como exemplo, a análise dos efeitos de diferentes tratamentos objetivando a regressão das lesões foi utilizada como critério clínico por Costa Filho et al. (2008).

O ensaio de diluição limitante utilizado para estimar a carga parasitária correlacionou-se à cinética da lesão no sítio de infecção. Foi observado aumento progressivo na carga parasitária nas duas linhagens estudadas. Nos animais *Hairless*, houve aumento significativo do número de parasitos entre os tempos de infecção ($p < 0,001$), o que também foi observado nos BALB/c. Aos 60 dias, o número de parasitos foi significativamente maior nas patas dos camundongos *Hairless* ($p = 0,0003$) (Tabela 1). No linfonodo poplíteo drenante da lesão, em ambas linhagens foram detectados parasitos, porém não foi verificada diferença significativa entre os tempos (Tabela 1). Também não houve diferença significativa entre as linhagens nos

diferentes tempos. No baço, foram detectados parasitos já a partir de 30 dias, apesar de em número reduzido, nas duas linhagens. Nos camundongos *Hairless*, foi verificado aumento significativo entre os tempos analisados, o que não foi verificado nos baços dos camundongos BALB/c (Tabela 1). Comparando-se as duas linhagens, não foi observada diferença significativa em nenhum tempo neste órgão. Esta detecção relevante de parasitos no baço indica a visceralização da infecção nos animais *Hairless*, fato amplamente descrito para os camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, conforme citado anteriormente.

Até o momento, o único estudo utilizando camundongos *Hairless* – albinos, de *background* genético não mencionado - na leishmaniose cutânea experimental foi realizado por Packchianian (1979), que observou como resultados preliminares lesões progressivas nos animais infectados na base da cauda por *L. tropica*, tendo sido isolados parasitos de baço, fígado, coração, rins e linfonodos após dois a oito meses de infecção.

Tabela 1. Carga parasitária e peso de órgãos em camundongos *Hairless* e BALB/c inoculados com 10^6 formas promastigotas de *L. amazonensis*, 30, 60 e 90 dias após a infecção.

Tempo após a infecção (dias)	Linhagem	Peso do órgão (g) (média ± DP)	Média do número de parasitas no órgão /ng
Pata			
30	Hairless	0,131±0,029	0,072±0,086
60		0,350±0,053	131007,4±8536,227 ^b
90		1,286±0,499	12600854±10578239,7 ^c
30	BALB/c	0,161±0,01	0,309±0,015 ^g
60		0,767±0,15	68966,4±18521,9 ^{a,h}
90		-----	-----
Linfonodo			
30	Hairless	0,029±0,010	4,672±7,135
60		0,058±0,016	0,035±0,0003
90		0,082±0,015	22,93±33,325 ^d
30	BALB/c	0,017±0,010	0,727±1,357
60		0,049±0,005	0,035±0,0360
90		-----	-----
Baço			
30	Hairless	0,141±0,019	0,0000082±0,0000072
60		0,106±0,020	0,000184±0,00012
90		0,185±0,049	0,000263±0,0000064 ^{e,f}
30	BALB/c	0,111±0,004	0,001076667±0,000872137
60		0,126±0,007	0,000119±0,000163
90		-----	-----

Os valores representam as médias ± desvio padrão (n=5).

^a p<0,0001 para 30 X 60 dias (BALB/c) (teste t de Student).

^b p<0,0001 para 30 X 60 dias (*Hairless*) (teste t de Student).

^c p<0,05 para 60 X 90 dias (*Hairless*) (teste t de Student).

^d p<0,05 para 60 X 90 dias (*Hairless*) (teste t de Student).

^e p<0,01 para 30 X 90 dias (*Hairless*) (teste t de Student).

^f p<0,01 para 60 X 90 dias (*Hairless*) (teste t de Student).

^g p=0,0005 para 30 dias (*Hairless* x BALB/c) (ANOVA seguida de pós-teste de Tukey).

^h p=0,0003 para 60 dias (*Hairless* x BALB/c) (ANOVA seguida de pós-teste de Tukey).

O estudo histopatológico correlacionou-se às características clínicas de espessura das patas, onde os animais mostraram parasitismo desde o primeiro ponto de infecção, intensificando-se nos tempos subsequentes e demonstrando a grande susceptibilidade das duas linhagens à infecção por *L. amazonensis*. Aos 30 dias de infecção, as patas dos camundongos *Hairless* apresentavam lesão superficial, já sendo observados parasitos. Em relação ao infiltrado inflamatório, foi observada resposta predominantemente macrofágica, com alguns linfócitos e plasmócitos. À medida em que a infecção evoluiu (60 dias), novos tecidos foram atingidos e o parasitismo se intensificou (Figura 2). Aos 90 dias, observou-se descontinuidade da epiderme, dando origem a uma úlcera típica. Esta lesão ulcerada provavelmente favoreceu a entrada de micro-organismos oportunistas, o que pode justificar a presença de neutrófilos no local. Na lesão, visualizava-se intensa necrose difusa, o que macroscopicamente imprimiu aspecto de crosta nas patas dos animais infectados. Neste ponto, visualizavam-se microscopicamente inúmeros macrófagos densamente parasitados. Ainda foi possível observar-se dissociação entre as fibras colágenas associada ao extravasamento do líquido intersticial característico de edema. A natureza do infiltrado inflamatório não sofreu alteração, tornando-se apenas mais intenso. Não se verificou nenhuma alteração nos linfonodos dos camundongos *Hairless* após 30 dias de infecção. Já aos 60 dias, foram observadas formas parasitárias. Aos 90 dias de infecção, grande parte do arcabouço tecidual tradicional havia sido substituído por intensa infiltração de macrófagos parasitados. Não foram observadas alterações nos baços dos animais infectados durante o experimento.

Nos camundongos BALB/c, resultados semelhantes foram encontrados. Aos 30 dias de infecção, as patas dos animais apresentavam discreta lesão, com a presença de células parasitadas e discreto infiltrado inflamatório. Aos 60 dias, a lesão havia se expandido e aos 90 dias de infecção, toda estrutura da pata já estava comprometida, observando-se severo infiltrado inflamatório constituído majoritariamente por macrófagos densamente parasitados (Figura 2). No linfonodo poplíteo, aos 30 dias o parasitismo era discreto, com raras células parasitadas abaixo da cápsula, na região cortical. Aos 60 e 90 dias, já eram visualizados parasitos na região medular com maior intensidade no último tempo de observação. Não foram observados parasitos no baço. Resultados semelhantes foram descritos em camundongos BALB/c por Abreu-Silva et

al. (2004), Cupolilo et al. (2003), e Falu et al. (2009). Este quadro é compatível com o encontrado na forma difusa da doença, causada por *L. amazonensis* em hospedeiros humanos.

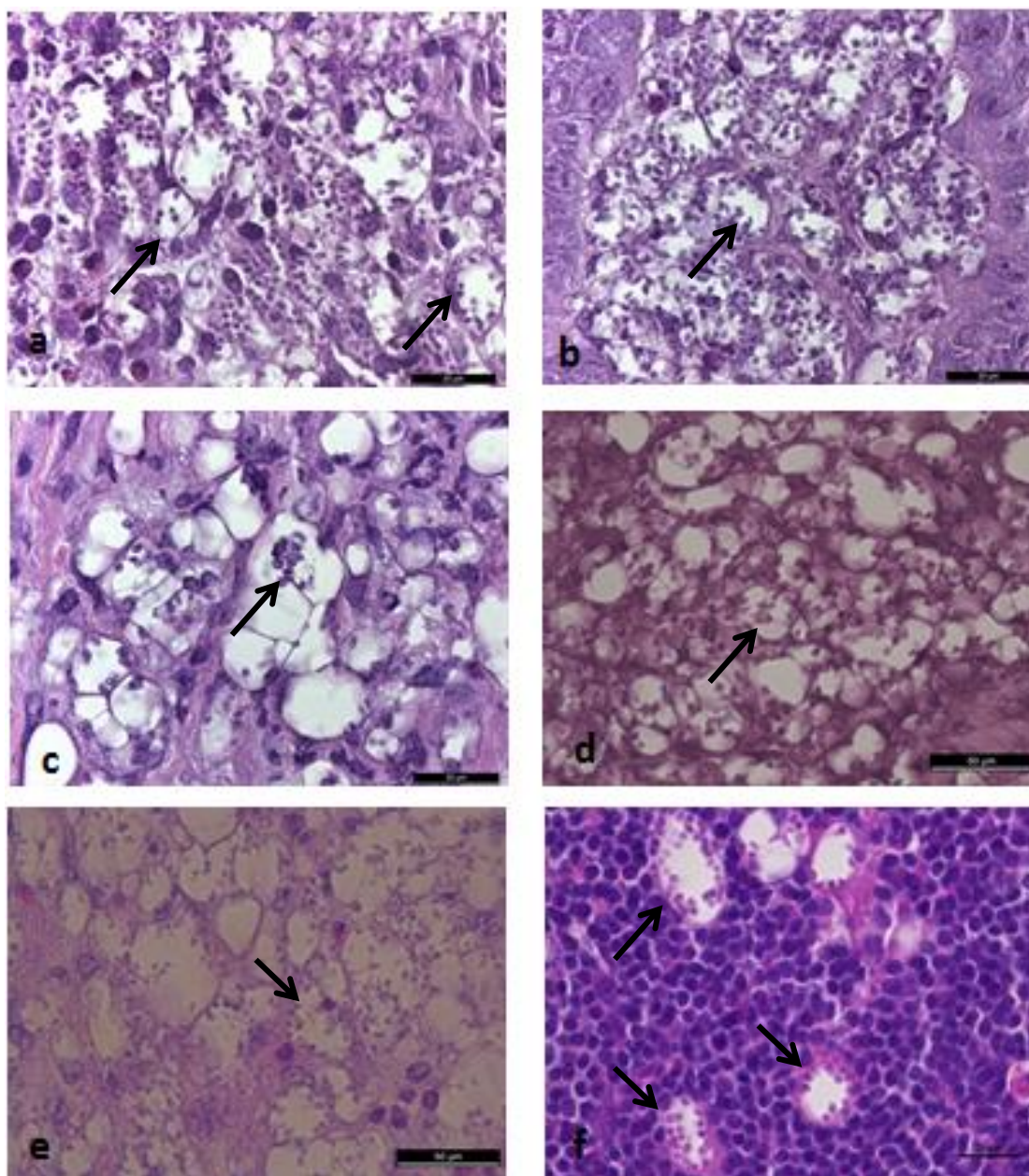


Figura 2. Análise histopatológica do sítio de infecção e do linfonodo poplíteo em camundongos *Hairless* e BALB/c infectados no coxim plantar direito com 10^6 formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os fragmentos da pata foram obtidos 60 (a,b) e 90 (c, d) dias após a infecção nas linhagens estudadas: *Hairless* (a, c) e BALB/c (b, d). Observa-se uma grande número de macrófagos vacuolizados, contendo inúmeras formas amastigotas no seu interior (setas) na região da derme compacta da pele. Nos linfonodos poplíteos observa-se grande número de parasitos aos 90 dias nos camundongos *Hairless* (e) e BALB/c (f). A figura é representativa de cinco animais analisados em cada grupo. Coloração HE; aumento de 1000x. Barra de 50μm. Foto tirada por Vanessa Carneiro.

Analisando-se o perfil de citocinas expressas no sítio de infecção, foi observada uma expressão significativamente maior do gene IL-10 ($p=0,00181$) nos camundongos *Hairless* (Figura 3). Originalmente descrita como inibidora da ativação de células T-helper e da produção de citocinas de padrão Th1 (Fiorentino et al., 1989), IL-10 é expressa por vários tipos celulares, como macrófagos, células dendríticas, células B e várias subpopulações de células, como Th2, T regulatórias (Tregs) e células NK (Moore et al., 2001). Desta forma, esta citocina está classicamente associada ao perfil Th2, que na leishmaniose está relacionado a um padrão de sensibilidade, com dificuldade em controlar a infecção (Nylen e Sacks, 2007). Padigel et al. (2003), utilizando camundongos BALB/c nocautes para IL-10, observaram redução da carga parasitária e da lesão cutânea destes animais, infectados com *L. amazonensis*, comparados aos selvagens. Os animais nocautes também apresentaram maior produção de NO e IFN- γ , demonstrando maior resistência à infecção.

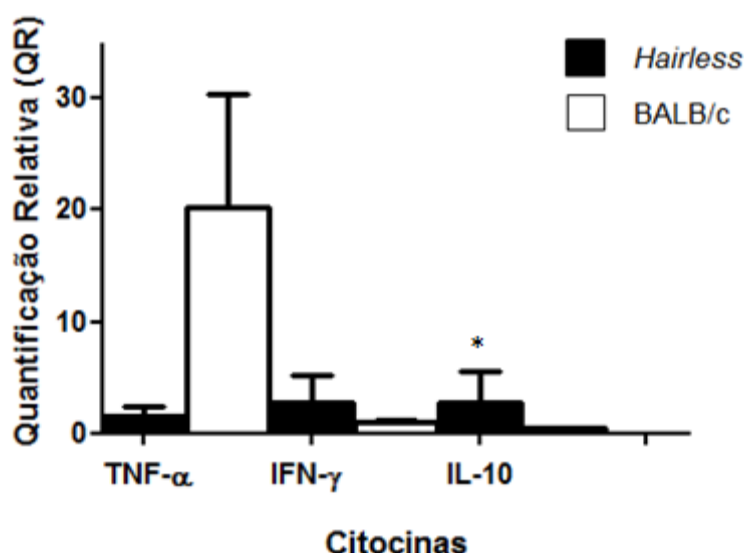


Figura 3. Expressão de IFN- γ , TNF- α e IL-10 nos sítios de infecção em camundongos *Hairless* e BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Os animais foram inoculados por via s.c. no coxim plantar esquerdo com 10^6 formas promastigotas e avaliados 60 dias após a infecção. Os dados representam as médias $\pm$ DP de 3 animais por grupo. * $p=0,00181$ para *Hairless* x BALB/c. Teste t de Student.

A progressão da LT está associada à sobrevivência intracelular dos parasitos e à desativação do macrófago (Moura et al., 2005; Fiorentino et al., 1991). Em camundongos suscetíveis a *Leishmania* sp, observa-se o aumento de macrófagos parasitados com a evolução progressiva da lesão. Já em animais resistentes, verifica-se, com a evolução da lesão, o aumento do número de linfócitos e a redução do

número de macrófagos parasitados, sendo que o infiltrado inflamatório torna-se escasso com a resolução da lesão (Andrade et al., 1984; Souza et al., 2000). Sabe-se que camundongos *Hairless* homozigóticos para a mutação *hr* possuem cerca de 30% a mais de macrófagos (Suzu et al., 2000; The Jackson Laboratories, 2014), o que poderia estar contribuindo para o padrão de sensibilidade demonstrado por estes animais, inclusive por estas células constituírem-se fonte de IL-10. Além disso, camundongos *Hairless* apresentam imunodeficiência leve, associada à anormalidades nas células-T (Morrisey et al., 1980; Rezke-Kunz et al., 1979).

Na infecção experimental por *L. amazonensis*, torna-se difícil a associação entre resistência e susceptibilidade com a predominância de respostas Th1 e Th2, observando-se diferentes graus de susceptibilidade entre as linhagens (Abreu-Silva et al., 2004; Diaz et al., 2003; Torrentera et al., 2002). Em camundongos *inbred*, são observados vários padrões de doença, ao contrário do que ocorre durante a infecção com *L. major*. Acredita-se que a inabilidade em estimular uma resposta Th1 adequada seja responsável pela cronicidade das lesões induzidas pelos parasitos do complexo *L. mexicana*, incluindo *L. amazonensis* (McMahon-Pratt e Alexander, 2004). O papel preciso da resposta do tipo Th2 ainda permanece inconclusivo, com informações aparentemente contraditórias, principalmente com relação à produção de IL-4 (Alexander et al., 1999; Brombacher, 2000). Alguns estudos sugerem que o padrão de não-cura está associado à falha na produção ou resposta à IL-12 (Carrera et al., 1996; Guler et al., 1996; Jones et al., 2000; Kropf et al., 1997). Nos perfis de suscetibilidade, estudos indicam que logo após a infecção há uma ausência na produção de IFN- γ , o que permite a multiplicação do parasito e, posteriormente, inicia-se a produção do mesmo na tentativa de controle da infecção. No entanto, a produção exacerbada de IFN- γ e TNF- α , que também atua no controle da infecção, pode ser prejudicial, causando lesão tecidual, ou seja, as mesmas citocinas importantes para a morte do parasita também podem estar envolvidas na patogenia da LT (Loría-Cervera e Andrade-Narváez, 2014).

Modelos experimentais para a LT são importantes tanto para o estudo e entendimento da patogênese da doença, quanto para o desenvolvimento de vacinas eficientes (Oliveira e Barral-Netto, 2005). São úteis para o estudo da indução e evolução da infecção, da progressão da lesão e possível visceralização, assim como para a quantificação da carga parasitária no sítio de inoculação e em outros órgãos acometidos pela doença. O local mais frequentemente utilizado para indução da infecção frequentemente tem sido a pata (Sacks e Melby, 1998), com experiências bem-sucedidas também na orelha (Carter et al., 2009; Khouri et al., 2010; Moura et al., 2010; Silva et al., 2011; Tavares et al. 2011; Wege et al., 2012). No modelo *Hairless*, a

ausência de pelos permitiria o acompanhamento do desenvolvimento da lesão também em outros sítios, além do estudo de peculiaridades imunológicas desta linhagem, que poderiam vir a descortinar importantes vertentes da interação entre parasito e hospedeiro.

4. Conclusões

O presente estudo demonstrou a susceptibilidade dos camundongos *Hairless* à infecção por *L. amazonensis*, com lesões progressivas no sítio de inoculação. Sinais de disseminação e visceralização foram confirmados pelo encontro do parasita no linfonodo drenante da lesão e no baço e a expressão de citocinas no sítio de infecção corroborou o perfil de sensibilidade dos animais. O estudo da resposta imunológica na leishmaniose experimental é importante para ampliar o conhecimento dos mecanismos envolvidos na resistência ou susceptibilidade a diferentes espécies de *Leishmania*, fornecendo dados para esclarecimento dos fatores responsáveis pelas diferentes formas clínicas da doença e amplo espectro de respostas imunológicas possíveis, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de vacinas e tratamentos mais efetivos contra a doença.

5. Agradecimentos

Ao suporte financeiro recebido da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Dra. Camila Indiani de Oliveira e Dr. Kiyoshi Ferreira Fukutani (CPqGM – FIOCRUZ/BA) pela disponibilização do Laboratório de Imunoparasitologia para realização da análise de expressão de citocinas. À Dra. Gláucia Denise Kommers (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria) e ao Dr. Ricardo Antônio Amaral de Lemos (Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul), pelo precioso auxílio na análise histopatológica.

6. Referências

- Alexander, J., Satoskar, A.R., Russell, D.G., 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science* 112, 2993–3002.
- Abreu-Silva, A.L., Calabrese, K.S., Cupolilo, S.M., Cardoso, F.O., Souza, C.S., Gonçalves da Costa, S.C., 2004. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Veterinary Parasitology* 121, 179–187.
- Andrade, Z.A., Reed, S.G., Roters, S.B., Sadigurisk, M., 1984. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Pathology* 114, 137–48.
- Benavides, F., Oberyshyn, T. M., VanBuskirk, A.M., Reeve, V.E., Kusewitt, D.F., 2009. The Hairless mouse in skin research. *Journal of Dermatology Science* 53, 10–18.
- Brasil, 2010. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 180 p.: il. Serie A. Normas e Manuais Técnicos.
- Brombacher, F., 2000. The role of interleukin-13 in infectious diseases and allergy. *BioEssays* 22, 646–656.
- Carrera, L., Ricardo, T.G., Badolato, R., Hieny, S., Miller, W., Kühn, Sacks, D., 1996. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *Journal of Experimental Medicine* 183, 515–526.
- Carter, C.R., Whitcomb, J.P., Campbell, J.A., Mukbel, R.M., McDowell, M.A., 2009. Complement receptor 3 deficiency influences lesion progression during *Leishmania major* infection in BALB/c Mice. *Infection and Immunity* 77, 5668–5675.
- Costa Filho, A. V.; Lucas, I.C.; Sampaio, R.N.R., 2008. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41, 424–427.
- Cupolilo, S.M., Souza, C.S., Abreu-Silva, A.L., Calabrese, K.S., Gonçalves da Costa, S.C., 2003. Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. *Histology and Histopathology* 18, 1059–1065.
- Diaz, N.L., Fernandez, M., Figueira, E., Ramirez, R., Monsalve, I.B., Tapia, F.J., 2003. Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Clinical Experimental Dermatology* 28, 288–293.

- Falú, M. A., Bustos, M. F. G., Ramoneda, C.M.P., Raspi, E. M., Cardozo, R. M., Cimino, R., Gil, J. F., Vasvari, J. L., Basombrio, M. A., 2009. Susceptibility of different mouse strains to *Leishmania amazonensis* infection. *Dermatología Argentina* 15, 334-339.
- Fiorentino, D.F., Bond, M.W., Mosmann, T.R., 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of Experimental Medicine* 170, 2081-95.
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A., 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *The Journal of Immunology* 147, 3815-22.
- Guler, M.L., Gorham, J.D., Hsieh, C.S., Mackey, A.J., Steen, R.G., Dietrich, W.F., Murphy, K.M., 1996. Genetic susceptibility to *Leishmania*: IL-12 responsiveness in Th1 cell development. *Science* 271, 984-987.
- Jones, D.E., Buxbaum, L.U., Scott, P., 2000. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *Journal of Immunology* 165, 364-372.
- Khoury, R., Novais, F., Santana, G., Oliveira, C.I., Santos, M.A.V., Barral, A., Barral-Netto, M., Weyenbergh, J.V., 2010. DETC Induces *Leishmania* parasite killing in human *in vitro* and murine *in vivo* models: a promising therapeutic alternative in Leishmaniasis. *PLOS One* 5, 1-9.
- Kropf, P., Etges, R., Schopf, L., Chung, C., Sypek, J., Muller, I., 1997. Characterization of T cell mediated responses in nonhealing and healing *Leishmania major* infections in the absence of endogenous IL-4. *Journal of Immunology* 159, 3434-3443.
- Loría-cervera, E., N., Andrade-Narváez, F. J., 2014. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 56, 1-11.
- Massironi, S.M.G., Giacóia, M.R., Maiorka, P.C., Kipnis, T.L., Dagli, M.L.Z., 2005. Skin morphology of the mutant Hairless USP mouse. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38, 33-39.
- McMahon-Pratt, D., Alexander, J., 2004. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunology Reviews* 201, 206-224.
- Monzote, L., 2009. Current Treatment of Leishmaniasis: a review. *The Open Antimicrobial Agents Journal* 1, 9-19.
- Moore, K.W., Malefyt, R.W., Coffman, R.L., O'Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* 19, 683-765.

Morrissey, P.J., Parkinson, D.R., Schwartz, R.S., Waksal, S.D., 1980. Immunologic abnormalities in HRS/J mice. I. Specific deficit in T lymphocyte helper function in a mutant mouse. *Journal of Immunology* 125, 1558-1562.

Moura, T.R., Oliveira, F., Rodrigues, G.C., Carneiro, M., W., Fukutani, K.F., Novais, F.O., Miranda, J.C., Barral-Netto, M., Brodskyn, C., Barras, A., Oliveira, C.I., 2010. Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis*. *Plos Neglected Tropical Diseases* 4, 1-9.

Moura, T.R., Novais, F.O., Oliveira, F., Clarêncio, J., Noronha, A., Barral, A., Brodskyn, C., Oliveira, C.I., 2005. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity* 73, 5827–5834.

Nylen, S., Sacks, D., 2007. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends in Immunology*. 28, 378-84.

Oliveira, C.I., Barral-Neto, M., 2005. Experimental models of infections caused by *L. amazonensis* and *L. braziliensis*. *Gazeta Med. Bahia* 75, 34-45.

Packchanian, A., 1979. Experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania tropica* in albino Hairless mice, *Mus musculus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 73, 31-6.

Padigel, U.M., Alexander, J., Farrel, J.P., 2003. The role of Interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *Journal of Immunology*. 171, 3705-3710.

Pearson, R. D., Wilson, M. E., 1988. Host defenses against prototypical intracellular protozoans, the Leishmania. In: Walzer, P.D. & Genta, R.M. (Eds.). *Parasite infections in the compromised host. Immunological mechanisms and clinical applications*. New York: Marcel Dekker, pp. 31-81.

Perez, C., Parker-Thomburg, J., Mikulec, C., Kusewitt, D.F., Fischer, S.M., DiGiovanni, J., Conti, C.J., Benavides, F., 2012. SKHIN/Spr, a new genetically defined inbred hairless mouse strain for UV-induced skin carcinogenesis studies. *Experimental Dermatology*. 21, 1-10.

Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., 2007. Cutaneous Leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*. 7, 581-596.

Rezke-Kunz A.B, Scheid M.P, Boyse E.A., 1979. Disproportion in T-cell subpopulations in immunodeficient mutant hr/hr mice. *Journal of Experimental Medicine* 149, 228–233.

Sacks, D.L., Melby P.C., 1998. Animal models for the analysis of immune response to leishmaniasis. *Current Protocols in Immunology* 19, 119-220.

Silva, R.A.A., Tavares, M.N., Costa, D., Pitombo, M., Barbosa, L., Kiyoshi, F., Miranda, J.C., Oliveira, C.I., Valenzuela, J.G., Barral, A., Soto, M., Barral-Netto, M., Brodskyn,

C., 2011. DNA vaccination with KMP11 and *Lutzomyia longipalpis* salivary protein protects hamsters against visceral leishmaniasis. *Acta Tropica*. 120, 185-190.

Souza, V.L., Souza, J.A., Silva, T.M.C., Veras, P.S.T., 2000. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes and Infection*. 2, 1807-1815.

Suzu, S., Tanaka-Douzono, M., Nomaguchi, K., Yamada, M., Hayasawa, H., Kimura, F., Motoyoshi K., 2000. P56 (dok-2) as a cytokine-inducible inhibitor of cell proliferation and signal transduction. *EMBO Journal* 19, 5114-5122.

The Jackson Laboratory. JAX Mice Database. Disponível em: <http://www.informatics.jax.org/reference/J:150402>. Acesso em: 10/06/2014.

Titus, R.G., Marchand, M., Boon, T., Louis, J.A., 1985. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunology* 7, 545-555.

Torrentera, F.A., Lambot, M.A., Laman, J.D., Meurs, M.V., Kiss, R., Noel, J.C., Carlier, Y., 2002. Parasitic load and histopathology of cutaneous lesions, lymph node, spleen, and liver from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66, 273-279.

Wege, A. K., Florian, C., Ernst, W., Zimara, N., Schleicher, U., Hanses, F., Schmid, M., Ritter, U., 2012. *Leishmania major* infection in humanized mice induces systemic infection and provokes a nonprotective human immune response. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 6, 1-12.

Wilson, M.E.; Pearson, R.D. 1990. Immunology of leishmaniasis. In: Wyler, D.J. (Ed.). *Modern parasite biology: cellular, immunological aspects*. New York: WH Freeman. p. 200-221.

World Health Organization (WHO). The World health report 2010. <http://www.who.int/leishmaniasis>. Acesso em: 10/02/2014.

5. Manuscrito 2

**Atividade *in vivo* da fração polar da extração sequencial de *Selaginella sellowii*
em camundongos BALB/c experimentalmente infectados com
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

**Vanessa Carneiro Pereira de Araujo^a, Yasmin Silva Rizk^a, Elisa Teruya Oshiro^a,
Patrik Oening Rodrigues^b, Carlos Alexandre Carollo^c, Mônica Toffoli Kadri^c, Carla
Cardozo Pinto de Arruda^a**

^aLaboratório de Parasitologia Humana, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

^b Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

^cLaboratório de Farmacognosia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

^dLaboratório de Biofisiofarmacologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

Resumo

Os medicamentos disponíveis para as leishmanioses apresentam vários problemas relacionados à toxicidade e ao desenvolvimento de resistência pelos parasitos, tornando-se essencial a procura por agentes terapêuticos alternativos. Extratos de origem vegetal com baixa toxicidade têm sido testados na leishmaniose experimental e resultados promissores têm sido obtidos, permitindo formas alternativas de administração. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antileishmania da fração polar obtida da extração sequencial da pteridófito *Selaginella sellowii* (SSHE) *in vivo*, em camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *Leishmania amazonensis*. A cinética da lesão cutânea e a supressão da carga parasitária no sítio de infecção, linfonodo drenante e baço foram avaliados após tratamento com SSHE administrado por via intralesional (50 mg/kg/dia × 5) ou oral (50 mg/Kg/dia x 20). Animais controle receberam PBS pelas mesmas vias ou antimoniato de N-Metilglucamina (Sb, 28 mg/Kg/dia x 5 por via intralesional e 28 mg/Kg/dia x 20 por via oral). Foi observada supressão de 99,99% da carga parasitária no sítio de infecção uma semana após o término do tratamento com SSHE pelas vias intralesional e oral, resultado estatisticamente semelhante ao obtido após o tratamento com Sb por via intralesional, mas não oral. Nos linfonodos drenantes da lesão, também foi observada supressão da carga parasitária após o tratamento com SSHE. No baço, ocorreu supressão de 93,84% após o tratamento com SSHE por via intralesional, comparada

com 84,61% de supressão induzida pelo antimoniato. Os achados histopatológicos corroboraram a redução do parasitismo nos grupos tratados com a fração polar por via oral e intralesional, sendo evidenciado um intenso infiltrado inflamatório no sítio de infecção dos animais tratados com SSHE por via intralesional. Os resultados sugerem que SSHE tem efeito inibidor sobre a carga parasitária quando administrado pelas vias intralesional e oral, com efeito semelhante à droga padrão, o antimoniato de N-Metilglucamina, administrado por via intralesional.

Palavras-chave: atividade antileishmania; ensaios *in vivo*; extratos vegetais.

Abstract: *In vivo* activity of polar fraction from sequential extraction of *Selaginella sellowii* in BALB/c mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Therapeutic options available for the treatment of leishmaniasis present several problems related to toxicity and development of resistance by the parasites, making it essential the search of alternative therapeutic agents. Plant extracts have been tested in experimental leishmaniasis with promising results and low toxicity, allowing alternative forms of administration. The aim of this study was to evaluate the antileishmanial activity of polar fraction from *Selaginella sellowii* (SSHE) *in vivo* in BALB/c mice experimentally infected with *Leishmania amazonensis*. The kinetics of cutaneous lesions and parasite load at the site of infection, spleen and draining lymph nodes were assessed after treatment with SSHE via intralesional injection (50 mg/Kg/Day × 5) or oral administration (50 mg/kg/Day x 20). Control animals received PBS by the same routes or N-Methylglucamine antimonate (Sb, 28 mg/ Kg/Day x 5 via intralesional, and 28 mg/Kg/ Day x 20 orally). A suppression of 99.99% of the parasite load was observed at the site of infection one week after the end of treatment with SSHE by intralesional and oral routes. This result was statistically similar to that obtained after treatment with Sb by intralesional route. In draining lymph nodes, the suppression of parasite load was also observed after treatment with SSHE. In the spleen, 93.84% suppression occurred after treatment with SSHE via intralesional vs. 84.61% suppression induced by the antimonate. Histopathological findings corroborate the parasitism reduction in the groups treated i.l. or orally by the polar fraction, and an intense inflammatory infiltrate was observed in the site of infection in the animals treated with SSHE by intralesional route. The results suggest that the polar fraction from *S. sellowii* has an inhibitory effect on the parasite load when administered by oral and intralesional routes, a similar effect obtained with the standard drug, N-Methylglucamine antimonite, when administered by intralesional route.

Keywords: antileishmanial activity; *in vivo* test; plant extracts

1. Introdução

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por parasitos do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) e transmitida ao homem através da picada do inseto vetor flebotomíneo (Oliveira e Barral-Neto, 2005). Representam um grande problema de saúde pública devido ao seu amplo espectro clínico e sua diversidade epidemiológica (Brasil, 2010). Estima-se uma incidência mundial de dois milhões de casos e 700 mil mortes por ano, com cerca de 350 milhões expostas ao risco de infecção (WHO, 2013).

Este grupo de doenças está associado a diferentes formas clínicas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), existem quatro formas clínicas principais da doença: a forma cutânea ou tegumentar, caracterizada por úlceras na pele, apresentando cura espontânea após alguns meses; a forma cutânea difusa, evidenciada por lesões cutâneas crônicas de forma disseminada; a mucocutânea, que atinge e pode destruir as mucosas da região nasobucofaringea e, por fim, a forma visceral, também conhecida por calazar (WHO, 2014).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma infecção de grande magnitude, podendo afetar psicologicamente o indivíduo acometido e levar a deformidades na face. A doença se caracteriza inicialmente pela formação de pápulas eritematosas, únicas ou numerosas, na região exposta à picada do vetor. As lesões em geral tornam-se úlceras com bordas elevadas e fundo necrótico, cobertas ou não por exsudato purulento. O envolvimento de mucosas como a nasal, o palato, a laringe e as cordas vocais podem ocorrer em cinco por cento dos casos (Berman, 1997).

O tratamento atualmente utilizado para cura das leishmanioses não é considerado satisfatório, apresentando vários problemas relacionados à toxicidade e ao desenvolvimento de resistência pelos parasitos, bem como ao alto custo (Santos et al., 2008). Os antimoniais pentavalentes são em geral os fármacos utilizados no Brasil, em formulações como o antimoniato de N-Metilglucamina. Quando estes medicamentos não são efetivos ou não podem ser prescritos, indica-se o uso da anfotericina B, pentamidina ou paramomicina (Alviano et al., 2012). Entretanto, uma vez que todas estas drogas estão associadas a efeitos colaterais, torna-se essencial a procura por agentes terapêuticos alternativos.

Vários produtos de origem vegetal têm sido testados na leishmaniose experimental e resultados promissores têm sido obtidos na busca por extratos brutos, óleos essenciais e outros compostos com atividade antileishmania (Fournet e Muñoz, 2002; Alviano et al., 2012). Diferentes metabólitos secundários com grande variedade estrutural têm mostrado atividade associada a baixa toxicidade e permitindo outras

formas de administração, como derivados de hidroquinonas, naftoquinonas, terpenoides, flavonoides, alcaloides e lignanas (Fournet e Muñoz, 2002; Polonio e Efferth, 2008).

O gênero *Selaginella* engloba cerca de 750 espécies distribuídas principalmente em áreas tropicais, constituindo o único gênero das pteridófitas da Família Selaginellaceae (Kramer e Green, 1990). *Selaginella* sp contém compostos fenólicos e os biflavonoides são considerados seus principais compostos bioativos, apresentando atividades citotóxica (Cao et al., 2010; Chen et al., 2005, Lin et al., 2000), antifúngica (Jung et al., 2006; Lee et al., 2009), antiplasmodica e leishmanicida (Kunert et al., 2008). *S. sellowii* é uma espécie terrícola encontrada em vários países da América Central e do Sul, ocorrendo com frequência no Pantanal brasileiro (Assis e Labiak, 2009).

Este trabalho descreve a atividade antileishmania da fração polar obtida pela extração sequencial da pteridófita *Selaginella sellowii in vivo*, em camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *Leishmania amazonensis*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Como modelo experimental de infecção por *L. amazonensis* foram utilizados camundongos BALB/c, machos, com idade de 4 a 6 semanas, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Os animais foram mantidos em mini-isoladores acoplados a rack ventilado, no Setor de Criação do Laboratório de Parasitologia Humana/CCBS/UFMS, em boas condições de higiene e livres de infecções ou parasitoses comuns aos roedores, sendo alimentados com ração balanceada (Nuvilab®, Nuvital®) e hidratados com água *ad libitum*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS (Parecer N°412/2012).

2.2. Material vegetal

Exemplares da espécie *Selaginella sellowii* (Selaginellales: Selaginellaceae), foram coletados em junho de 2009 na região do Passo do Lontra, Corumbá, MS. As plantas foram identificadas pelo Prof. Dr. Arnildo Pott, referência em taxonomia botânica, do Laboratório de Botânica/CCBS/UFMS, e as exsiccatas foram depositadas no Herbário CG/UFMS sob o registro 27218 (licença CGen/MMA nº 010273/2013-1). O

extrato bruto foi obtido usando todas as partes da planta seca em estufa circuladora de ar a 40° C e pulverizada. A extração foi realizada em extrator de fluido pressurizado Dionex, modelo ASE 150, equipado com um cartucho de extração de 100 mL. O material (66g) foi inicialmente extraído com diclorometano para remover os compostos apolares; posteriormente, foi extraído com solução de acetato de etila:metanol (8:2) e finalmente com etanol:água (7:3), obtendo-se o extrato (SSHE), constituído pela fração polar. Estes passos foram repetidos três vezes para a completa extração e os ciclos foram concentrados em rotaevaporador, obtendo-se um rendimento de 8.89% (p/p).

2.3. Parasitos

Para o estabelecimento da infecção, foi utilizada uma cepa padrão de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), do Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ). As formas parasitárias foram cultivadas a 25°C em *Schneider's Insect Medium* (Sigma) completo, suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cultilab) e 140 µg/mL de gentamicina (Sigma), sendo mantidas *in vivo* através de passagens seriadas em hamsters (*Mesocricetus auratus*) da linhagem Golden.

2.4. Infecção e tratamento

O protocolo utilizado para tratar os animais foi adaptado de Fournet et al. (1996) e Patrício et al. (2008). A dose de extrato (50 mg/Kg) foi baseada em Queiroz (2013), que utilizou o mesmo extrato com sucesso no tratamento de hamsters infectados com *L. amazonensis*. De forma geral, 90 camundongos foram infectados por via subcutânea no coxim plantar das patas direitas posteriores com 1×10^6 formas promastigotas de *L. amazonensis*. O tratamento com SSHE foi iniciado 28 dias após a infecção (p.i.), quando esta estava bem estabelecida. Nesta ocasião, os animais foram distribuídos em seis grupos de acordo com a via de administração (oral e intralesional) e o tipo de tratamento, recebendo, respectivamente, o extrato de *S. sellowii* dissolvido em PBS (SSHE), antimoníaco de N-metilglucamina (Glucantime®, Sanofi-Aventis) (Sb), ou apenas solução tampão fosfato (PBS). Os grupos tratados por via intralesional receberam, no sítio de infecção, cinco injeções de SSHE (50mg/kg em 0,05 mL de PBS), PBS (0,05 mL) ou Sb (28mg/kg), com intervalo de quatro dias. Os grupos submetidos ao tratamento oral receberam por meio de gavagem, diariamente durante 20 dias, 0,2 mL de SSHE (50mg/kg/dia em PBS), Sb (28mg/kg/dia) ou PBS.

2.5. Avaliação do tratamento

A cinética da lesão cutânea foi avaliada semanalmente após o início do tratamento, através da aferição da espessura da pata com um paquímetro com precisão de 0,01mm (Worker®), sendo expressas como a diferença entre o tamanho da pata infectada e a média de cinco patas não infectadas. Uma semana após o término do tratamento, os animais foram eutanasiados e necropsiados para retirada dos órgãos a serem analisados.

A carga parasitária foi avaliada no sítio de inoculação, linfonodos drenantes e baços de cinco animais de cada grupo. Os órgãos foram removidos, pesados, e em seguida homogeneizados em 1 mL de meio *Schneider's Insect Medium* (Sigma), suplementado com soro fetal bovino (Sigma) a 20% e 140 µg/mL de gentamicina (Sigma). O ensaio de diluição limitante foi realizado conforme previamente descrito por Titus et al. (1985), em duplicata, com os órgãos de cinco animais. Sob condições estéreis, a diluição foi preparada e distribuída em placas de 96 poços de microtitulação (TPP®), sendo incubadas a 25°C. Os poços foram examinados em até 14 dias, em microscópio invertido (Motic AE20), com objetiva de 40x, para detectar a presença de promastigotas. O título final foi a última diluição que continha apenas um parasito no poço. A carga parasitária foi calculada através da média geométrica recíproca dos títulos positivos obtidos para cada órgão homogeneizado, dividida pelo peso do órgão, sendo calculado então o número de parasitos por nanograma.

O índice de supressão (IS) dos parasitos foi calculado pela seguinte fórmula:

$$IS = \frac{\text{Média do número de parasitos nos (ou peso de) animais tratados} \times 100}{\text{Média do número de parasitos nos (ou peso de) animais não tratados}} - 100$$

2.6. Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

Foi avaliada a produção de NO pelas células peritoneais dos camundongos infectados e tratados conforme descrito anteriormente. Sete dias após o final dos tratamentos, as células foram coletadas, quantificadas e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com L-glutamina 2 mM (Sigma), soro fetal bovino a 10% (Gibco) e 140 µg/mL de gentamicina (Sigma) em concentração de $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$. 1000 µL desta suspensão foram adicionados a cavidades de placas de 24 poços e incubados por 48 horas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após a incubação, 50µL do sobrenadantes foram recolhidos e incubados a um volume igual de reagente de Griess (sulfanilamida 1%/naftiletilenodiamina em ácido fosfórico 5%) durante 10 min à temperatura ambiente para quantificar a acumulação de nitrito (Ding et al., 1988). A absorbância foi determinada a 540 nm. A conversão de absorbância para µM de NO₂⁻

foi realizada por meio da comparação das amostras com uma curva padrão obtida com concentrações conhecidas (1-10 μ M) de nitrito de sódio diluído em meio RPMI.

2.7. Análise Histopatológica

As patas infectadas que receberam os diferentes tratamentos foram removidas e fixadas em formalina a 10% tamponada, sendo posteriormente clivadas, processadas em histotécnico (Lupetec PT05), incluídas em parafina histológica e seccionadas em micrótomo (Zeiss Hyrax M25) com 5 μ m de espessura. Após desparafinização em estufa, os cortes foram corados por Hematoxilina-Eosina (HE) e examinados ao microscópio de luz com objetivas de 40x e 100x, sendo analisados quanto à natureza e à intensidade do infiltrado inflamatório e ao parasitismo tecidual. As fotomicrografias foram realizadas em microscópio de captura de imagens (Leica, modelo DM5500B).

2.8. Análise estatística

Os resultados de espessura da pata, carga parasitária e dosagem de NO foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão de cinco animais por grupo. A avaliação estatística foi realizada por Teste t-Student ou ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

3. Resultados

3.1. Cinética da Lesão

Observou-se um aumento progressivo nas espessuras das patas até uma semana após o término do tratamento oral em todos os grupos experimentais (Figura 1 e 2). Na primeira semana de avaliação, os animais do grupo tratado oralmente com SSHE evidenciaram patas estatisticamente maiores em relação aos animais não tratados, enquanto os grupos tratados com Sb apresentavam espessuras estatisticamente similares às do grupo não tratado. Nas semanas subsequentes, não houve diferença significativa entre os grupos nos diferentes tratamentos por via oral. As espessuras das patas dos animais tratados com SSHE foram significativamente maiores uma semana após o tratamento, em comparação com a semana anterior ($p=0,0169$).

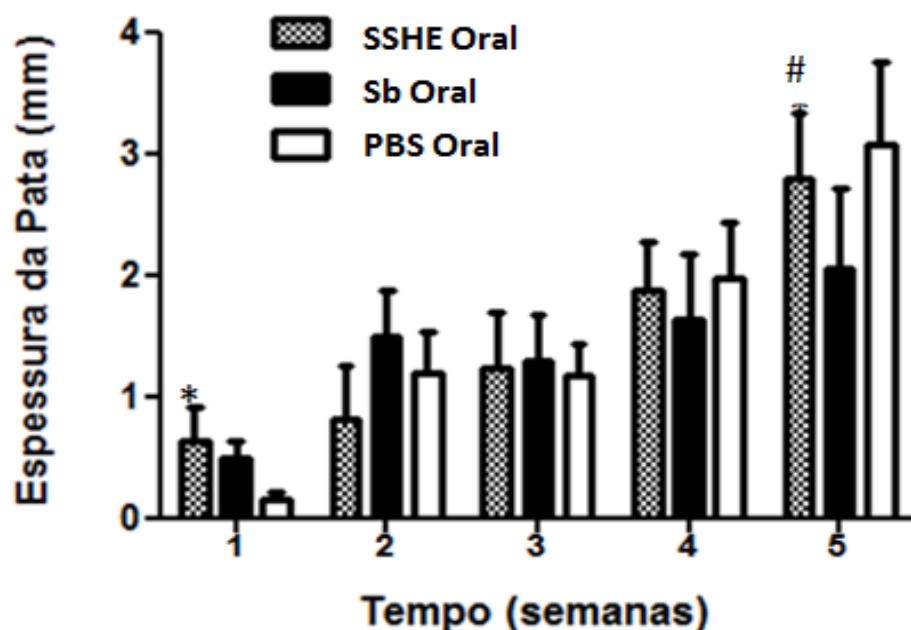


Figura 1. Cinética da lesão induzida por *L. amazonensis* após tratamento com SSHE administrado por via oral (50mg/kg/dia durante 20 dias). Grupos controles receberam PBS ou antimonio de N-Metilglucamina (Sb) pela mesma via. Os animais foram infectados no coxim plantar direito com 1×10^6 formas promastigotas de *L. amazonensis* e os tratamentos iniciados quatro semanas após a infecção. A semana 5 refere-se à análise uma semana após o término dos tratamentos. Os dados representam as médias $\pm$ DP de cinco animais por grupo. * $p < 0,05$ para animais tratados com SSHE versus controle (PBS). ANOVA/Tukey. # $p < 0,05$ para diferença entre a 4ª e 5ª semanas em animais tratados com SSHE. Teste t-Student.



Figura 2. Lesão cutânea observada durante a terceira semana de tratamento com SSHE administrado por via oral (50mg/kg/dia durante 20 dias). Grupos controles receberam PBS ou antimonio de N-Metilglucamina (Sb) pela mesma via. Os animais foram infectados no coxim plantar direito com 1×10^6 formas promastigotas de *L. amazonensis* e os tratamentos iniciados quatro semanas após a infecção.

Quando tratados por via intralesional (Figura 4), já na segunda semana, o grupo que recebeu SSHE apresentou patas estatisticamente maiores em relação ao grupo não tratado ($p<0,05$) (Figura 3). Na quinta semana (uma semana após o término dos tratamentos), as patas tratadas com SSHE apresentavam espessuras significativamente maiores que as tratadas com Sb ($p<0,001$). Neste mesmo ponto, as patas tratadas com Sb apresentavam espessuras significativamente menores que as do grupo não tratado ($p<0,001$). Quando realizada a análise entre a última semana de tratamento e uma semana após o fim do tratamento, o grupo que recebeu Sb por via i.l. apresentou espessuras significativamente menores ($p=0,0151$).

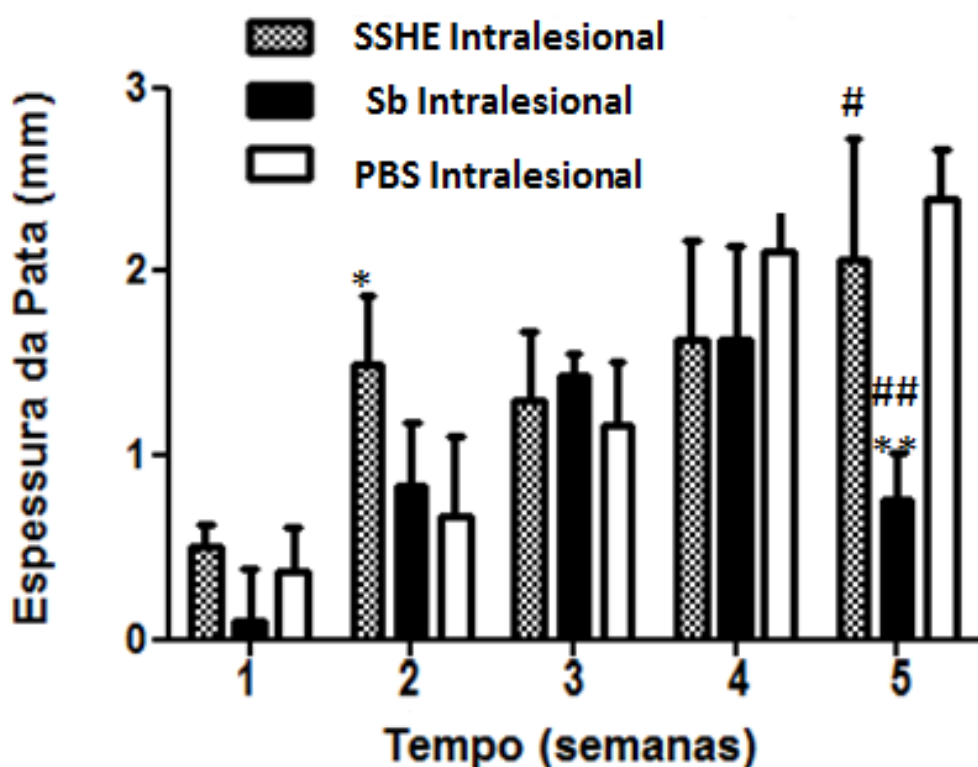


Figura 3. Cinética da lesão induzida por *L. amazonensis* durante quatro semanas de tratamento com SSHE administrado por via intralesional (cinco injeções de 50mg/kg com intervalos de quatro dias). Grupos controles receberam PBS ou antimoníato de N-Metilglucamina (Sb) pela mesma via. Os animais foram infectados no coxim plantar direito com 1×10^6 formas promastigotas de *L. amazonensis* e os tratamentos iniciados quatro semanas após a infecção. A semana 5 refere-se à análise uma semana após o término dos tratamentos. Os dados representam as médias $\pm$ DP de cinco animais por grupo. * $p<0,05$ para animais tratados com SSHE versus controle (PBS). ** $p<0,001$ para animais tratados com Sb versus controle (PBS). # $p<0,001$ para animais tratados com SSHE versus Sb. ## $p<0,05$ para diferença entre a 4^a e 5^a semanas em animais tratados com Sb. Teste t-Student.



Figura 4. Lesão cutânea observada durante a terceira semana de tratamento com SSHE administrado por via oral (50mg/kg/dia durante 20 dias). Grupos controles receberam PBS ou antimoníato de N-Metilglucamina (Sb) pela mesma via. Os animais foram infectados no coxim plantar direito com 1×10^6 formas promastigotas de *L. amazonensis* e os tratamentos iniciados quatro semanas após a infecção.

3.2. Carga Parasitária

Por via intralesional, SSHE suprimiu em 99,9995% a carga parasitária no sítio de infecção, mesmo resultado alcançado através do tratamento com Sb, sendo as duas reduções estatisticamente significativas ($p < 0,001$) em relação ao grupo tratado com PBS. Por via oral, SSHE também reduziu a carga parasitária de forma estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com PBS ($p < 0,05$), com supressão de 99,9999% do número de parasitos. Já o grupo tratado com Sb suprimiu em apenas 18,66% a carga parasitária, porém sem diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não tratado (Tabela 1).

O segundo órgão analisado foi o linfonodo poplíteo, diretamente relacionado ao sítio de infecção. Por via intralesional, o número de parasitos detectados nos linfonodos nos animais tratados com SSHE foi inferior ao do grupo não tratado, com supressão de 95,34%. Sb reduziu ainda mais a carga parasitária no linfonodo, com supressão de 99,76%. Por via oral, não houve diferença significativa entre o número de parasitos dos diferentes grupos.

Com relação ao baço, no grupo tratado com SSHE por via i.l., foi observada redução significativa ($p < 0,001$) do número de parasitos, mesmo resultado observado no grupo tratado com Sb. Por via oral, não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de parasitos após os três tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do tratamento com a fração polar de *Selaginella sellowii* (SSHE, 50 mg/kg) administrados por via intralesional ou oral em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.

Tratamentos (dosagem)	Via de administração	Peso do órgão (g)(média ± DP)	% Supressão do órgão (peso)	% Supressão da carga parasitária	Média do número de parasitos/ng órgão
Pata					
Controle (PBS)	Intralesional	0,48±0,13	-	-	110.735,25 ±23.088,4
SSHE (50mg/Kg/5 dias)	Intralesional	0,77±0,13	+60,42	-99,99995	0,05±0,015**
Antimoniato de N-Metilglucamina (28mg/kg)	Intralesional	0,20±0,06	-58,33	-99,99991	0,093±0,070 [#]
Controle (PBS)	Oral	0,39±0,12	-	-	140219,5±45642,7
SSHE (50mg/Kg por 5 dias)	Oral	0,39±0,11	0	-99,99999	0,013±0,004*
Antimoniato de N-Metilglucamina (28mg/kg)	Oral	0,56±0,21	+43,59	-18,66	114050±70196
Linfonodo					
Controle (PBS)	Intralesional	0,06±0,01	-	-	0,43±1,70
SSHE (50mg/Kg/5 dias)	Intralesional	0,05±0,01	-16,66	-95,34	0,02±0,02
Antimoniato de N-Metilglucamina (28mg/kg)	Intralesional	0,04±0,01	-33,33	-99,76	0,001±0,0002
Controle (PBS)	Oral	0,04±0,02	-	-	0,04±0,05
SSHE (50mg/Kg/ 5 dias)	Oral	0,04±0,01	0	+35,89	0,05±0,04
Antimoniato de N-Metilglucamina (28mg/kg)	Oral	0,06±0,02	+50	-17,94	0,03±0,03
Baço					
Controle (PBS)	Intralesional	0,15±0,02	-	-	0,00026±0,0005
SSHE (50mg/Kg/5 dias)	Intralesional	0,18±0,034	+20	-93,84	0,000016±0,000011 ^{##}
Antimoniato de N-Metilglucamina (28mg/kg)	Intralesional	0,12±0,01	-20	-84,61	0,00004±0,00002 ^{*#}
Controle (PBS)	Oral	0,12±0,01	-	-	0,00013±0,0001
SSHE (50mg/Kg/ 5 dias)	Oral	0,15±0,02	+25	+1053	0,0015±0,0017
Antimoniato de N-Metilglucamina (28mg/kg)	Oral	0,15±0,02	+25	+161	0,00034±0,00007

Os valores representam as médias e ± desvio padrão (n=5).

* p < 0.05 para animais tratados com SSHE versus controle (PBS) (ANOVA/Tukey).

** p < 0.001 para animais tratados com SSHE versus controle (PBS) (ANOVA/Tukey).

p < 0.001 para animais tratados com Sb versus controle(PBS) (ANOVA/Tukey).

p < 0.001 para animais tratados com SSHE versus controle (PBS) (ANOVA/Tukey).

*# p < 0.001 para animais tratados com Sb versus controle(PBS) (ANOVA/Tukey).

3.3. Produção de NO

As células peritoneais isoladas dos animais tratados com SSHE por via intralesional produziram maiores níveis de NO em relação a dos animais tratados com Sb e principalmente com PBS, no entanto a diferença não pode ser considerada estatisticamente significativa. Após o tratamento por via oral, também não houve diferença significativa na produção de NO entre os grupos (Figura 3).

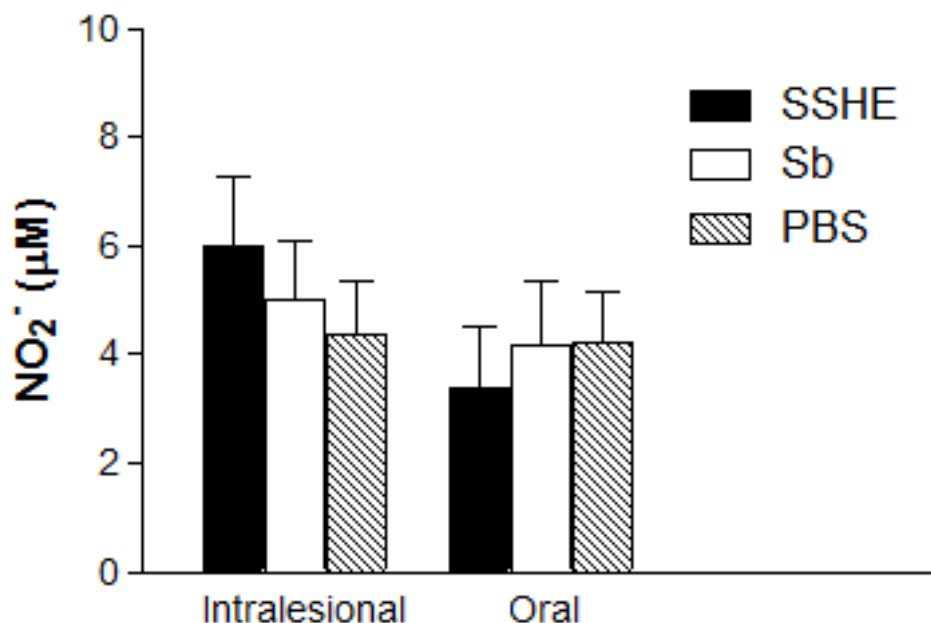


Figura 3. Efeito dos tratamentos intralesional e oral com SSHE (50mg/kg) sobre a produção de NO pelas células peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Antimoniato de N-Metilglucamina (Sb) e PBS foram usados como controles. Os dados representam a média $\pm$ DP de 5 animais por grupo.

3.4. Análise Histopatológica

O estudo histopatológico das patas infectadas com *L. amazonensis* e tratadas com SSHE por via intralesional evidenciou menor intensidade de infecção, com células portando raras formas amastigotas. Já no grupo que recebeu apenas PBS, foram observados inúmeros macrófagos densamente parasitados (Figura 4). Resultado semelhante foi encontrado nos animais submetidos ao mesmo tratamento por via oral. O tratamento com SSHE por via i.l. induziu um intenso infiltrado inflamatório composto por células mononucleares e granulócitos. O grupo controle (PBS) apresentou infiltrado inflamatório de natureza similar. Nos animais tratados com Sb por via intralesional, não foram observadas células parasitadas na derme; por via oral, entretanto, vários macrófagos densamente parasitados foram observados na região dérmica (Figura 4).

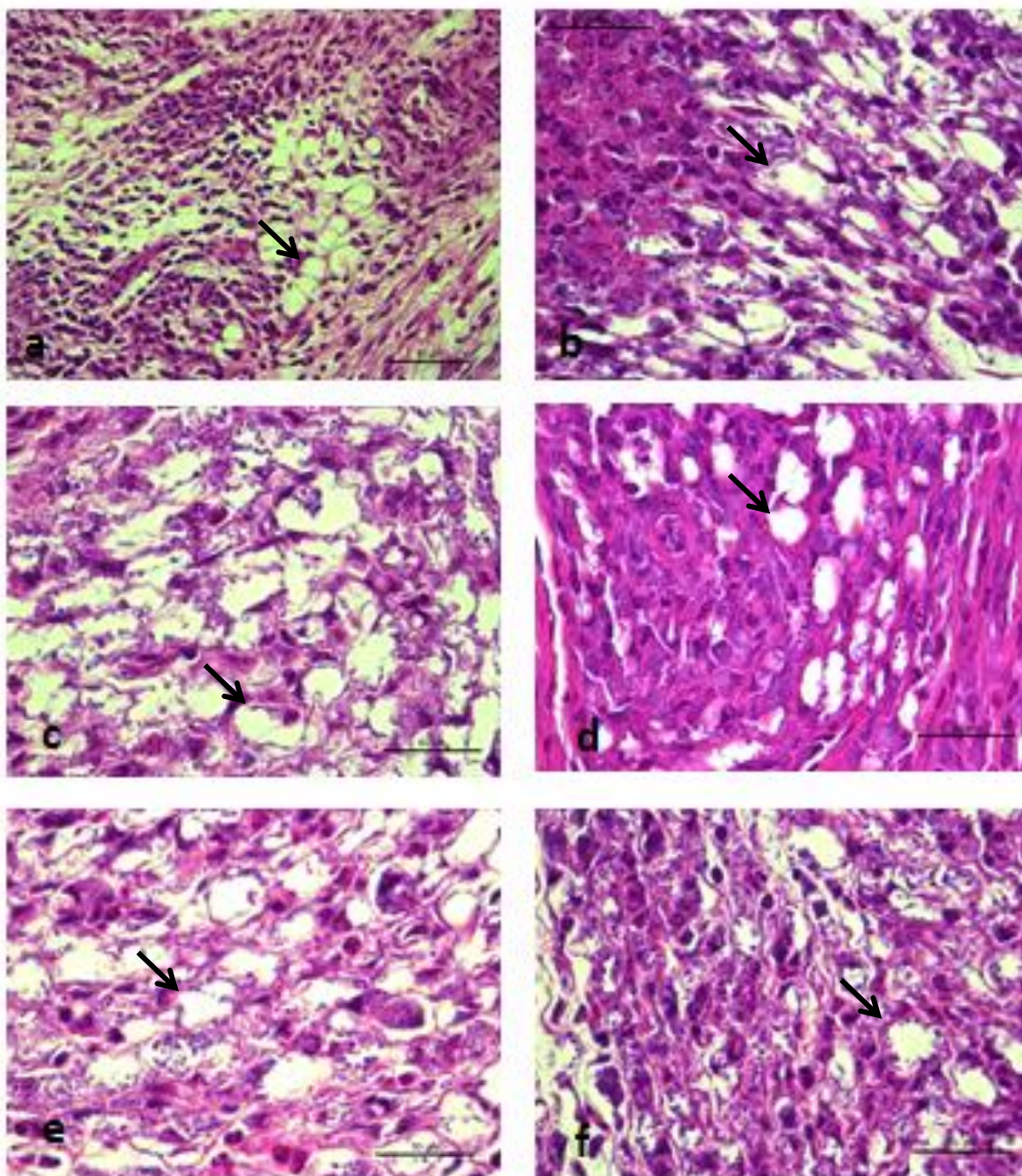


Figura 4. Análise histopatológica do sítio de infecção em camundongos infectados no coxim plantar direito com formas promastigotas de *L. amazonensis* e tratados com SSHE (50mg/kg) por via intralesional (a) e oral (b). Observam-se macrófagos vacuolizados com poucas formas amastigotas. Os fragmentos foram obtidos sete dias após o término do tratamento. Animais tratados com N-metilglucamina por via intralesional mostram tecido pouco parasitado (c); por via oral, vários macrófagos densamente infectados são observados (d). O grupo controle recebeu PBS pelas mesmas vias, intralesional (e) e oral (f). Observa-se um infiltrado mononuclear na derme, composto principalmente por macrófagos densamente parasitados e vacuolizados na região da derme compacta. A figura é representativa de cinco animais

analisados em cada grupo. Coloração HE; aumento de 400x e 1000x. Barra de 50µm. Foto tirada por Vanessa Carneiro.

4. Discussão

No presente trabalho, foi observada ação inibidora do extrato contendo a fração polar de *S. sellowii* sobre a carga parasitária detectada no sítio de infecção, quando administrada pelas vias intralesional e oral em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Os efeitos do extrato por via intralesional foram semelhantes aos obtidos após o tratamento com a droga de referência, no sítio de infecção e linfonos drenantes. Conforme demonstrado por Queiroz (2013), o perfil cromatográfico deste extrato sugere a presença de biflavonoides glicosilados ou agliconas polares, que estariam associados à sua ação antileishmania. A autora demonstrou a atividade do mesmo extrato, *in vitro* e *in vivo*, quando administrado por via intralesional e oral a hamsters experimentalmente infectados com *L. amazonensis*.

Acredita-se que os biflavonoides presentes em alguns extratos vegetais sejam responsáveis pela ação antileishmania. Kunert et al. (2008) observaram atividade antileishmania nos biflavonoides presentes na espécie *Selaginella bryopteris*. Sharma et al. (2003) observaram atividade antileishmania na fração F062 obtida do extrato N-butanólico de *Tephrosia purpurea* em hamsters infectados com *Leishmania donovani* tratados com 50mg/kg x 5 dias por via oral.

O tratamento intralesional com SSHE, apesar de reduzir a carga parasitária, não foi capaz de reduzir a lesão cutânea, traduzida pela espessura da pata. Isto pode ter ocorrido devido à reação inflamatória induzida, no local, pelo extrato. Esta reação foi confirmada pelo estudo histopatológico, que demonstrou a presença de infiltrado inflamatório intenso associado às células que, apesar de vacuolizadas, exibiam parasitismo muito inferior ao grupo não tratado.

Propriedades imunomodulatórias têm sido descritas em vários compostos fenólicos como flavonoides e alcaloides de várias espécies vegetais (Rudi, 1993). Os compostos fenólicos contêm grupamentos hidroxila, os quais podem afetar a enzima ou o sistema transportador de elétrons, resultando em propriedades imunomoduladoras, especialmente a atividade fagocitária (Manosroi et al., 2003). A ativação dos macrófagos parasitados é necessária para a destruição dos parasitos intracelulares, processo envolvido na cura das diversas formas de leishmaniose (Murray e Nathan, 1999; Wilson et al., 2005). No presente trabalho, a avaliação da produção de NO pelas células peritoneais foi considerada inconclusiva por não ser significativa, embora tenha sido maior nas células tratadas com SSHE. O aumento da produção de NO em relação às células de animais não tratados poderia contribuir como mecanismo de destruição intracelular dos parasitos.

Gupta et al. (1992), avaliando modelos experimentais para leishmaniose visceral, verificou que praticamente nenhum esquema de tratamento pode fornecer informações para que se compreenda a eficácia total de uma droga com potencial leishmanicida, uma vez que o efeito total da mesma depende da interação entre os parasitos e o sistema imunológico do hospedeiro. De fato, está bem documentado que a cura de animais desta infecção ocorre devido ao efeito combinado da ação da droga e do estado imunológico (Murray et al., 1993).

Várias espécies têm sido utilizadas como modelos experimentais nos ensaios *in vivo* de novos compostos com potencial atividade antileishmania, como os camundongos BALB/c e os hamsters da linhagem Golden (*M. auratus*) (Gupta e Nishi, 2011). O objetivo da utilização do modelo animal é encontrar uma droga que possa ser administrada oralmente, que seja efetiva em curto espaço de tempo (menos de dez dias) e que não tenha indicação de toxicidade nas maiores doses testadas (100mg/kg) (Gupta e Nishi, 2011). A administração oral tem a vantagem de reduzir dificuldades socioeconômicas relacionadas ao tratamento, que estão presentes em áreas onde a doença é endêmica e o acesso ao serviço de saúde é precário (Fournet et al., 1996).

No presente trabalho, a formulação oral de SSHE foi eficiente em suprimir a carga parasitária no sítio de infecção, o que não ocorreu com a droga de referência, o antimonial pentavalente, que tradicionalmente é descrito como não apresentando atividade quando administrado por esta via (Patrício et al., 2008).

O fármaco miltefosine é a primeira droga aprovada para o tratamento da leishmaniose por via oral, com resultados bem-sucedidos em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos com leishmaniose visceral (Sundar et al., 2002). Dados clínicos, porém, revelam uma redução na sua eficácia e aumento de recidivas na Índia (Sundar e Murray, 2005), fato associado à resistência dos parasitos. Além disso, estudos têm demonstrado baixa atividade sobre espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, incluindo *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. mexicana* (Yardley et al., 2005), desencorajando o uso deste medicamento nas Américas (Ameen, 2007). Por outro lado, a eficácia sobre a infecção por *L. infantum* têm sido observada em animais, necessitando ainda de validação (Le Fichoux et al., 1998). Desta forma, o estudo de formulações orais de novos compostos com potencial atividade antileishmania deve ser estimulado.

5. Conclusões

Os resultados sugerem que o extrato contendo a fração polar de *S. sellowii* tem efeito inibidor sobre a carga parasitária detectada no sítio de infecção quando administrado pelas vias intralesional e oral em camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *L. amazonensis*, com efeito estatisticamente semelhante à droga padrão, o antimoniato de N-Metilglucamina.

6. Agradecimentos

Ao suporte financeiro recebido da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Além disso, gostaríamos de agradecer à Dra. Gláucia Denise Kommers (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria), ao Dr. Ricardo Antônio Amaral de Lemos (Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul) e à Dra. Doroty Mesquita Dourado da Universidade Anhanguera-UNIDERP pelo precioso auxílio na análise histopatológica.

6. Referências

- Alviano, S.D., Barreto, A.L.S., Dias, F.A., Rodrigues, I.A., Rosa, M.S.S., Alviano, S.C., Soares, R.M.A., 2012. Conventional therapy and promising plant-derived compounds against trypanosomatid parasites. *Frontiers in Microbiology*. 3, 1-10.
- Ameen, M., 2007. Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 8, 2689-2699.
- Assis, E.L.M., Labiak, P.H., 2009. Lycophyta da borda oeste do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 23, 703-712.
- Berman, J.D., 1997. Human Leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the Last 10 Years. *Clinical Infectious Diseases*. 24, 684-703.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010. 2. ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 180 p.: il. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- Cao, Y., Tan, N.H., Chen, J.J., Zeng, G.Z., Ma, Y.B., Wu, Y.P., Yan, H., Yang, J., Lu, L.F., Wang, Q., 2010. Bioactive flavones and biflavones from *Selaginella moellendorffii* Hieron. *Fitoterapia* 81, 253-258.
- Chen, J.J., Duh, C.Y., Chen, J.F., 2005. New cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. *Planta Medica* 71, 659-665.

- Ding, A.H.; Nathan, C.F.; Stuer, D.J., 1998. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *The Journal of Immunology*. 141, 2407-2412.
- Fournet, A., Ferreira, M.E, Arias, A.R., Ortiz, S.T., Fuentes, S., Nakayama, H., Schinini, A., Hocquemiller, R., 1996. *In vivo* efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 40, 2447-2451.
- Fournet, A., Munoz, V., 2002. Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2, 1215-1237.
- Gupta, S., Nishi., S., 2011. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug Discovery. *Indian Journal of Medical Research* . 133, 27-39.
- Gupta, S., Zehra, K., Nigam, V., Katiyar, J.C., 1992. Antileishmanial drug testing: Appraisal on existing techniques. *Indian Journal Parasitology*. 16, 1-7.
- Jung, H.J., Sung, W.S., Yeo, S.H., Kim, H.S., Lee, I.S., Woo, E.R., Lee, D.G., 2006. Antifungal effect of amentoflavone derived from *Selaginella tamariscina*. *Archives of Pharmacal Research* 29, 746-751.
- Kunert, O., Swamy, R.C., Kaiser, M., Presser, A., Buzzi, S., Rao, A.V.N.A., Schuhly, W., 2008. Antiplasmodial and leishmanicidal activity of biflavonoids from Indian *Selaginella bryopteris*. *Phytochemistry Letters* 1, 171-174.
- Kramer, K.U.; Green, P.S., 1990. Pteridophytes and gymnosperms. In: Kramer, K.U., Green, P.S. (Eds), *The families and genera of vascular plants*. Springer-Verlag, Berlin, v.1, p. 40.
- Le Fichoux, Y., Rousseau, D., Ferrua, B., Ruetten, S., Lelièvre, A., Grousseau, D., Kubar, J., 1998. Short- and long-term efficacy of hexadecylphosphocholine against established *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 42, 654-8.
- Lee, J., Choi, Y., Woo, E.R., Lee, D.G., 2009. Isocryptomerin, a novel membrane-active antifungal compound from *Selaginella tamariscina*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379, 676-680.
- Lin, L.C., Kuo, Y.C., Chou, C.J., 2000. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. *Journal of Natural Products* 63, 627-630.
- Manosroi, A., Saraphanchotiwithaya, A., Monosroi, J., 2003. Immunomodulatory activities of *Clausena excavate* Burm. F. wood extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 155-180.

- Murray, H.W., Hariprasad, Richard, E.F., 1993. Treatment of experimental visceral leishmaniasis in a 'T' cell-deficient host: response to amphotericin B and pentamidine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, 486-490.
- Murray, H.W., Nathan, C.F., 1999. Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *Journal of Experimental Medicine* 189, 741-746.
- Oliveira, C.I., Barral-Neto, M., 2005. Experimental models of infections caused by *L. amazonensis* and *L. braziliensis*. *Gazeta Médica da Bahia* 75, 34-45.
- Patrício, F.J, Costa, G.C., Pereira, P.V.S, Filho, W.C.A., Sousa, S.M., Frazão, J.B., Pereira, W.S., Maciel, M.C.G., Silva, L.A., Amaral, F.M.M., Rêbello, J.M.M., Guerra, R.N.M., Ribeiro, M.N.S., Nascimento, F.R.F., 2008. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. *Journal of Ethnopharmacology*. 115, 313-319.
- Polonio, T., Efferth, T., 2008. Leishmaniasis: drug resistance and natural products (Review). *Internacional Journal of Molecular Medicine*. 22, 277-286.
- Queiroz, D.P.S., 2013. Atividade *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroetanólico de *Selaginella sellowii* Hieron. sobre *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande-MS.
- Rudi, P.L., 1993. Immunomodulatory compounds. In: Steven, M., Russel, J.M. (Eds.), *Biactive Natural Products: Detection, Isolation and Structure Determination*. CRC Press, London, pp. 279-317.
- Santos, D.O., Coutinho, C.E.R., Madeira, M.F., Bottino, c.g., Vieira, R.T., Nascimento, S.B., Bernardino, A., Bourguignon, S.C., Corte-Real, S., Pinho, R.T., Rodrigues, C.R., Castro, H.C., 2008. Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. *Parasitology Research*. 103, 1-10.
- Sharma, P., Rastori, S., Bahatnager, S., Srivastava, J.K., Dube, A., Guru, P.Y., Kulshreshtha, D.H., Dhawan, B.N., 2003. Antileishmanial action of a plant *Tephrosia purpurea* against experimental visceral leishmaniasis. *Drug Development Research* 60, 285-293.
- Sundar, S., Murray, H.W., 2005. Availability of miltefosine for the treatment of Kala-Azar in India. *Bulletin of World Health Organ* 83, 394–395.
- Sundar, S., Jha, T.K., Thakur, C.P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., Junge, K., Bryceson, A., Berman, J., 2002. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N. The New England Journal of Medicine*. 347, 1739-46.
- Titus, R.G., Marchand, M., Boon, T., Louis, J.A., 1985. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Paras. Immunol*. 7, 545-555.

World Health Organization (WHO). The World health report 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 19/08/2013.

Wilson, M.E., Jeronimo, S.M.B., Pearson, R.D., 2005. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial Pathogenesis*. 38, 147-160.

Yardley, V., Croft, S.L., De Doncker, S., Dujardin, J.C., Koirala, S., Rijal, S., Miranda, C., Llanos-Cuentas, A., Chappuis, F., 2005. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 73, 272-275.

World Health Organization (WHO). The world health report 2013. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis>. Acesso em: 11/07/2014.

World Health Organization (WHO). The world health report 2014. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis>. Acesso em: 10/02/2014.