



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

VANESSA INGRID CARDOSO PEREIRA

**AÇÃO DE BIOBRODUTOS SOBRE O PROTOZOÁRIO *Leishmania (l.)*
amazonensis E A CÉLULA HOSPEDEIRA**

Orientador(a): Edilene Oliveira da Silva

Belém-Pará
2017

VANESSA INGRID CARDOSO PEREIRA

AÇÃO DE BIOBRODUTOS SOBRE O PROTOZOÁRIO *Leishmania (l.) amazonensis* E A CÉLULA HOSPEDEIRA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador(a): Edilene Oliveira da Silva

BELÉM-PARÁ

2017

VANESSA INGRID CARDOSO PEREIRA

AÇÃO DE BIOBRODUTOS SOBRE O PROTOZOÁRIO *Leishmania (l.) amazonensis* E A CÉLULA HOSPEDEIRA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a): Prof^a Dr^a Edilene Oliveira da Silva– ICB – UFPA.

Avaliador 1: Prof^a Dr^a Francisco Acácio Alves – ICB- UFPA

Avaliador 2: Prof^a Dr^a Barbarella Matos Macchi – ICB- UFPA

Avaliador 3: José Luiz do Nascimento Silva (Suplente) - ICB - UFPA

BELÉM-PARÁ

2017

*“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e
os seus planos serão bem-sucedidos.”
(Provérbios 16:3)*

Dedico este trabalho à minha mãe Ivaneide Cardoso Pereira (*in memoriam*) pelo amor e dedicação e por ter me ensinado a lutar pelos meus sonhos e perseverar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força e sabedoria concedidas durante a realização deste trabalho.

Agradeço à minha família pelo investimento concedido em todas as áreas, pelo incentivo, amor, carinho, acolhimento e compreensão.

À toda família do Laboratório de protozoologia pelo acolhimento e paciência de todos para conosco. Agradeço a professora Edilene pela compreensão durante nosso afastamento do laboratório no período pós-greve e pela orientação, puxões de orelha e etc.. Ao Bruno, Celice, Neide, David, Jorge, Ana e Amanda pelas conversas, brincadeiras, cafés, e por toda a contribuição direta e indireta durante o período que passei no laboratório.

À Leticia, vulgo Tiffany, pelo companheirismo e amizade em todos esses anos, por me aturar e ser meu raciocínio lógico quando to viajando na maionese (quase sempre kkk). E pensar que essa amizade começou na alfabetização! Nós compartilhamos felicidades extremas, besteiras, desesperos e principalmente risadas, porque pra gente não existe tempo ruim quando estamos juntas hahaha

Agradeço de forma especial à Lienne, meu anjo da guarda acadêmico! Obrigada pela ajuda, paciência, prestatividade e principalmente pela amizade. Nunca terei palavras suficientes para agradecer o que fizeste por mim nessa reta final! Muito muito obrigado Li!

Ao Luís, por ter nos ensinado tudo o que precisávamos saber quando chegamos no laboratório, pela paciência (sei que não é teu forte kkk), por sempre estar lá quando precisei! Descobri que por trás dessa pose de durão existe um homem de coração enorme. Muito Obrigada!

Aos meus colegas de sala que se tornaram amigos da vida, Nayara, Ismael, Leticia (de novo kk) e Jackson. Obrigada pela amizade, companheirismo, por sempre estarem comigo e por me fazerem rir à todo momento, cada um por motivos diferentes. Vocês são demais!

Ao meu companheiro Tiago Lima pelo amor, cuidado e por estar ao meu lado sempre. Você acreditou e confiou no meu potencial até mesmo quando nem eu mesma acreditava! Você foi essencial nessa caminhada! Amo você.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que fizeram parte dessa etapa decisiva em minha vida!

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Formas evolutivas do protozoário.....	04
Figura 02: Figura esquemática do ciclo biológico da leishmaniose evidenciando o estágio de desenvolvimento do protozoário no hospedeiro vertebrado e invertebrado.....	09
Figura 03: Desenho esquemático da ação da enzima iNOS.....	10
Figura 04: Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	12
Figura 05: Viabilidade celular pelo método MTT em macrófagos tratados com OC e AK+OC.....	20
Figura 06: Índice endocítico de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com OC + AK por 24 horas.....	21
Figura 07: Detecção da produção de NO.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS

AK – Ácido Kójico
ANF-B – Anfotericina B
B.O.D – Biological Oxygen Demand
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO – Dimetilsufóxido
EROs - Espécies reativas do oxigênio
TNF- α – Fator de necrose tumoral
gp63 – Glicoproteína 63
INF- γ - Interferon- γ
IL – Interleucina
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida
LC – Leishmaniose cutânea
LCD – Leishmaniose cutânea difusa
LCDB – Leishmaniose cutânea disseminada borderline
LCL – Leishmaniose cutânea localizada
LMC – Leishmaniose mucocutânea
LPG – Lipofosfoglicano
LPS - Lipopolissacarídeo
LTA – Leishmaniose tegumentar americana
LV – Leishmaniose visceral
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tretazolina
NADPH – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NO - Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
OC – Óleo de copaíba
PBS – Tampão fosfato salino
RPMI – Roswell Park Memorial Institute
SB⁺⁵⁻ Antimoniais pentavalentes
SBF – Soro bovino fetal
SMF – Sistema mononuclear fagocítico
TGF- β – Fator de crescimento de transformação beta
TNF- α – Fator de necrose tumoral

RESUMO

As leishmanioses são antroponoses que acometem cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo endêmica em 98 países. São causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, capazes de se multiplicar no interior de células fagocíticas de hospedeiros mamíferos, principalmente macrófagos, subvertendo a atividade microbicida dessas células e gerando um ambiente favorável para sua sobrevivência e multiplicação. Essa patologia se manifesta sobre diversas formas clínicas: Leishmaniose visceral (LV), Leishmaniose cutânea (LC) e Leishmaniose mucocutânea (LM). A quimioterapia é o tratamento mais eficaz contra a doença, entretanto, as drogas leishmanicidas disponíveis possuem alta toxicidade, custo elevado e necessitam da utilização por longos períodos. Assim, a pesquisa e desenvolvimento de novos produtos naturais para tratamento alternativo da doença que demonstrem melhor eficácia contra o parasito e que não apresentem toxicidade e efeitos adversos severos se tornaram prioridade. O bioproduto Ácido Kójico (AK), um metabólito secundário proveniente de fungos do gênero *Aspergillus* que possui uma variedade de funções, dentre elas ação sobre o protozoário *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e o óleo de copaíba, obtido do caule de algumas espécies pertencentes ao gênero *Copaífera* amplamente utilizado na medicina popular desde o século 19, por via oral e tópica, tem sua ação demonstrada sobre o protozoário *Leishmania* com vários estudos etnofarmacológicos. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação *in vitro* da associação ácido kójico e óleo de copaíba sobre o protozoário *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a célula hospedeira. Foram realizados teste colorimétrico MTT, análise de atividade antiamastigota e dosagem de óxido nítrico pelo método de GRIESS®. Os resultados demonstraram que a associação AK (50 µg/mL) e óleo de copaíba (10, 20 e 30 µg/mL) não induziu efeito tóxico sobre macrófagos após tratamento por 24 horas. Além disso, diminuiu significativamente a carga parasitária e promoveu aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) liberado pela célula hospedeira na concentração de 30 µg/mL. Logo, a associação manteve a manutenção da viabilidade da célula hospedeira e apresentou atividade leishmanicida, evidenciando assim que esta associação pode ser utilizada em futuros estudos *in vitro* sobre o protozoário *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Palavras chaves: Leishmanioses; *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, Ácido Kójico, Óleo de Copaíba

ABSTRACT

Leishmaniasis are anthroponoses diseases that affect around 12 million people worldwide, being endemic in 98 countries. They are caused by parasites of the genus *Leishmania*, capable of multiplying within phagocytic cells of mammalian hosts, mainly macrophages, subverting the microbicidal activity of cells and generating a favorable environment for their survival and multiplication. This pathology presents several clinical forms: Visceral Leishmaniasis (VL), Cutaneous Leishmaniasis (LC) and Mucocutaneous Leishmaniasis (MCL). Chemotherapy is the most effective treatment against the disease, however, the available leishmanicidal drugs have high toxicity, costly and require long-term use. Thus, a research and development of bioproducts for alternative treatment of the disease that demonstrate the best effect against the parasite, without toxicity and severe adverse effects have become a priority. The bioproduct Kójic Acid (KA), a secondary metabolite from fungi of the genus *Aspergillus* that have a variety of functions, among them action on the protozoan *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and the copaíba oil, obtained from the stem of some species belonging to the genus *Copaífera*, widely used in popular medicine since the 19th century, orally and topically, has demonstrated its action on the protozoan *Leishmania* with several ethnopharmacological studies. In this way, the objective of this work was evaluated in vitro action of the association kojic acid and copaiba oil on the protozoan *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and the host cell. The MTT colorimetric test, anti-mastigote activity analysis and nitric oxide dosage by GRIESS® method, were performed. The results showed that the association copaiba oil (10, 20 and 30 µg/mL) and AK (50 µg/mL) did not induce toxic effect on macrophages after treatment for 24 hours. In addition, it significantly decreased parasite load and promoted increased levels of nitric oxide (NO) released by the host cell at a concentration of 30 µg/mL. Therefore, the association maintained the viability of the host cell and showed leishmanicidal activity, evidencing that this association can be used in future studies on the protozoan *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*.

Keywords: Leishmaniasis; *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, Kojic Acid, Copaiba Oil.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 ASPECTOS GERAIS	01
1.2 Leishmania sp.	02
1.2.1 Classificação	02
1.2.2 Morfologia.....	03
1.2.3 Ciclo biológico	05
1.3 CÉLULA HOSPEDEIRA E INTERAÇÃO COM PARASITO.....	07
1.4 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	11
1.3.1 Epidemiologia e clínica.	11
1.5 TRATAMENTO	12
1.5.1 Produtos naturais com ação leishmanicida	12
1.5.2 Ácido Kójico	13
1.5.3 Óleo de copaíba	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL:	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	16
3.1.1 Obtenção do Ácido kójico e Óleo de copaíba	16
3.1.2 Preparo da associação.....	16
3.1.3 Cultivo e manutenção do parasito	17

3.1.4 Obtenção e cultivo dos macrófagos	17
3.1.5 Tratamento dos macrófagos.....	17
3.2 ENSAIO DE VIABILIDADE EM MACRÓFAGOS MURINOS TRATADOS COM AK + ÓLEO DE COPAÍBA	18
3.1.1 Método thiazolyl blue (MTT).....	18
3.3 ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	18
3.1.1 Atividade antiamastigota.....	18
3.4 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PELA CÉLULA HOSPEDEIRA	19
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
3.6 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	19
4 RESULTADOS	20
4.1 DETECÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM OC+AK	20
4.1.1 Método colorimétrico Thiazolyl blue (MTT).....	20
4.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	21
4.1.2 Atividade antiamastigota.....	21
4.3 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS TRATADOS COM OC+AK	22
5 DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÕES.....	26
7 REFERÊNCIAS	27
ANEXOS	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

As leishmanioses constituem um conjunto de antroponoses que acometem cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo endêmica em 98 países (BRASIL, 2016). São doenças causadas por diferentes espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e transmitidas através do repasto sanguíneo de fêmeas de vetores hematófagos, conhecidos como flebotômíneos (WHO, 2016; GOTO & LINDOSO, 2012).

Esta protozoose constitui um sério problema de saúde pública com aproximadamente 2 milhões de pessoas infectadas por ano. Dessas, 1,5 milhão corresponde às formas clínicas cutânea e mucocutânea e 500 mil, à forma visceral. Países em desenvolvimento, como Brasil, Bolívia, Peru e alguns países da Ásia e da África são os principais alvos endêmicos das leishmanioses, com os maiores números de casos notificados (ALVAR *et al.*, 2012; WERNECK, 2014; HURREL *et al.*, 2016).

A infecção causada pelo protozoário *Leishmania* desencadeia manifestações clínicas diversas, que variam de acordo com a espécie envolvida e a interação com o sistema imune do hospedeiro vertebrado. A partir da diferença entre os sinais e sintomas, as formas clínicas da doença são classificadas em duas categorias principais: leishmaniose visceral (LV), mais grave e correspondente a 25% dos casos e leishmaniose tegumentar americana (LTA), que corresponde a 75% dos casos totais (BRASIL., 2010; WANG, 2010). Dados epidemiológicos indicam que o Brasil está entre os cinco países com o maior número de casos notificados, o que ratifica o caráter endêmico da doença (ARAUJO, *et al.*, 2016).

A LTA, também denominada Leishmaniose cutânea (LC) é a forma clínica mais branda da doença e compreende um conjunto de manifestações clínicas que se caracterizam por lesões ulcerativas e/ou nodulares a nível de mucosa, as quais são causadas por diferentes espécies dermatrópicas do gênero *Leishmania*, sendo que cada uma desencadeia um perfil diferente de resposta imune do hospedeiro. Esta forma clínica subdivide-se em: leishmaniose cutânea localizada (LCL), cujos sinais e sintomas definem-se por lesões ulcerativas localizadas no local da picada do flebotômíneo, leishmaniose cutânea difusa (LCD), que

apresenta lesões nodulares múltiplas não ulceradas e muitas vezes autocicatrizantes e leishmaniose mucocutânea (LMC) que causa a destruição crônica local da mucosa e juntamente com a LCD desencadeia um perfil intermediário de patogenicidade, intitulada leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB) (MCGWIRE & SATOSKAR, 2014; SILVEIRA et al., 2004, 2009).

A principal medida de intervenção para tratamento de leishmaniose é a quimioterapia (DAVID E CRAFT, 2009). Os antimoniais pentavalentes são utilizados como droga de primeira escolha desde a década de 40. No entanto, o tratamento com esses fármacos enfrenta dificuldades como: custo elevado, elevada toxicidade e tratamento por longos períodos, o que leva algumas cepas a adquirirem resistência ao tratamento. Nos casos de pacientes que não respondem adequadamente ou possuem alguma restrição ao tratamento com os antimoniais, são utilizadas Anfotericina B e Pentamidinas como drogas de segunda escolha, porém, essas também possuem fatores limitantes para seu uso como alta toxicidade, invasividade do tratamento, altos custos e efeitos colaterais severos (CHAKRAVARTY & SUNDAR, 2010; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Devido a tais limitações com relação ao tratamento, a busca por métodos alternativos para o tratamento da doença que atuem em vias ainda não testadas ou estudadas profundamente se torna essencial. Dentre os bioprodutos desenvolvidos destacam-se os alcalóides, metabólitos secundários, extratos, polissacarídeos, dentre outros, que são extraídos de diversas fontes (KAYSER et al., 2001; MISHRA et al., 2009).

1.2 *Leishmania* sp.

1.2.1 Classificação

Ross, em 1903, definiu taxonomicamente o gênero *Leishmania* como pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanossomatidae. Devido ao grande número de espécies identificadas e descritas desde então outros modelos taxonômicos foram propostos, sendo a classificação de Lainson & Shaw (1987) a mais utilizada. Esta divide o gênero *Leishmania* em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*.

A partir da década de 60, a classificação das espécies de *Leishmania* que se baseava apenas em características extrínsecas - distribuição geográfica, manifestações clínicas, vetores e padrões epidemiológicos - passou a levar em consideração critérios intrínsecos, como: fatores bioquímicos, imunológicos, moleculares e resposta terapêutica (DA SILVA, 2013; VALE & FURTADO, 2005).

Diversas espécies de *Leishmania* estão distribuídas pelo mundo, sendo conhecidas como espécies causadoras de LC e /ou LV no “Novo Mundo” e no “Velho Mundo” (VON STEBUT, 2015). Cerca de 30 espécies de *Leishmania* já foram identificadas, sendo 20 patogênicas ao homem (NEUBER., 2008; BAÑULS *et al.*, 2007). Nas Américas são conhecidas 11 espécies dermatrópicas responsáveis por causar a leishmaniose tegumentar Americana (LTA), sendo as principais espécies: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. peruviana* e *L. panamensis*, sendo apenas uma espécie causadora da forma visceral, a *L. i. chagasi* (PACE, 2014). Dessas, são reconhecidas pelo menos sete espécies responsáveis pela doença em humanos no Brasil, uma espécie do subgênero *Leishmania*, a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, e 6 espécies do subgênero *Viannia* sendo as principais: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensi*, *L. (V.) lainsoni*, *L.(V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* (BRASIL, 2010).

1.2.2 Morfologia

De forma geral, os parasitos do gênero *Leishmania* se reproduzem por divisão binária, são unicelulares e digenéticos (heteróxenos), ou seja, alternam sua forma evolutiva durante seu ciclo, o que inclui a participação de um hospedeiro vertebrado e um invertebrado, compreendendo as formas amastigotas e promastigotas respectivamente (TANAKA *et al.*, 2007).

As formas promastigotas são extracelulares, se reproduzem por divisão binária e são encontradas no tubo digestivo e na saliva do flebotomíneo. Caracterizam-se por um corpo celular alongado e fusiforme com 1,5 µm de largura e 20 µm de comprimento e apresentam um flagelo livre que emerge de uma invaginação presente na região anterior do parasito, a bolsa flagelar (Figura 1A). Há ainda uma subdivisão dessa forma evolutiva em formas próclicas, com multiplicação no intestino do vetor e metacíclicas, as quais são infectantes para o hospedeiro vertebrado. Na forma amastigota, que é intracelular obrigatória, o parasito

se apresenta na forma oval ou esférica com 2-6 μ m de diâmetro, dependendo da espécie, com flagelo pequeno e internalizado, o que caracteriza a ausência de motilidade (Figura 1B). São encontradas no interior de vacúolos das células do sistema mononuclear fagocítico (SMF), principalmente em macrófagos do hospedeiro mamífero (VANNIER – SANTOS *et al.*, 2002).

Na matriz citoplasmática é observado o núcleo grande e arredondado, aparelho de Golgi, retículo endoplasmático, ribossomos, vacúolos, inclusões lipídicas, entre outras. Além disso, ambas as formas evolutivas possuem cinetoplasto, um complexo em forma de bastão composto por uma mitocôndria que se estende ao longo do corpo celular até uma determinada porção próximo do corpo basal, onde forma um complexo de DNA mitocondrial composto por um DNA altamente condensado, o kDNA. O cinetoplasto se localiza perpendicularmente à base do flagelo e as relativas posições dessas estruturas são o principal modo de classificação dos diferentes estágios do ciclo de vida de tripanossomídeos (Figuras 1C e 1D) (DE SOUZA, 2008; CAVALCANTI *et al.*, 2008).

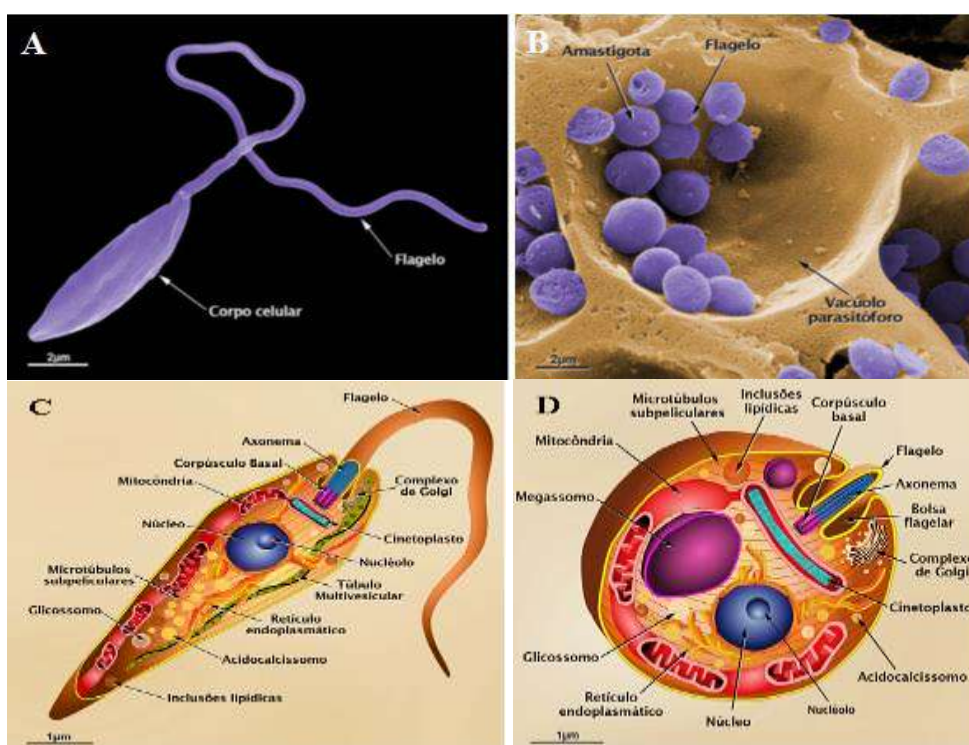


Figura 01: Formas evolutivas do protozoário. (A) Forma promastigota, (B) Forma amastigota dentro de vacúolo parasitóforo, (C) esquema mostrando a forma promastigotas, (D) esquema mostrando a forma amastigota.

Fonte: TEIXEIRA *et al.*, 2013.

1.2.3 Ciclo biológico

O parasito *Leishmania* apresenta ciclo de vida heteroxênico (digenético), tendo como reservatórios o homem, que é o hospedeiro acidental e os hospedeiros naturais, animais domésticos e alguns animais silvestres, como preguiças e canídeos selvagens, dentre outros (BRASIL, 2013).

A doença é transmitida por hospedeiros invertebrados do gênero *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, pertencentes à ordem Diptera, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (BRASIL, 2013). Os insetos pertencentes ao gênero *Phlebotomus* são comumente encontrados no velho mundo (Europa, Ásia e África), enquanto que os do gênero *Lutzomyia* habitam o novo mundo (América central e do sul) (PACE, 2014). O inseto vetor geralmente realiza sua alimentação no período da noite, são encontrados em região de florestas, habitando a cobertura florestal, ocos de árvores, fendas de rochas e também em cavernas. Entretanto, quando o homem invade a floresta ou habita áreas de desmatamento, residindo em casas próximas as florestas, o mosquito entra em contato com o mesmo, transmitindo a doença (CHOLEWIŃSKI *et al.*, 2015).

O ciclo evolutivo do parasito se inicia quando as fêmeas do vetor realizam o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado e ingerem formas amastigotas que se encontram livres na circulação ou no interior de macrófagos. Estas se fixam no intestino médio do hospedeiro invertebrado e após distensão sanguínea, sofrem modificações tornando-se promastigotas procíclicas, totalmente replicativas e não-infectivas. Cerca de cinco dias depois, no epitélio do trato digestivo do vetor, os parasitos sofrem um processo de diferenciação celular denominado metaciclogênese. Durante esse processo, as formas promastigotas de *Leishmania* começam a sofrer várias alterações em seus constituintes de membrana, com o alongamento da estrutura do LPG, principal fator de virulência do parasito, e alongamento do flagelo. Com o término da metaciclogênese, as promastigotas procíclicas tornam-se promastigotas metacíclicas, com elevada capacidade de infecção, que, por sua vez saem das células intestinais e migram para a probóscida do vetor sendo inoculadas no hospedeiro durante o hematofagismo (Figura 02) (KAYE & SCOTT, 2011; NEUBER, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

No hospedeiro mamífero, as formas promastigotas resistem à lise do complemento sendo internalizadas por fagócitos, principalmente monócitos, neutrófilos e células dendríticas (RIBEIRO-GOMES et al., 2014). Em seguida, as formas promastigotas sofrem outras modificações, assumindo formato arredondado e com flagelo internalizado. As formas amastigotas aptas, se multiplicam no interior de um compartimento com pH ácido e enzimas hidrolíticas, denominado vacúolo parasitóforo, presente no interior das células fagocíticas até sua ruptura (HENRIQUES et al., 2003) sendo posteriormente, liberadas na corrente sanguínea para que possam infectar outras células e podendo ser ingeridas por novos vetores durante seu repasto sanguíneo, mantendo assim o ciclo (Figura 02) (GREGORY; OLIVIER, 2005; SAKTHIANANDESWAREN *et al.*, 2009).

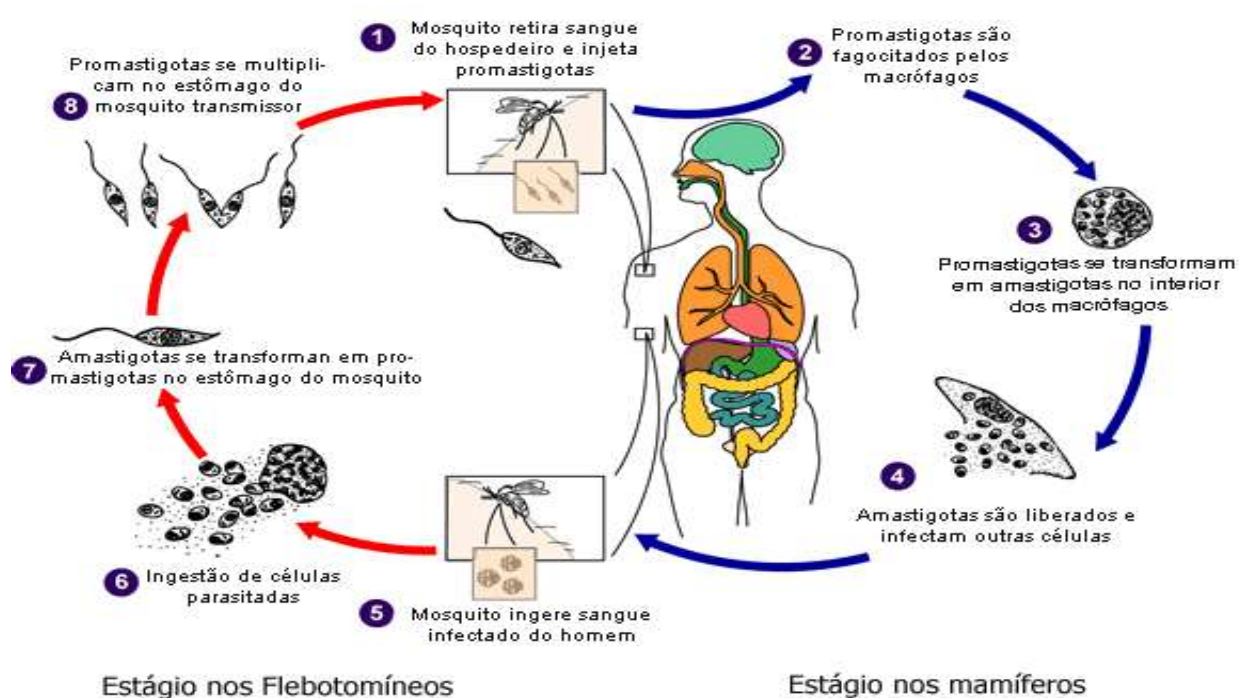


Figura 02. Figura esquemática do ciclo biológico da leishmaniose evidenciando o estágio de desenvolvimento do protozoário no hospedeiro vertebrado e invertebrado.

Fonte: Global Health – Division of parasitic diseases and malaria, 2013 (Adaptada).

No contexto *in vitro*, são utilizadas formas promastigotas de *Leishmania* cultivadas em meio líquido para estudos de caracterização e interação com a célula do hospedeiro vertebrado. O cultivo apresenta duas fases principais de crescimento celular, a fase logarítmica ou exponencial, onde há aumento constante do número de parasitos além de intensa atividade metabólica e a fase estacionária, onde não há aumento dos níveis de

crescimento celular e a atividade metabólica decresce. A atividade proliferativa, também denominada curva de crescimento, obedece a um padrão sigmoidal e depende de diversos fatores como adaptação à cultura, as condições do ambiente, a disponibilidade de substrato físico e suprimentos de nutrientes necessários para promover o crescimento. A infectividade das formas promastigotas depende do ciclo celular e é restrita à fase estacionária de crescimento *in vitro*, mais especificamente entre o sétimo e oitavo dia de cultura (DE ALMEIDA & BOAVENTURA, 2005; FARIAS *et al.*, 2013; SACKS & PERCKINS, 1984).

1.3 CÉLULA HOSPEDEIRA E A INTERAÇÃO COM O PARASITO

As primeiras células a interagirem com os parasitos após a inoculação pelo vetor são neutrófilos e células dendríticas dérmicas. No entanto, essas células não oferecem ambientes propícios para a replicação e sobrevivência do parasito a longo prazo. Já os macrófagos residentes da derme, por sua vez são rapidamente infectados, sendo as principais células envolvidas na resposta imune do hospedeiro contra o parasito *Leishmania* (PETERS, 2008).

Os macrófagos, originados dos monócitos, desempenham funções de defesa inata do organismo, sendo responsáveis por reconhecer, fagocitar e destruir patógenos invasores e células mortas. Essa ação é mediada por uma série de processos que medeiam a interação entre os fatores de virulência do parasito e o contato com a célula hospedeira, o que acaba sendo um fator decisivo para o ciclo evolutivo do protozoário, bem como para o perfil clínico que será estabelecido (WEINBERG, 2009; WHO, 2010).

Essas células podem apresentar diferentes fenótipos após recrutamento, dependendo de estímulos específicos para o direcionamento da ação celular e do local para o qual foram recrutados (BASHIR *et al.*, 2016; XUAN *et al.*, 2015).

Os macrófagos ativados podem variar entre dois perfis: M1 e M2. Macrófagos M1 são aqueles ativados classicamente, sendo especializados no combate de patógenos intracelulares, através da estimulação de citocinas pró-inflamatórias (INF- γ , IL-1, IL-2, IL-6). Além disso, depois de ativados apresentam alterações morfológicas como o espriamento celular e a formação de projeções citoplasmáticas, secretam grandes quantidades de mediadores inflamatórios como óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs),

apresentando uma atividade fagocítica bem acentuada. Quando ativados por interferon- γ (INF- γ) e lipopolissacarídeo (LPS), sua ação é polarizada para a resposta tipo Th1, bastante efetora contra parasitos intracelulares e células tumorais. Macrófagos M2 são aqueles ativados alternativamente, durante a resposta linfocitária Th2 sendo estimulados por IL-4. Ao contrário do perfil M1, apresentam baixa ou nenhuma produção de NO e ROS, e promovem a ativação de arginase, uma enzima antagonista a iNOS que participa do processo de formação do colágeno evidenciando sua reduzida capacidade microbicida e elevada capacidade de reparação e cicatrização do tecido (HE & CARTER, 2015; JABLONSKI *et al.*, 2015; MOSSER, 2003).

A superfície do parasito é recoberta por algumas moléculas que são capazes, de inativar a resposta microbicida dos macrófagos, sendo essenciais para a evolução da infecção. Estas são: lipofosfoglicana (LPG), fosfatidilserina (FS) e a glicoproteína de superfície de 63kDa (GP63) (TRIPATHI-GUPTA, 2003; SOARES *et al.* 2005). A gp63 e o LPG atuam no sistema complemento e a nível intracelular; o LPG inativa a formação do complexo formado pelo sistema complemento, responsável por provocar injúria à membrana do parasito e promover o atraso da fusão do fagossomo ao lisossomo. Já a gp63 é uma metaloproteinase presente em toda a superfície das formas promastigotas que cliva fragmentos C3b em sua forma inativa C3bi, facilitando a fagocitose, além de inibir as hidrolases presentes no lisossomo, evitando assim a destruição do parasito (SACKS & SHER, 2002, ZAMBRANO-VILLA *et al.*, 2002). Além disso, o reconhecimento e internalização do protozoário *Leishmania* pelo macrófago se dá, principalmente, pela existência de receptores de membrana específicos para o fosfolípido fosfatidilserina, receptores de manose e da proteína C reativa (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2006). A exposição da fosfatidilserina por promastigotas de *Leishmania* pode funcionar como um ligante para a superfície dos macrófagos, garantindo a internalização do parasito e a sua infectividade (FARIAS *et al.*, 2013).

Durante a fagocitose das formas promastigotas do parasito pela célula, processo desencadeado após a adesão à superfície celular, ocorre a fusão do fagossomo recém formado com o lisossomo, formando o fagolisossomo. Esta fusão de estruturas intracelulares dá origem ao vacúolo parasitóforo (MCCONVILLE *et al.*, 2007).

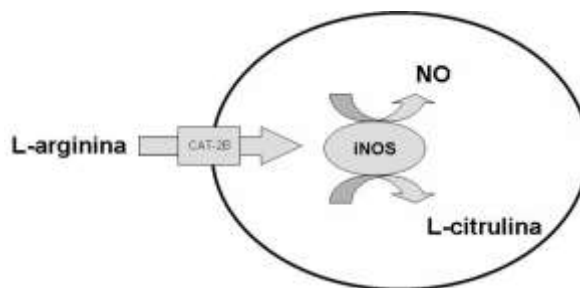
A resposta imune do hospedeiro varia de acordo com as diferentes espécies de *Leishmania*, todavia, de modo geral os macrófagos ativados por tais parasitos produzem

citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF- α) que regulam sua atividade, assim como o recrutamento e ativação de outras células inflamatórias (REITHINGER *et al.*, 2007). Além de substâncias como espécies reativas de oxigênio (ROS), ânions superóxidos (O_2^-), radicais hidroxila ($OH^\cdot$), peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (NO), produtos altamente citotóxicos produzidos pela célula hospedeira em resposta à entrada do patógeno, processo denominado “burst oxidativo”. A via que contribui para o “burst oxidativo” é a da NADPH oxidase, uma enzima presente na membrana do fagossomo e no citosol, que após estímulo forma um o complexo que reduz o O_2 em ânions superóxidos (O_2^-), que são convertidos em H_2O_2 por meio da enzima superóxido dismutase (SOD) ou espontaneamente (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Durante todo este processo descrito anteriormente ocorre à alteração da forma do parasito, de fusiforme, alongada e com flagelo externalizado para a forma arredondada ou oval e com flagelo internalizado, característico de amastigotas. Esta forma resiste e se multiplica na célula hospedeira por mecanismos ainda pouco conhecidos e rapidamente reinfecta outros fagócitos, como macrófagos, células dendríticas e alguns tipos celulares não fagocíticos, como os fibroblastos. Algumas das moléculas envolvidas na adesão ao macrófago e no mecanismo de evasão em formas promastigotas, continuam presentes na forma intracelular (LIU & UZONNA, 2012; MCCONVILLE *et al.*, 2007).

O Óxido Nítrico (NO) é classificado como um radical intermediário essencial na resposta intracelular dos macrófagos ativados; sua produção ocorre através da expressão de LPS e IFN- γ , que ativam a enzima Oxido Nítrico Sintase induzida (iNOS), responsável por converter L-arginina em NO e L-citrulina (Figura 03) (HORTELANO *et al.*, 2003). Além do mais, o NO apresenta outras atuações, sendo um importante mediador inflamatório no combate de agentes infecciosos, impedindo a progressão tumoral e participando do controle de doenças autoimunes e degenerativas (ROSSETI, 2009).

Figura 03: Desenho esquemático da ação da enzima iNOS.



Fonte: SARMENTO, 2004

Nas leishmanioses a resposta imune é dependente de células T, sendo a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania* relacionada com o nível de expansão de células Th1 e Th2. A diferenciação dos linfócitos T auxiliares (Th0) durante a infecção também é regulada pela ação de macrófagos. Estes se diferenciam para células T auxiliares1 (Th1), que produzem INF- γ , fator de necrose tumoral (TNF- α) e Interleucina-12 (IL-12), citocinas pró-inflamatórias que estimulam a ativação de outros macrófagos e a destruição do parasito. Já as células T auxiliares 2 (Th2) produzem citocinas que inibem a ativação de macrófagos (WHO, 2010). O perfil de ativação em Th1 e/ou Th2 é muito variável e depende da maneira como o parasito interage com a célula hospedeira, porém, acredita-se que os linfócitos tipo Th1 sejam determinantes para a resistência ao parasito, enquanto que o perfil Th2 esteja relacionado à suscetibilidade a doença (GOLLOB, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2004).

Parasitas intracelulares, como a *Leishmania*, são capazes de evadir a resposta microbicida, sobreviver e se proliferar dentro dos macrófagos. Dentre os mecanismos de escape está a capacidade de resistir a ação do burst oxidativo do macrófago, silenciando mecanismos de síntese de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ROS) (ROBINSON *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2010). A expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e INF- γ , que estão envolvidas na resposta de Th1 e na imunidade mediada por células, também é reduzida pela infecção. Além disso, o protozoário é capaz de direcionar a diferenciação de células T para uma resposta do tipo Th2, caracterizada pela persistência da infecção, induzindo macrófagos a produzir moléculas imunossupressoras, como IL-10, uma citocina de classe Th2, que previne a ativação de células T, proliferação e função efetoras de macrófagos, incluindo a liberação de citocinas Th1 e geração do NO (MAITY *et al.*, 2009).

1.4 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

1.4.1 Epidemiologia e clínica

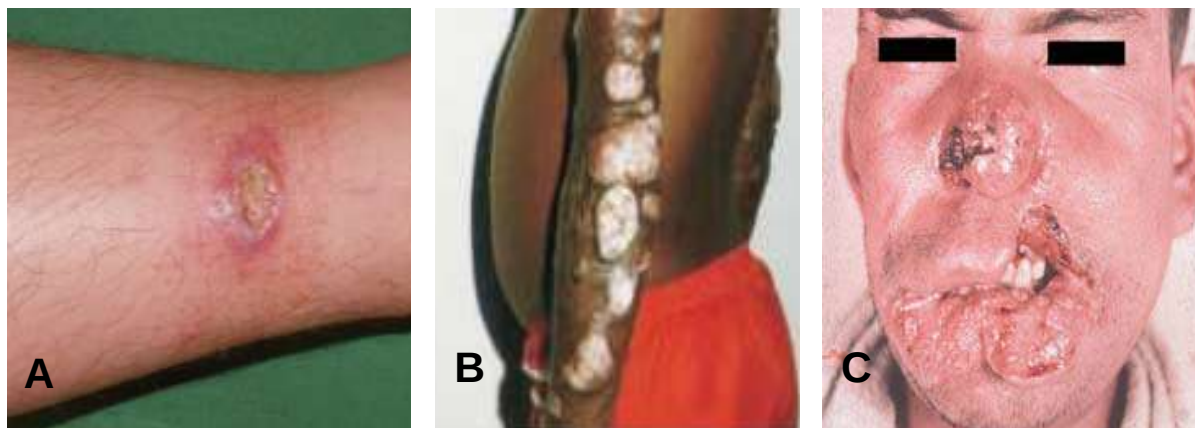
A LTA, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), está entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância no mundo. Estando presentes em 98 países, em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com cerca de 2 milhões de casos registrados por ano e representando um risco para 350 milhões de pessoas que vivem em áreas de transmissão (HURREL et al., 2016; WHO, 2014). São conhecidas 11 espécies dermatópicas causadoras da LTA. Destas, sete são responsáveis por causar a doença no Brasil, sendo as principais a *L. (V) braziliensis* e a *L. (L.) amazonensis* (LAINSON, 2010, PACE, 2014). Na América do Sul e Central, países como Brasil, Peru, Colômbia, Equador, Bolívia, Venezuela, Panamá, Honduras, Nicarágua e Costa Rica apresentam altas taxa de notificação para LTA, sendo considerado um problema de saúde pública (ALVAR et al., 2012).

O Brasil é um dos países que apresenta elevada incidência de LTA, com registros de ocorrência na maioria dos estados (WHO, 2014). No ano de 2014 foram notificados aproximadamente 20.000 novos casos, com destaque para as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, sendo a maior quantidade de notificações encontradas no estado do Pará (Sinan/SVS-MS, 2014).

A LTA é uma doença infecciosa, de evolução crônica e não contagiosa, afetando a pele de forma difusa ou localizada (DAVID & CRAFT, 2009). As formas clínicas são classificadas de acordo com a espécie, aspectos clínicos, imunológicos e características diferenciais das lesões. Sendo elas: a leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea disseminada Borderline (LCDB) e a leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD) (Figura 04) (SILVEIRA et al., 2008).

Correlacionando às principais espécies às formas clínicas: temos: *L. (V.) braziliensis* causando a leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB) e a leishmaniose mucocutânea (LMC). A espécie *L. (L.) amazonensis* também é responsável por causar a LCL (forma mais comum) a LCDB e a forma mais grave da LTA, a LCAD (SILVEIRA et al., 2004).

Figura 04: Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana. (A) Leishmaniose cutânea localizada (LCL); (B) Leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD); (C) Leishmaniose mucocutânea (LMC).



Fonte: (A e C) NEUBER, 2008; (B) SILVEIRA et al., 2004.

1.5 TRATAMENTO

1.5.1 Produtos naturais com ação leishmanicida

Estudos envolvendo produtos naturais com intuito de desenvolver novos medicamentos para o tratamento de leishmaniose estão cada dia mais avançados. O foco desses estudos são produtos naturais, principalmente os provenientes da Região Amazônica, que possui uma vasta biodiversidade e pode vir a oferecer uma via alternativa para o tratamento das leishmanioses com medicamentos que sejam menos tóxicos, invasivos e principalmente de baixo custo.

Espécimes naturais como plantas, frutos, animais e microorganismos (fungos e bactérias) são capazes de sintetizar compostos conhecidos como metabólitos secundários, que são essenciais para seu desenvolvimento e apresentam inúmeras atividades biológicas (BIESKI *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Estudos com produtos naturais podem ser satisfatórios, pois a maioria desses compostos promove a morte do parasito em baixas doses e não causam efeito tóxico para as células de mamíferos (DE LIMA *et al.*, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2013). O mecanismo de ação leishmanicida desses compostos é variado, observando a ação dos compostos diretamente ao parasito (BRENZAN *et al.*, 2007; LAURELLA *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*,

2015) ou induzindo ativação da resposta microbicida da célula hospedeira (RODRIGUES *et al.*, 2014).

Ao analisar o extrato das folhas de *Calophyllum brasiliense*, Brenzan *et al* (2007), demonstraram sua ação contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. O extrato retirado de *Mikania micrantha* mostrou ter ação contra *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Trypanosoma cruzi* (LAURELLA *et al.*, 2012).

Outros produtos com ação leishmanicida como os metabólitos e substâncias produzidas por várias espécies de fungo estão descritos na literatura. O ácido kójico, um metabólito isolado de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Acetobacter* e *Penicillium*, já foi descrito por Rodrigues *et al.* (2014), como importante agente leishmanicida, promovendo diminuição do crescimento de formas promastigotas e amastigotas *in vitro* e *in vivo*.

Apesar de existirem vários tratamentos para a leishmaniose, ainda não existe uma terapia que seja eficiente para combatê-la (BAILEY & LOCKWOOD, 2007) e muitos estudos estão sendo realizados na busca de bioprodutos que sejam eficazes, que possam ser utilizados em doses baixas e que sejam de baixo custo.

1.5.2 Ácido Kójico

O bioproduto Ácido Kójico (AK) ou 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona (HMP) é um metabólito secundário sintetizado por fungos do gênero *Aspergillus*, produzido a partir de um processo de fermentação envolvendo vários tipos de substratos que atuam como fonte de carbono. É uma substância cristalina altamente solúvel em água, etanol e acetona que possui uma ampla variedade de aplicações biológicas e terapêuticas (MOHAMAD *et al.*, 2010).

O Ácido Kójico é muito utilizado na área cosmética como agente clareador de pele devido à sua ação inibitória na formação da melanina e ação protetora contra raios ultravioletas ((EMAMI *et al.*, 2007; MOHAMAD *et al.*, 2010). No contexto terapêutico é empregado no tratamento de melasma por ser um inibidor seletivo da tirosinase, desempenhando um papel chave na cascata melanogênica (CHANG *et al.*, 2009; GUPTA *et al.*, 2006). Além dessas, também é utilizado como agente antioxidante (GOMES *et al.*, 2001), antitumoral (BURDOCK *et al.*, 2001; TAMURA *et al.*, 2006;), ação parasitária sobre o helminto *Schistosoma mansoni*, (FITZPATRICK *et al.*, 2007), ação sobre o protozoário

Leishmania (Leishmania) amazonensis, através da indução da produção de radicais de oxigênio pela célula hospedeira (RODRIGUES *et al.*, 2014), além de um potente agente ativador de macrófagos, promovendo alteração dos componentes do citoesqueleto e aumento do índice fagocítico (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Para avaliar a segurança (toxicidade e genotoxicidade) na utilização do AK, Nohynek *et al.* (2004) realizaram uma revisão e concluíram que o seu uso pela via tópica não oferece riscos ao consumidor. Possui também ação antioxidante contra espécies reativas de oxigênio liberados no meio extracelular (GOMES *et al.*, 2001). Um estudo realizado por Mohammadpour e colaboradores (2012), demonstrou cicatrização de feridas em modelo animal, após o tratamento tópico com pomada contendo diferentes concentrações de AK. Como também foi verificada a redução do número de ovos normais do parasito *Schistosoma mansoni*, quando tratados com o metabólito (FITZPATRICK *et al.*, 2007). Já foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que macrófagos peritoneais murinos tratados com 50µg/mL de AK apresentaram um aumento do espreado celular, formação de filopódios, produção de radicais de oxigênio, alteração de componentes do citoesqueleto e aumento do índice fagocítico, características de ativação celular (RODRIGUES *et al.*, 2011), além de possuir ação leishmanicida (RODRIGUES, 2014).

1.5.3 Óleo de copaíba

O óleo de copaíba é obtido do caule de algumas espécies do gênero *Copaífera*. Essas árvores são nativas da América Latina e Oeste Africano, com cerca de 20 espécies de ocorrência no território brasileiro, estando entre as mais estudadas no mundo, devido à sua importância econômica e ecológica (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; BRANDÃO *et al.*, 2008; SANZ-BISET *et al.*, 2009; VARGAS *et al.*, 2015).

Esse bioproduto é amplamente utilizado na medicina popular desde o século 19, por via oral e tópica (LIMA *et al.*, 2003, BRANDÃO *et al.*, 2008) e apresenta algumas ações farmacológicas comprovadas, como: anti-inflamatório, anti-tumoral, antimicrobiano, anti-fúngico, no tratamento da psoríase e úlceras cutâneas (PACHECO *et al.*, 2006; VEIGA JUNIOR *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008, DEUS *et al.*, 2009; DEUS & ALVES, 2011; SANZ-BISET & CANIGUERAL, 2011).

A ação deste bioproduto tem sido demonstrada sobre o protozoário *Leishmania* com vários estudos etnofarmacológicos no Peru (KVIST *et al.*, 2006), na Amazônia e no

estado do Maranhão (MOREIRA *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2008) demonstrou que o óleo de copaíba extraído de diferentes espécies de *Copaífera* apresentou atividade contra formas promastigotas e amastigotas axênicas e intracelular do protozoário *Leishmania (L.) amazonensis*.

Associação entre drogas para o tratamento das leishmanioses pode ser considerada uma inovação na busca da cura dessas doenças, visto que o tratamento utilizado está fundamentado na utilização de drogas isoladas. Drogas que apresentem ação diferente sobre o parasito ou que atuem em organelas específicas, poderiam apresentar efeitos sinérgicos e ser administradas em períodos e doses menores, resultando em uma maior eficácia e apresentando menor toxicidade ao organismo. Estudo realizado por Trinconi *et al.*(2014) demonstrou que a associação da anfotericina B e o tamoxifeno - droga utilizada no tratamento do câncer de mama- foi mais eficaz na redução das lesões em camundongos infectados quando comparado aos grupos que receberam tratamento sem associação.

Considerando que o AK possui inúmeras propriedades, dentre elas, ativador de macrófagos e agente leishmanicida e o óleo de copaíba também já ter sido demonstrado como um importante imunomodulador e com potencial leishmanicida (ALBUQUERQUE., *et al*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2010), o objetivo da pesquisa é demonstrar se a associação entre esses bioprodutos potencializará a ação microbicida em macrófagos infectados e tratados *in vitro* com a associação.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar a ação *in vitro* da associação óleo de copaíba e ácido kójico, sobre o protozoário *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a célula hospedeira.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar a viabilidade celular dos macrófagos tratados com a associação óleo de copaíba e ácido kójico;
2. Analisar a atividade anti-amastigota da associação óleo de copaíba e ácido kójico;
3. Avaliar a produção de NO após interação do protozoário com a célula hospedeira.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

3.1.1 Obtenção do ácido kójico e óleo de copaíba

O AK foi obtido da empresa Sigma Aldrich e o óleo de copaíba cedido pela professora Dra. Giselle Guilhon, do Instituto de Química, da Universidade Federal do Pará.

3.1.2 Preparo da associação

O óleo de copaíba foi solubilizado em Dimetilsufóxido (DMSO) na concentração de 0,1 µL/mL e diluído em meio DMEM e o AK foi diluído em meio DMEM. A partir destas soluções foram retiradas as concentrações utilizadas nos experimentos. O AK foi utilizado na concentração de 50 µg/ml de acordo com Rodrigues et al (2011) e o óleo de copaíba nas concentrações de 10 µg/ml, 20 µg/ml e 30 µg/ml de acordo com Santos et al (2008).

3.1.3 Cultivo e manutenção do parasito

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* foram obtidas em meio NNN, a partir do Programa de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará. As promastigotas foram transferidas para meio RPMI 1640, suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF) a 10% e mantidas em estufa B.O.D a 27°C. Foram feitos repiques semanais, até a quinta passagem e utilizadas promastigotas na fase estacionária de crescimento (sétimo dia).

3.1.4 Obtenção e cultivo dos macrófagos

Camundongos suíços (machos de 8-10 semana) foram eutanasiados em câmara de CO₂ e em seguida foi feita a remoção da pele da região abdominal e exposição do peritônio. Foram injetados 5mL de solução de Hank's estéril na cavidade peritoneal, utilizando seringa e agulhas estéreis. Posteriormente o abdômen foi massageado por cerca de 1 minuto para descolamento das células e coleta da solução utilizando seringa e agulha. Após coleta do material, os animais foram descartados conforme RDC306/04 da Anvisa. O material aspirado foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm, em temperatura de 4°C e o sedimento contendo os macrófagos peritoneais ressuspendido em meio DMEM sem soro. A contagem das células foi feita em Câmara de Neubauer e a quantidade ajustada de acordo com o número de células utilizadas em cada experimento. Os macrófagos foram então transferidos para placas de cultura com 24 poços e incubados a 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂, durante uma hora para adesão. Após esse período foi realizada lavagem com solução salina de fosfato estéril (PBS) pH 7.2, para remoção das células que não aderiram e em seguida adicionado meio DMEM suplementado com 10% de SBF. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas.

3.1.5 Tratamento dos macrófagos

Os macrófagos foram tratados com óleo de copaíba e OC+AK em placas de cultura nas concentrações de 10, 20, 30 µg/mL e 10+50, 20+50 e 30+50 µg/mL por 24 horas em estufa contendo 5% de CO₂ à 37°C, após realização da cultura primária descrita no item 3.4 Os procedimentos foram realizados após o término do tratamento.

3.2 ENSAIO DE VIABILIDADE EM MACRÓFAGOS MURINOS TRATADOS

3.2.1 Método Thiazolyl blue (MTT)

O MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (SIGMA) é um sal tetrazolium que é convertido em cristais azuis de formazan insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, após clivagem por desidrogenases mitocondriais. O produto obtido após clivagem é impermeável às membranas celulares e acumula-se em células viáveis (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006). Ao adicionar dimetilsulfóxido (DMSO), estes cristais formazan são solubilizados, sendo o produto final da reação lido por espectrofotometria. Para realização deste teste, os macrófagos peritoneais foram cultivados como descrito no item 3.4, em placas de 24 poços e submetidos ao tratamento com óleo de copaíba e OC+AK nas concentrações descritas no item 3.1.5 por 24 horas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi retirado, e as células lavadas com PBS para em seguida ser adicionado 0,5 mg/mL MTT diluído em PBS para incubação a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ por 3 horas. Após incubação com MTT, o sobrenadante foi retirado, os poços lavados com PBS e 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados em cada poço para solubilização dos cristais de formazan com incubação em placa agitadora por 10 minutos. Posteriormente, a solução final foi transferida para placas de 96 poços e lida em espectrofotômetro (BIO-RAD Model 450 Microplate Reader) com comprimento de onda de 570 nm. Para controle da reação, foram utilizadas células mortas com solução de formol 15%.

3.3 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

3.3.1 Atividade antiamastigota

Para determinar o índice de infecção de macrófagos tratados com óleo de copaíba e AK, as células foram cultivadas como descrito no item 3.1.4, com posterior interação com formas promastigotas na fase estacionária de crescimento na proporção de (1:10) durante 3 horas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e os macrófagos lavados com PBS, pH 7.2, por três vezes, para retirar as leishmanias não internalizadas. Posteriormente a infecção, os macrófagos foram tratados por 24 horas. Após o tratamento, o sobrenadante foi retirado e as lamínulas lavadas com PBS pH7.2 e fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos e logo em seguida coradas com Giemsa por 40 minutos. Ao final, as lamínulas foram montadas sobre lâmina de vidro

utilizando Entellan ® e analisadas em microscópio óptico de campo claro Olympus BX41. Foram contados 100 macrófagos por lâmina e o índice de infecção foi obtido calculando-se a porcentagem de células que endocitaram e a média de parasitos por células.

3.4 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PELA CÉLULA HOSPEDERIA APÓS TRATAMENTO.

A determinação da concentração de nitrito no meio de cultura é uma fonte indireta de se determinar a concentração NO produzido por macrófagos tratados e não tratados por 24 horas com as concentrações de 50 µg/mL de AK e 10, 20 e 30 µg/mL de óleo de copaíba associados.

Este procedimento foi realizado utilizando-se o método de Griess, que consiste em adicionar 50 µL do reagente de Griess (Sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e Naphtylenediamina a 0,1 % em água destilada) a 50 µL do sobrenadante dos macrófagos tratados ou não com AK e AK+óleo de copaíba. A leitura foi feita por espectrofotometria sobre um comprimento de onda de 590 nm e a concentração de nitrito é expressa em µM de acordo com a curva padrão estabelecida.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando o Graph Pad Prism Versão 6.0. Os testes usados foram à análise de variância, ANOVA e Teste t de Student, considerando significantes resultados com $p < 0,05$.

3.6 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O estudo obedeceu aos critérios do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE) e fez parte do projeto “Associação de bioprodutos com potencial terapêutico para o tratamento da Leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*.” O projeto teve aprovação do comitê de ética sob o processo nº 19/2015 do IEC (Anexo 1).

4. RESULTADOS

4.1. DETECÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM OC+AK

4.1.1 Método colorimétrico Thiazolyl blue (MTT)

Para avaliar se o óleo de copaíba e a associação (OC+AK) apresentavam ou não efeito citotóxico para a célula hospedeira (macrófagos) foi realizado o método de MTT, que detecta a viabilidade das células através das desidrogenases mitocondriais. Após análise foi demonstrado que não houve redução significativa da viabilidade das células após diferentes tratamentos no período de 24 horas, quando comparada ao grupo controle que não recebeu tratamento (Figura 05, A e B).

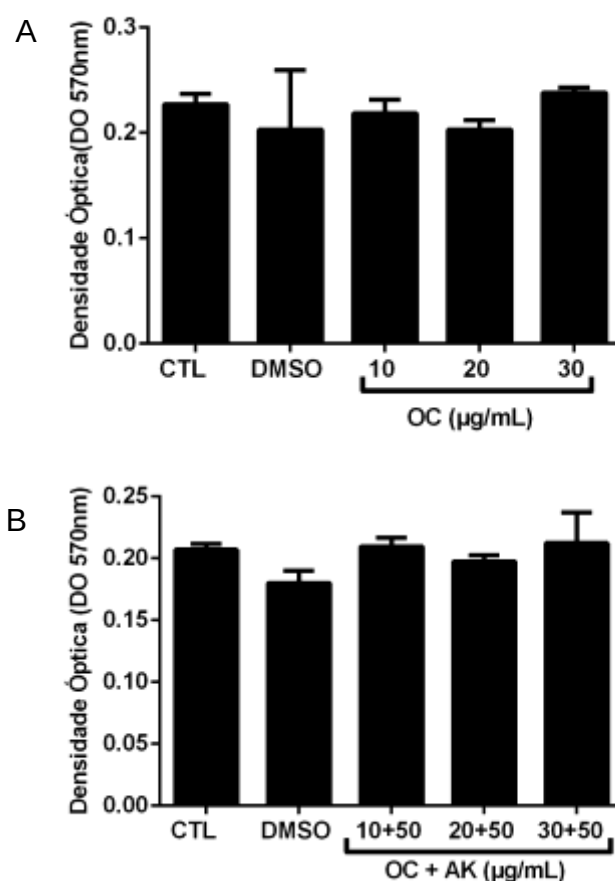


Figura 05: Viabilidade celular pelo método MTT em macrófagos peritoneais mantidos em cultivo e tratados com óleo de copaíba (A) e associação (OC+AK) (B) por 24 horas nas concentrações de OC 10, 20 e 30 µg/mL e AK 50 µg/mL. Para análise estatística foram utilizados os testes ANOVA seguido do teste de Tukey, $P < 0,05$. CTL: controle; DMSO; AK: Ácido kójico; OC: Óleo de copaíba; GLU: Glucantime.

4.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

4.2.1 Atividade anti-amastigota

A atividade leishmanicida do OC e da associação OC+AK foi avaliada em macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*, tratados por 24 horas. Na figura 06 foi evidenciado que houve diminuição de parasitos fagocitados nos macrófagos tratados nas três concentrações de OC+AK em relação ao controle. Entretanto, o resultado mais significativo foi o encontrado na concentração de 50+30 $\mu\text{g/mL}$ de OC+AK. No período de 24 horas foi observado IC_{50} de 69,77 $\mu\text{g/mL}$. Nas células tratadas apenas com OC não foi observada redução do número de parasitos no interior dos macrófagos quando comparados ao grupo controle (dados não mostrados). Como controle positivo foi utilizado o antimonial Glucantime®, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$.

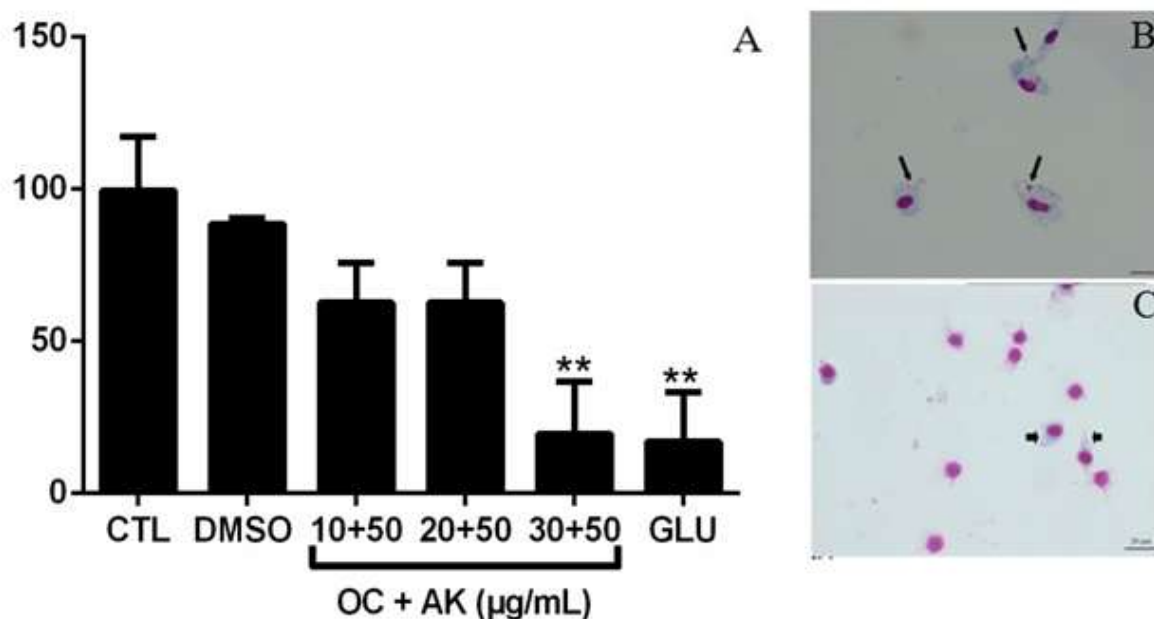


Figura 06: Avaliação da atividade anti-amastigota em macrófagos infectados com e sem tratamento. Em (A) número de amastigotas presentes no interior de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados por 24 horas com OC+AK, $p < 0,05$. Em (B) interação macrófago-*Leishmania* sem tratamento, observar vacúolos parasitóforos característicos, com formas amastigotas (setas). Em (C) macrófagos infectados e tratados com a associação, setas mostram vacúolos parasitóforos vazios. Barra: 20 μm .

4.3 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Para detectar a produção de NO pela célula hospedeira infectada com *L. (L.) amazonensis* e tratada foi realizado o método de Griess para análise da produção de óxido nítrico. Após análise do sobrenadante da cultura tratada com a associação OC+AK foi possível observar que esta promoveu a produção de NO em células tratadas por 24 horas na concentração de 50+30µg/mL, quando comparadas com o controle sem tratamento (Figura 07). Como controle positivo, as células foram estimuladas com 50 µg/mL de Glucantime por 24 horas.

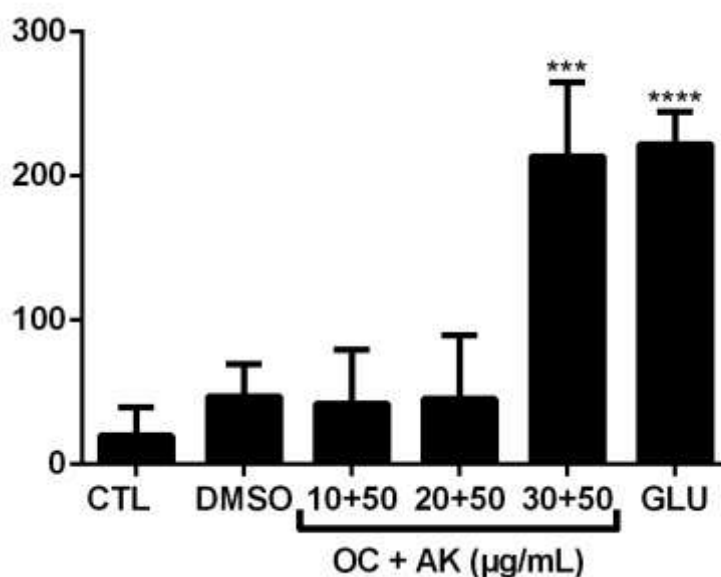


Figura 07: Detecção da produção de NO pela célula hospedeira infectada com *Leishmania (L.) amazonensis* e tratados com óleo de copaíba e associação (OC+AK) por 24 horas nas concentrações de OC 10, 20 e 30 µg/mL e AK 50 µg/mL. $P < 0,05$. CTL: controle; DMSO: CDimetilsufóxido; AK: Ácido kójico; OC: Óleo de copaíba; GLU: Glucantime.

5. Discussão

Os medicamentos utilizados para o tratamento de leishmaniose são, em geral, citotóxicos e apresentam alguns efeitos adversos graves (MAITY et al., 2009). Devido às inúmeras desvantagens apresentadas por essas formulações atualmente disponíveis, é necessária a busca por drogas alternativas que facilitem o tratamento das leishmanioses (MENEZES et al., 2015), estimulem a resposta microbida dos macrófagos, sem comprometer suas funções biológicas e morfologia e sejam eficazes na destruição do parasito (RODRIGUES et al., 2011).

A leishmania é um parasito intracelular obrigatório, tendo as células do sistema fagocítico mononuclear como as principais células hospedeiras. Os macrófagos são células efectoras da resposta imune inata que possuem um papel central na defesa do organismo frente a infecção por *Leishmania* (PETERS, 2008). O desenvolvimento de novos compostos de ação seletiva e menos tóxica é importante para controlar a parasitemia e induzir uma ação estimulatória e/ou imunomodulatória da célula hospedeira (RODRIGUES et al., 2015; SEM & CHATTERJE, 2011).

Muitas substâncias de origem natural obtidas de plantas e microorganismos vêm demonstrando alta capacidade de ativação de macrófagos, além de um grande potencial leishmanicida (LOPES, et al., 2006; MAITY, et al., 2009).

Dentre essas drogas destaca-se o ácido kójico que teve sua ação comprovada sobre parasitos, como o helminto *Schistosoma mansoni*, (FITZPATRICK et al., 2007), sobre o protozoário *Leishmania (L.) amazonensis* e na ativação de macrófagos (RODRIGUES et al., 2011, 2014).

O óleo de copaíba amplamente utilizado na medicina popular já teve sua ação demonstrada sobre as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, sendo considerado um agente leishmanicida promissor (ALBUQUERQUE et al., 2016; FERNANDES & FREITAS, 2007).

Para verificar se o óleo de copaíba e a associação AK+OC apresentavam algum efeito citotóxico em macrófagos humanos foi realizado após o tratamento por 24 horas o teste

do MTT. O MTT visa determinar a atividade mitocondrial das células, uma vez que as células viáveis formam uma solução colorimétrica que é lida por espectrofotometria, e células não viáveis não metabolizam o MTT. Em todos os testes utilizados não houve redução significativa do número de células viáveis após tratamento quando comparadas ao controle. As células tratadas com a associação AK+óleo de copaíba e somente com o óleo de copaíba ambas na concentração de 30 µg/mL demonstraram ter uma taxa de viabilidade semelhante ao controle, sugerindo que o óleo de copaíba isoladamente e em associação com o AK possa atuar na ativação e, conseqüentemente, retardando a apoptose das mesmas.

Esses resultados corroboram com estudos realizados por Rodrigues e colaboradores (2011) em que o AK não apresentou efeito citotóxico para macrófagos peritoneais provenientes de camundongos após tratamento por 1 hora. Posteriormente, Costa (2012) observou que o AK também não é citotóxico para monócitos humanos, após tratamento por 24, 48, 72 e 96 horas. Outros estudos, como o de Santos et al (2008), somam-se a estes ao demonstrar que camundongos tratados durante 30 dias com óleo de copaíba por via oral na concentração de 100 mg/kg /dia e óleo de copaíba a 4% por via tópica não apresentaram alterações clínicas ou comportamentais.

Rodrigues et al (2014) demonstraram que o ácido kójico é um potente ativador de macrófagos, sendo sua ação mais efetiva sobre as formas amastigotas de *Leishmania*. Sendo assim, foi avaliada a atividade leishmanicida da associação OC+AK em macrófagos infectados e tratados em diferentes concentrações da associação. Foi observado nesse trabalho que células infectadas tratadas com a associação OC+AK na concentração de 30 µg/mL, apresentaram inibição do crescimento de amastigotas no interior dos macrófagos. Já as células tratadas apenas com o óleo de copaíba não apresentaram redução do número de parasitos, o que não concorda com os resultados de Santos et al. (2008), que demonstrou a redução do número de amastigotas em macrófagos infectados e tratados com as concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL por 72 horas. Nossos resultados corroboraram com os de Rodrigues e colaboradores (2014) que demonstrou a ação leishmanicida do AK, inibindo o crescimento de promastigotas na dose de 50µ/mL em células infectadas e tratadas por 72 horas sem afetar a viabilidade da célula hospedeira. Estes resultados sugerem que a ação leishmanicida da associação foi promovida pela ação seletiva do ácido kójico sobre a célula hospedeira infectada ou por um efeito sinérgico dose dependente da associação, sendo necessários mais estudos para a confirmação de tais hipóteses.

Para complementar os resultados obtidos, foi avaliada a produção de NO, uma vez que a produção do mesmo permanece por longos períodos de tempo e os macrófagos utilizam esta via para a eliminação de microrganismos fagocitados, como por exemplo, o parasito *Leishmania* (KORHONEN et al., 2005). Foi observado que houve um aumento na produção de NO nas células tratadas com a associação OC+AK (30+50 µg/mL) quando comparado ao controle sem tratamento. Os dados obtidos com o tratamento associado contradizem os estudos de Rodrigues et.al, (2014) que demonstraram que o ácido kójico na concentração de 50 µg/mL não promoveu efeito estimulatório sobre a produção de NO. Esses dados podem sugerir que a associação AK+OC apresenta ação sinérgica, visto que o óleo de copaíba pode ter sido o responsável por promover a produção deste importante mediador inflamatório.

Com os resultados obtidos é possível sugerir que a associação pode ser considerada promissora para tratamento alternativo de infecção causada por *L. (L.) amazonensis*. Estes dados iniciais servirão como base para futuros estudos com a associação OC+AK e poderão servir para o desenvolvimento de novos medicamentos para a leishmaniose, que possam atuar de maneira eficaz contra o parasito sem causar danos à célula hospedeira.

6. Conclusão

No presente trabalho foi possível concluir que a associação OC+AK:

- Não apresentou efeito citotóxico para a célula hospedeira
- Apresentou atividade leishmanicida contra as formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.
- Estimulou a atividade microbicida em macrófagos tratados através da produção de NO.

7. Referências bibliográficas

- ALAVI-NAINI, R., FAZAELI, A., O'DEMPSEY, T. Tropical treatment modalities for old world cutaneous leishmaniasis: a review. **Praque. Med. Rep.** **113** (2): 105-118, 2012.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, **114**: 325–354. 2007.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS One**, **7**: e35671. 2012.
- AMATO V.S., ANDRADE J.R., DUARTE M.I.S. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. **Acta Trop**, **85** (1): 39-49. 2003.
- ARAUJO, A.R.; PORTELA, N.C.; FEITOSA, A.P.S; SILVA, O.A.; XIMENES R.A.A.; ALVES, L.C.; Fábio André BRAYNER, F.A. Risk factors associated with American cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, **58**:86. 2016.
- ASILIAN, A. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with aminosidine (paromomycin) ointment: double-blind, randomized trial in the Islamic Republic of Iran. **Bulletin of the World Health Organization**, **81** (5): 353-359. 2003.
- BACELLAR O., LESSA H., SCHRIEFER A., MACHADO P., RIBEIRO DE JESUS A., DUTRA W.O., GOLLOB K.J., CARVALHO E.M. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect Immun**, **70** (12): 6734-40. 2002.

BAILEY, M.S.; LOCKWOOD, D.N.J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, **25**: 203–221. 2007.

BAÑULS, A.L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the Leishmanioses: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in Parasitology**, **64**: 1- 109. 2007.

BASHIR, S.; SHARMA, Y.; ELAHI, A.; KHAN, F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. **Inflammation Research**, **65** (1): 1–11. 2016.

BIESKI, G.C., LEONTI, M., ARNASON, J.T., FERRIER, J., RAPINSKI, M., VIOLANTE, I.M.P., BALOGUN, S.O., PEREIRA, J.F.C.A., FIGUEIREDO, R. D.C.F., LOPES, C.R.A.S., SILVA, D.R. da, PACINI A., ALBUQUERQUE, U.P., DE OLIVEIRA, D.T.M. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. **J. Ethnopharmacol.** **173**: 383–423. 2015.

BRANDÃO, M. G., ZANETTI, N. N., OLIVEIRA, P., GRAEL, C. F., SANTOS, A. C. AND MONTE-MÓR, R. L. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, **20** (2): 141–148. 2008.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Editora MS, 2ª Ed.atualizada, 2010. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf. Último acesso em: 12/12/2016.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em Saúde. Brasília: Editora MS, 2º ed. Atualizada, 3º. Reimpressão, 2013. 180 p.

- BRENZAN, M.A. et al. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, **101** (3): 715-722. 2007.
- BURDOCK, G.A. SONI, M.G. CARABIN.I.G. Evaluation of Health Aspects of Kojic Acid in Food.Regulatory. **Toxicology and Pharmacology**, **33**:80–101. 2001.
- CALVOPINA, M.; ARMIJOS, R.X.; HASHIGUCHI, Y. Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **99**: 663–72. 2004.
- CAVALCANTI, D. P.; THIRY, M.; DE SOUZA, W. & MOTTA, M. C. M. The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching, cytochemical and immunocytochemical analysis. **Histochem Cell Biol**, **130**: 1177-1185. 2008.
- CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **J Glob Infect Dis**, **2** (2): 167-176. 2010.
- CHOLEWIŃSKI, M., DERDA, M., HADAŚ, E.. Parasitic diseases in humans transmitted by vectors. **Ann. Parasitol.** **61** (3): 137-157, 2015.
- COSTA, J. P. **Ação do Metabólito Secundário 5-hidroxi-2-hidroximetil gama-pirona isolado de fungos do gênero *Aspergillus* sobre monócitos humanos in vitro**. Dissertação de Mestrado. Belém. Universidade Federal do Pará, 2012. 78p.
- DA SILVA, R.R.P. **Atividade leishmanicida do extrato da Raiz de *Physalis angulata* e sua ação na célula hospedeira**. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. Belém, 2013. 90p.
- DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol Ther**, **22**(6): 491-502. 2009.

- DE ALMEIDA, D.C. G. & BOAVENTURA, M. F. C. Parte 2: Principios básicos. Capítulo 8: Fases do crescimento celular – Curva de crescimento. PERES. C. M. & CURI, R. **Como cultivar células**. Editora Guanabara Koogan S. A. 2005. p. 35-37.
- DE LIMA, J.P.S., PINHEIRO, M.L.B., SANTOS, A.M.G., PEREIRA, J.L.S., SANTOS, D.M.F., BARISON, A., SILVA-JARDIM, I., COSTA, E.V. In vitro antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). **Rev. Virtual Quim**, **4** (6): 692–702. 2012.
- DE OLIVEIRA, C.I., NASCIMENTO, I.P., BARRAL, A., SOTO, M., BARRAL-NETTO, M. Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis. **Parasitol. Int.** **58** (4): 319-324. 2009.
- DE SOUZA, W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. *Curr. Pharm. Des*, **14** (9): 822-838. 2008.
- DEUS, R.J.A.; ALVES, C.N.; ARRUDA, M.S.P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, **13**: 1–7. 2011.
- DEUS, R.J.A.; CARVALHO, A.S.C.; BANNA, D.A.D.S.; ARRUDA, M.S.P.; ALVES, C.N.; SANTOS, A.S. Efeito fungitóxico in vitro do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, **11**: 347–353, 2009.
- EMAMI, S.; HOSSEINIMEHR, S. J.; TAGHDISI, S. M.; AKHLAGHPoor, S. Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. *Bioorg. Med Chem Lett*, **17**:45-48. 2007
- FARIAS, L.H.S.; RODRIGUES, A.P.D; SILVEIRA, F.T.; SEABRA, S.H.; DAMATTA, R.A.; SARAIVA, E.M. & SILVA, E.O. Phosphatidylserine exposure and surface sugars in two *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* strains involved in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis**, **207**: 537-543. 2013.

- FERNANDES, F.F., FREITAS, E.P.S.. ACARICIDAL ACTIVITY OF AN OLEORESINOUS EXTRACT FROM *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology** **147**, 150–154. 2007
- FITZPATRICK, J.M; HIRAI, Y.; HIRAI, H.; HOFFMANN, K. F.Schistosomeeggproduction is dependent upon the activities of two developmentally regulated tyrosinases. **FASEB J.** **21**, (3):823-35. 2007.
- GARCÍA-ALMAGRO, D. Leishmaniasis cutânea. **Revista Pediatria de Atención Primaria**, **96** (1): 1–24, 2005.
- GLOBAL HEALTH – DIVISION OF PARASITIC DISEASES AND MALARIA, 2013. Disponivel em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 22 de dezembro de 2016. Adaptada.
- GOLLOB, K. J. Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. **Parasite Immunol.** V. 36. p. 367–376. 2014.
- GOMES, A.J. et al.The antioxidant action of *Polypodiumleucotomos* extract and kojic acid: reactions with reactive oxygen species. **Braz J Med Biol Res**, **34**: 1487-1494, 2001.
- GOMES, N.M., REZENDE, C.M., FONTES, S.P., MATHEUS, M.E., FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity of Amazonian copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, **12**: 486–492. 2007.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36**: 71–80. 2003.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, **26**: 293–307. 2012.

- GREGORY, D. J.; OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. **Parasitology**, **130**: 27-35. 2005.
- GUPTA, A.K.; GOVER, M.D; NOURI, K.; TAYLOR, S. He treatment of melasma: a review of clinical trials. **J Am AcadDermatol** **55** (6) :1048-65, 2006.
- HAGE, A. A. P. **Caracterização lipídica de duas cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* casadoras da Leishmaniose tegumentar americana**. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém. 2013. 53p.
- HE, C.; CARTER, A.B. The metabolic prospective and redox regulation of macrophage polarization. **J. Clin. Cell Immunol.** **6** (6): PII:371. 2015.
- HENRIQUES, C.; ATELLA, G. C.; BONILHA, V. L.; DE SOUZA, W. Biochemical analysis of proteins and lipids found in parasitophorous vacuoles containing *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, **89**: 123-133. 2003.
- HORTELANO, S.; TRAVÉS, P. G.; ZEINI, M.; ALVAREZ, A. M.; BOSCA, L. Sustained nitric oxide delivery delays nitric oxide-dependent apoptosis in macrophages: contribution to the physiological function of activated macrophages. **Journal of immunology**, **171**: 6059–64. 2003.
- HURRELL, B.P., REGLI, I.B., TACCHINI-COTTIER, F. Different *Leishmania* species drive distinct neutrophil functions. **Trends Parasitol.** **32** (5): 392-401. 2016.
- JABLONSKI, K. A.; AMICI, S. A.; WEBB, L. M.; RUIZ-ROSADO, J. DE D.; POPOVICH, P. G.; PARTIDA-SANCHEZ, S.; GUERAU-DE-ARELLANO, M. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. **PloS one**, **10** (12): e0145342. 2015.

- JAUME SANZ-BISETA, JOSÉ CAMPOS-DE-LA-CRUZB, MIRBEL A. EPIQUIÉN-RIVERAC, SALVADOR CAÑIGUERALA A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). **Journal of Ethnopharmacology**, **122** (2): 333–362. 2009.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol**, **9** (8): 604-15. 2011.
- KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; BERTELS, S., SIEMS, K. Antileishmanial Activities of Aphidicolin and Its Semisynthetic Derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **45** (1): 288-92. 2001.
- KORHONEN, R. et al. Nitric oxide production and signaling in inflammation. Current Drug Targets. **Inflammation and Allergy**, **4**: 471-479. 2005.
- KVIST, L. P., CHRISTENSEN, S. B., RASMUSSEN, H. B., MEJIA, K. AND GONZALEZ, A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and Leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, **106** (3): 390–402. 2006.
- LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Rev. Pan-Amazônica Saúde**, **1**(2): 13–32, 2010.
- LAURELLA, L.C., FRANK, F.M., SARQUIZ, A., ALONSO, M.R., GIBERTI, G., CAVALLARO, L., CATALÁN, C.A., CAZORLA, S.I., MALCHIODI, E., MARTINO, V.S., SÜLSEM, V.P. In vitro evaluation of antiprotozoal and antiviral activities of extracts from Argentinean Mikania species. **Sci. W. J:** **2012**.2012.
- LIMA, S.R.M., VEIGA JUNIOR, V.F., CHRISTO, H.B., PINTO, A.C., FERNANDES, P.D. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, **17**: 1048–1053. 2003.

- LIU, D.; UZONNA, J.E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2: 83. 2012.
- MAITY, P. C.; BHATTACHARJEE, S.; MAJUMDAR, S. & SIL, A. K. Potentiation by cigarette smoke of macrophage function against Leishmania donovani infection. **Inflamm Res**, 58: 22–29. 2009.
- MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F.; SCHUBACH, A.O. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 39-56 p.
- MCCONVILLE, M. J.; DE SOUZA, D.; SAUNDERS, E.; LIKIC, V. A. & NADERER, T. Living in a phagolysosome; metabolism of Leishmania amastigotes . **Trends in Parasitol**, 23: 368–375. 2007.
- MCGWIRE, B.S., SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Q. J. Med.** 107 (1): 7-14, 2014.
- MENEZES, J.P.B., GUEDES, C.E.S., PETERSEN, A.O.L.A., FRAGA, D.B.M., VERAS, P.S.T. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **Biomed. Res. Int.** 215 :815023, 2015.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Serie A. Normas e Manuais Técnicos. 2 ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2007. 180 p. [s.l: s.n.].**
- MISHRA, B.B., KALE, R.R., SINGH, R.K., TIWARI, V.K. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, 80: 81-90. 2009.
- MOHAMAD, R.; MOHAMED, M.S.; SUHAILI, N.; SALLEH, M.M.; ARIFF, A.B. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. **Biotechnol. Mol.Biol. Rev**, 5 (2): 24-37. 2010.

- MOHAMMADPOUR, M.; BEHJATI, M.; SADEGUI, A.; FASSIHI, A. Wound healing by topical application of antioxidant iron chelators: kojic acid and deferiprone. **International. Wound Journal**. 2012.
- MONGE-MAILLO, B., LÓPEZ-VÉLEZ, R. Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. **Clin. Infect. Dis.** **60** (9): 1398-1404, 2015.
- MONZOTE, L. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, **1**: 9-19. 2009.
- MOREIRA, R.C., REBELO, J.M., GAMA, M.E., COSTA, J.M. Knowledge level about of American tegumentary leishmaniasis (ATL) and use of alternative therapies in an endemic area in the Amazon Region in the State of Maranhão, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, **18**: 187–195. 2002.
- MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, **73** (2): 209–212. 2003
- NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, **6** (9): 754-65. 2008.
- NEVES, D. P., *et al.*. Parasitologia humana. 12. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2011.
- NOGUEIRA, R.C., ROCHA, V.P., NONATO, F.R., TOMASSINI, T.C., RIBEIRO, I.M., DOS SANTOS, R.R., SOARES, M.B. Genotoxicity and antileishmanial activity evaluation of *Physalis angulata* concentrated ethanolic extract. **Environ Toxicol. Pharmacol**, **36** (3): 1304-1311. 2013.
- NOHYNEK, G.J. *et al.* An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. **Food and Chemical Toxicology**, **42**: 93-105. 2004.
- OLIVEIRA, C. C.; OLIVEIRA, S. M.; GODOY, L. M. F.; GABARDO, J.; BUCHI, D. DE F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **Journal of Infection**, **52** (6): 420–432. 2006.

- OLIVEIRA, D.R., KRETTLI, A.U., AGUIAR, A.C.C., LEITÃO, G.G., VIEIRA, M.N., MARTINS, K.S., LEITÃO, S.G. Ethnopharmacological evaluation of medicinal plants used against malaria by quilombola communities from Oriximiná, Brazil. **J. Ethnopharmacol**, 173: 424–434. 2015.
- OLIVEIRA, R. V. M., OHARA, M. T., VILA, M. M. D. C., GONÇALVES, M. M. In vitro evaluation of copaiba oil as a kojic acid skin enhancer. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 46 (2). 2010.
- PACE, D. Leishmaniasis. **J. Infect**, 69: S10eS18. 2014.
- PACHECO, T.A.R.C.; BARATA, L.E.S.; DUARTE, M.C.T. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera* spp.) balsams. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8: 123–124. 2006.
- PETERS, N. C. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, 321: 970-974. 2008.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B. & BROOKER. S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, 7: 581–96. 2007. RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Macrophage interaction with neutrophils regulate *Leishmania* major infection. **J Immunol**, 172: 4454-4462. 2004.
- ROBINSON, J. M.; OHIRA T. & BADWEY J. A. Regulation of the NADPH-oxidase complex of phagocytic leukocytes. Recent insights from structural biology, molecular genetics, and microscopy. **Histochem Cell Biol**, 122: 293–304. 2004.
- RODRIGUES, A. P. D.; CARVALHO, A.S.; SANTOS, A. S.; ALVES, C. N.; NASCIMENTO, J.L.; SILVA, E.O. Kojic acid, a secondary metabolite from sp., acts as an inducer of macrophage activation. **Cell Biology International**, 1: 335-343. 2011.

- RODRIGUES, A. P. D.; FARIAS, L. H. S.; CARVALHO, A. S. C.; SANTOS, A. S.; DO NASCIMENTO, J. L. M; SILVA, E.O. A Novel Function for Kojic Acid, a Secondary Metabolite from *Aspergillus Fungi*, as Antileishmanial Agent. **Plos One**, **9**: e91259. 2014.
- RODRIGUES, I.A., MAZOTTO, A.M., CARDOSO, V., ALVES, R.L., AMARAL, A.C.F., SILVA, J.F.A., PINHEIRO, A.S., VERMELHO, A.B. Natural products: insights into leishmaniasis inflammatory response. **Mediators. Inflamm.** **2015**: 835910, 2015.
- ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, 1903.
- ROSSETI, A.S. Bortedella pertussis: **Participação da arginase. TGF- β e TRL-4 no controle da síntese de óxido nítrico em macrófagos derivados da medula óssea murina.** Dissertação (Mestrado em Interunidades em Biotecnologia) - São Paulo, Universidade de São Paulo/Instituto Butantan, 2009, 51p.
- SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology** **3**: 1041-1047. 2002.
- SACKS. D. L; PERKINS, P. V. Identification of na infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, **223**: 1417-1419. 1984.
- SAKTHIANANDESWAREN, A.; FOOTE, S. T.; HANDMAN, E. The role of host genetics in Leishmaniasis. **Trends Parasitology**, **25** (8): 383–391. 2009.
- SANTOS, A.O., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B.P., VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO, A.C., NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **103**: 277–281. 2008.

SANZ-BISET, J.; CANIGUERAL, S. Plant use in the medicinal practices known as “strict diets” in Chazuta valley (Peruvian Amazon). **Journal of Ethnopharmacology**, **137**: 271–288. 2011.

SARMENTO, M. A. **Estudo da Resposta Microbicida de Macrófagos Peritoneais de Camundongo Durante a Interação com as Espécies Leishmania (Leishmania) amazonensis e Leishmania (Viannia) shawi**. Trabalho de Conclusão de Curso. Belém. Universidade Federal do Pará. 2004.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – Ministério da Saúde (SVS-MS.), Brasília, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs>>. Acesso em 02/12/2016.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plante derived therapeutics for the treatment of leishmaniasis. Phytomedicine. **International journal of phytotherapy and phytopharmacology**, **18** (12), 1056-69, 2011.

SILVEIRA F. T., LAINSON, R.; GOMES C. M. C.; LAURENTI, M. D. & CORBETT, C. E. P. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous Leishmaniasis. **Parasite Immunology**, **31** (8): 423-431. 2009

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R. & CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **99** (3): 239–251. 2004.

SILVEIRA, F. T.; MÜLLER, S. R.; DE SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D. & CORBETT, C. E. P. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania* (V.) *braziliensis* e *Leishmania* (L.) *amazonensis*. **Rer. Paraense Med**, **22** (1): 9-20. 2008.

- SMIT, N.; VICANOVA, J.; PAVEL, S. The Hunt for Natural Skin Whitening Agents. *Int. J. Mol. Sci.*, **10**: 5326-5349. 2009.
- SOARES, R. P. P.; CARDOSO, T. L.; BARRON, T.; ARAÚJO, M. S. S.; PIMENTA, P.F.P.; TURCO, S.J. Leishmania braziliensis: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *International Journal for Parasitology*, **35**: 245–253. 2005.
- SOUZA, A. S. et al. Resistance of Leishmania (Viannia) braziliensis to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. *BMC Infect Dis*, **10**: 1-11 .2010.
- SOUZA, C. S. F.; MAIA, H.; CALABRESE, K. S.; ROSA, M. S. S.; CUPOLILO, S. M. N.; DA COSTA, S. C. G. & DO VALLE, T. Z. As Leishmanioses. Departamento de protozoologia. **Fundação Osvaldo Cruz**. 1997.
- SUNDAR, S., MORE, D.K., SINGH, M.K., SINGH, V.P., SHARMA. S., MAKHARIA, A., KUMAR, P.C., MURRAY, H.W. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin. Infect. Dis*, **31** (4): 1104–1107. 2000.
- TAMURA, T.; MITSUMORI, K.; TOTSURA, Y.; WAKABAYASHI, K.; KIDO, R.; KASAI, H.; NASU, M.; HIROSE, M. Absence of in vivo genotoxic potential and tumor initiation activity of kojic acid in the rat thyroid. *Toxicology* **222**:213-224. 2006.
- TANAKA, A. K.; GORIN, P. A. J.; STRAUS, A. H. Role of Leishmania (L.) amazonensis amastigote glycosphingolipids in macrophage infectivity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **40** (6): 799-806. 2007.
- TEIXEIRA, D.E. Atlas didático: **Ciclo de vida da Leishmania**. 1º Ed. Rio de Janeiro. Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013.

- TEMPONE, A.G. ET AL. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, **103** (5): 443-9. 2008.
- TRINCONI, C. T., REIMÃO, J. Q., YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U., DANILO C. MIGUEL, ULIANA, S. R. B. Combination Therapy with Tamoxifen and Amphotericin B in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **58**: 2608–2613. 2014.
- TRIPATHI, A. & GUPTA C.M. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **128**: 1–9. 2003.
- VALE, E. C. S. & FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, **80**: 421-428. 2005.
- VAN ZANDBERGEN, G., HERMANN, N., LAUFS, H. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infect. Immun.** **70** (8): 4177- 4184. 2002.
- VANNIER – SANTOS, M. A.; MARTINY, A. & DE SOUZA, W. Cell Biology of *Leishmania* spp.: Invading and Evading. **Curr Pharmac Design**, **8**: 297–318. 2002.
- VARGAS, F.S; PATRÍCIA ALMEIDA, P.D.O, ARANHA, E.S.P, BOLETI, A.P.A; NEWTON, P.; VASCONCELLOS, M.C.; VEIGA JUNIOR, V.F.V & LIMA E.S. Biological Activities and Cytotoxicity of Diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. **Molecules**, **20** (4): 6194-6210. 2015.
- VEIGA JUNIOR, V.F., ZUNINO, L., PATITUCCI, M.L., PINTO, A.C., CALIXTO, J.B. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of

Copaifera multijuga Hayne and its fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, **58**: 1405–1410. 2006.

VON STEBUT, E. Leishmaniasis. **J. Dtsch. Dermatol. Ges**, **13** (3): 191-200. 2015

WANG, M. Z., et al. Novel arylimidamides for treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **54** (6): 2507-16. 2010.

WEINBERG, J. B. Mononuclear phagocytes. In: GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. (Eds.). **Wintrobe's clinical hematology**. 12 ed. Philadelphia: Willians & Wilkins, 2009. p. 249–281.

WERNECK, G.L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and cocerns related to reservoir control. **Rev. Saude Publica**, **48** (5): 851–856. 2014.

WHO EXPERT COMMITTEE (WHO). **Control of the leishmaniases**. WHO technical report series; nº. 375. Leishmaniasis, January 2014. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> >. Acesso em: 29/11/2016

WHO EXPERT COMMITTEE. **Control of the leishmaniases**. WHO technical report series;no. 949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3307017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em 29/11/2016.

WHO, W. H. O. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases**. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the leishmaniasis. WHO technical report. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em 29/11/2016.

XUAN, W.; QU, Q.; ZHENG, B.; XIONG, S.; FAN, G.-H. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. **Journal of leukocyte biology**, **97** (1): 61–9. 2015.

ZAMBRANO-VILLA, S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J. C.; ORTIZ-ORTIZ, L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends in Parasitology**, **18** (6) :272–278. 2002.

Anexo 1: Comitê de Ética

CEUA



CERTIFICADO n° 19/2015

Certificamos que o projeto intitulado "Associação de bioprodutos com potencial terapêutico para o tratamento da Leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania (Leishmania Amazonensis)*", protocolo n° 23/2015, sob a responsabilidade de **Ana Paula Drummond Rodrigues**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO EVANDRO CHAGAS-IEC.

Vigência do Projeto	06/2015 a 06/2018		
Espécie / Linhagem	Camundongo isogênico (Balb/c)		
Nº de animais	480		
Peso	20-30g		
Idade	8 a 10 semanas		
Sexo	M		
Origem	SACPA/IEC/SVS/MS		

De acordo com a Resolução Técnica nº 5, de 27 de abril de 2013 do CONCEA

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Deverá ser encaminhado relatório incluindo os resultados finais da pesquisa, no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

Ananindeua-PA, 15 de julho de 2015.


Ana Cláudia Magalhães de Oliveira
CEUA/SEAC/IEC/SVS/MS


Livia Medeiros Neves Casseb
Coordenadora da CEUA

AV. ALVARANTE SAMPURRI 400 - JARDIM SAMPURRI - CEP: 48060-000 - BELÉM/PA - CNPJ: 28.388.359/0001-20 FONE: (91) 344.4032 - FAX: (91) 344.4033
2015 ANANINDEUA - PA 13121-5 - KM 11, S/N - BARRIO - LEVILÂNDIA - CEP: 67120-000 - ANANINDEUA-PA - FONE: (91) 3114-2200
http://www.iec.pa.gov.br