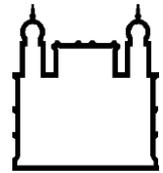




**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DO CONTROLE DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA  
BRAZILIENSIS IN VITRO E IN VIVO* PELOS CARREADORES  
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS COM ANFOTERICINA B (CLN-  
ANB)**

**JÉSSICA REBOUÇAS SILVA**

**Salvador – Bahia**

**2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**AVALIAÇÃO DO CONTROLE DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA  
BRAZILIENSIS IN VITRO E IN VIVO* PELOS CARREADORES  
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS COM ANFOTERICINA B (CLN-  
ANB)**

**JÉSSICA REBOUÇAS SILVA**

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Valéria de Matos Borges

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Franciane Marquele de Oliveira

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Bahia**

**2018**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S586a Silva, Jéssica Rebouças.  
Avaliação do controle da infecção por *Leishmania braziliensis in vitro* e *in vivo* pelos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados com Anfotericina B (CLN-ANB). / Jéssica Rebouças Silva. - 2018.  
64 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Valéria de Matos Borges, Laboratório de Inflamação e Biomarcadores.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2018.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. *L. braziliensis*. 3. Anfotericina B.  
4. Tratamento. 5. Macrófago. I. Título.

CDU 616.993.161

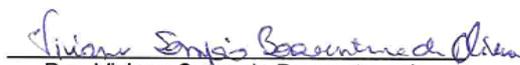
**“AVALIAÇÃO DO EFEITO LEISHMANICIDA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS COM ANFOTERICINA B (CLN-AnB) NA INFECÇÃO POR LEISHMANIA BRAZILIENSIS”.**

**JÉSSICA REBOUÇAS SILVA**

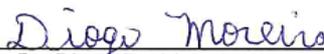
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Salvador, 01 de agosto de 2018.

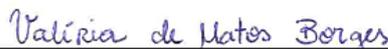
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Viviane Sampaio Boaventura de  
Oliveira  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ



Dra. Valéria de Matos Borges  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Valéria Borges, por todo carinho, dedicação e orientação.

À minha co-orientadora Dr<sup>a</sup> Franciane Marquele, a Dr<sup>a</sup> Andresa Berretta e à Mcs Maraine Tadini, responsáveis pelo desenvolvimento e caracterização dos CLNs, pela confiança e dedicação.

A Dr<sup>a</sup> Camila Oliveira, aos Msc Valdomiro Moitinho e Paulo Mattos e à Danielle Devequi por toda a ajuda e orientação no trabalho *in vivo*.

À Thiale Borges por sempre ser solícita, prestativa e companheira.

À Dr. Fábio Formiga por toda a ajuda nos ensaios de captação.

Às Mcs Larissa Mendes e Ana Carolina Borges, ambas do LETI, por toda orientação sobre a via de administração de fármaco *in vivo*.

Aos *Valerianos* e a todos os estudantes e pesquisadores do LIB por tornarem o nosso laboratório um ambiente de trabalho amigável e próspero.

À Márcio dos Santos e à Dr. Cláudio Figueira, ambos da plataforma de Microscopia do IGM-Fiocruz-BA, pelas orientações nos ensaios de confocal.

Aos profissionais da biblioteca do CPqGM-FIOCRUZ BA, em especial à Sra. Ana Maria Fiscina pelo bom trabalho realizado e pela atenção na correção da versão final da dissertação.

Ao Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/FIOCRUZ/BA e à CAPES, pelo suporte técnico e financeiro.

SILVA, Jéssica Rebouças. Avaliação do controle da infecção por *Leishmania braziliensis* *in vitro* e *in vivo* pelos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados com Anfotericina B (CLN-ANB). 64 f. il. Mestrado (Dissertação em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO.** O arsenal terapêutico para tratamento da leishmaniose possui sérias limitações, como alto custo e toxicidade. Os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs) estão emergindo como uma abordagem promissora devido à alta capacidade de carregamento de drogas, perfil de liberação controlado dos fármacos veiculados, maior estabilidade e reduzido custo. **RESULTADOS e DISCUSSÃO.** Neste trabalho, demonstramos pela primeira vez a capacidade dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados com Anfotericina B (CLN-AnB) em controlar a infecção por *L. braziliensis* *in vitro* e *in vivo*. O CLN-AnB mostrou-se menos tóxico em relação à anfotericina livre (AnB) e à anfotericina B desoxicolato (AnB-D) em avaliação *in vitro*. A contagem de promastigotas viáveis, recuperadas no sobrenadante de macrófagos infectados, revelou IC<sub>50</sub> de  $5.3 \pm 0.558$ ;  $13 \pm 0.577$  e  $11.7 \pm 1.73$  ng/mL e índice de seletividade de 813; 830 e 1046, para AnB, AnB-D e CLN-AnB, respectivamente. As análises por microscopia confocal mostraram a captação dos CLNs por macrófagos infectados já após uma hora de incubação e sua maior entrada com 48 horas. O efeito imunomodulador das formulações foi avaliado pela quantificação de óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) no sobrenadante de macrófagos infectados e tratados com o IC<sub>50</sub> das formulações. Somente a AnB foi capaz de induzir significativamente NO e TNF- $\alpha$ . Para avaliação *in vivo*, camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha com *L. braziliensis* e tratados com antimonial pentavalente (Sb<sup>5+</sup>, Glucantime<sup>®</sup>), anfotericina B lipossomal (AnB-L, Ambisome<sup>®</sup>) ou com CLN-AnB. Após seis semanas de infecção, a análise do tamanho da lesão e da carga parasitária da orelha infectada mostrou eficácia semelhante entre o Sb<sup>5+</sup> e o CLN-AnB quando comparado com animais que não receberam tratamento. **CONCLUSÃO.** Os resultados mostraram características quanto à segurança e a eficácia do CLN-AnB em controlar a infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. braziliensis*. Dessa forma, nossos dados sugerem que os CLN-AnB constituem uma formulação promissora de Anfotericina B para tratamento da Leishmaniose Tegumentar. **Palavras-chave:** Leishmaniose Cutânea; *L. braziliensis*; Anfotericina B; Tratamento; Nanocarreadores; Macrófago.

SILVA, Jéssica Rebouças. Evaluation of the control of *Leishmania braziliensis* infection *in vitro* and *in vivo* by Nanostructured Lipid Carriers with Amphotericin B (NLC-AmB). 64 f. il. Mestrado (Dissertação em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION.** The therapeutic arsenal for treating leishmaniasis has serious limitations, such as high cost and toxicity. Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) are emerging as a promising approach because of the high drug loading capacity, controlled release profile of the drugs, greater stability and reduced cost. **RESULTS and DISCUSSION.** In this work, we demonstrated for the first time the ability of Nanostructured Lipid Carriers with Amphotericin B (NLC-AmB) to control *L. braziliensis* infection *in vitro* and *in vivo*. NLC-AmB was less toxic in relation to free amphotericin (AmB) and amphotericin B deoxycholate (AmB-D) in *in vitro* evaluation. The counts of viable promastigotes recovered in the supernatant of infected macrophages revealed IC<sub>50</sub> of  $5.3 \pm 0.558$ ;  $13 \pm 0.577$  and  $11.7 \pm 1.73$  ng / mL and selectivity index of 813; 830 and 1046, for AmB, AmB-D and NLC-AmB, respectively. The analysis by confocal microscopy showed the uptake of the NLCs by infected macrophages already after one hour of incubation and their greater entry with 48 hours. The immunomodulatory effect of the formulations was evaluated by the quantification of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in the supernatant of infected macrophages treated with the IC<sub>50</sub> of the formulations. Only AmB was able to induce significantly NO and TNF- $\alpha$ . For *in vivo* evaluation, BALB / c mice were infected in the ear dermis with *L. braziliensis* and treated with pentavalent antimonial (Sb<sup>5+</sup>, Glucantime®), liposomal amphotericin B (AmB-L, Ambisome®) or with NLC-AmB. After six weeks of infection, analysis of lesion size and parasite load of the infected ear showed similar efficacy between Sb<sup>5+</sup> and NLC-AmB when compared to animals that did not receive treatment. **CONCLUSION.** The results showed characteristics regarding the safety and efficacy of NLC-AmB in controlling the infection *in vitro* and *in vivo* by *L. braziliensis*. Thus, our data suggest that NLC-AmB constitute a promising new formulation of Amphotericin B for the treatment of Cutaneous Leishmaniasis.

**Keywords:** Cutaneous Leishmaniasis; *L. braziliensis*; Amphotericin B; Treatment; Nanocarriers; Macrophage.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp. .....	2
<b>Figura 2.</b> Casos de Leishmaniose Tegumentar por UF – Brasil, 2015 .....	3
<b>Figura 3.</b> Molécula de Anfotericina B .....	9
<b>Figura 4.</b> Estrutura esquemática dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados .....	15
<b>Figura 5.</b> CLN-AnB são citocompatíveis <i>in vitro</i> .....	25
<b>Figura 6.</b> Determinação do IC <sub>50</sub> dos CLN-AnB sobre a forma intracelular de <i>L. braziliensis</i> .....	27
<b>Figura 7.</b> Efeito leishmanicida das diferentes formulações de Anfotericina B .....	28
<b>Figura 8.</b> Localização intracelular dos CLNs .....	30
<b>Figura 9.</b> Modulação da produção de óxido nítrico e TNF- $\alpha$ pelas diferentes formulações de Anfotericina B. ....	32
<b>Figura 10.</b> Tratamento <i>in vivo</i> com CLN-AnB reduz infecção por <i>L. braziliensis</i> .....	34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Efeito leishmanicida e citotóxico das diferentes formulações de Anfotericina B.....	27
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AnB	Anfotericina B
AnB-D	Anfotericina B Desoxicolato de Sódio
AnB-DC	Anfotericina B Dispersão Coloidal
AnB-CL	Anfotericina B Complexo Lipídico
AnB-L	Anfotericina B Lipossomal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLN-AnB	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados com Anfotericina B
CLN-Ø	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados Vazios
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol-diidrocloro
DDS	<i>Drug Delivery Systems</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína Verde Fluorescente)
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i> (Geralmente Reconhecido como Seguro)
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Alta Densidade)
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Baixa Densidade)
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MDMO	Macrófagos Derivados de Medula Óssea
NO	<i>Nitric Oxide</i> (Óxido nítrico)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato-Salino)
Sb <sup>+5</sup>	Antimonial Pentavalente
SBF	Soro Bovino Fetal
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
VP	Vacúolo Parasitórofo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE .....	1
1.2	TRATAMENTOS .....	4
1.2.1	Antimoniais pentavalentes (Sb <sup>+5</sup> ).....	4
1.2.2	Pentamidina® .....	6
1.2.3	Miltefosina® .....	7
1.2.4	Paromomicina® .....	7
1.3	ANFOTERICINA B .....	8
1.3.1	Mecanismo de ação .....	9
1.3.2	Anfotericina B desoxicolato.....	11
1.3.3	Formulações Lipídicas .....	12
1.4	CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS .....	14
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
4.1	OBJETIVO GERAL .....	18
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>5</b>	<b>DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
6.1	PREPARAÇÃO DOS CLNs.....	20
6.2	FÁRMACOS.....	20
6.3	ANIMAIS.....	20
6.4	PARASITOS .....	21
6.5	OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA.....	21
6.6	AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE DOS CLNs EM MDMO.....	21
6.7	DETERMINAÇÃO DO IC <sub>50</sub> DO CLN-ANB SOBRE A VIABILIDADE INTRACELULAR DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> .....	22
6.8	AVALIAÇÃO DA CAPTAÇÃO ( <i>UPTAKE</i> ) DOS CLN-ANB POR MACRÓFAGOS MURINOS .....	22
6.9	QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E TNF- $\alpha$ .....	23
6.10	AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS BALB/C COM CLN-ANB.....	23
6.11	QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DO LINFONODO DRENANTE E ORELHA .....	24
6.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	24

<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	25
7.1	CLN-AnBs MOSTRAM-SE MENOS TÓXICOS PARA MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS .....	25
7.2	REDUÇÃO DA VIABILIDADE INTRACELULAR DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> PELOS CLNs-ANB .....	26
7.3	CLNs SÃO RAPIDAMENTE CAPTADOS POR MACRÓFAGOS INFECTADOS .....	29
7.4	MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E TNF- $\alpha$ PELAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE ANFOTERICINA B .....	32
7.5	AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR <i>L. BRAZILIENSIS IN VIVO</i> .....	33
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	40
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41
	<b>ANEXOS</b> .....	54
	<b>Artigo 1:</b> Parasite Killing of <i>Leishmania (V) braziliensis</i> by Standardized Propolis Extracts....	54

## 1. INTRODUÇÃO

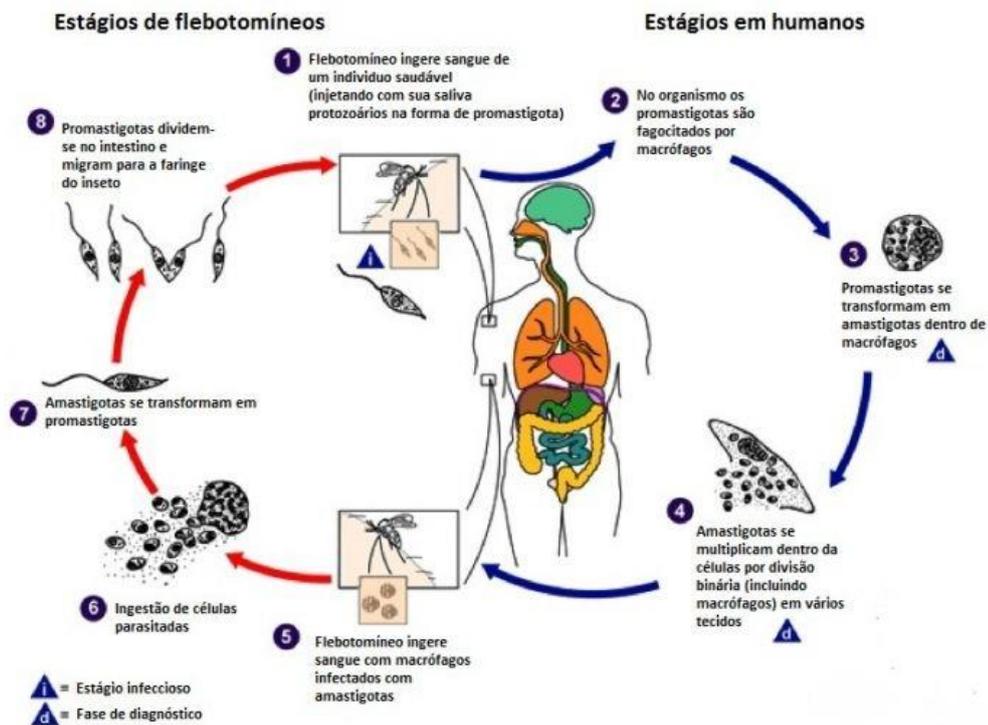
### 1.1 ASPECTOS GERIAS DA LEISHMANIOSE

A leishmaniose constitui um conjunto de doenças não contagiosas, com aspectos clínicos heterogêneos e causada por protozoários do gênero *Leishmania* (KUMAR and ENGWERDA, 2014). Considerada como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN) pela Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que cerca 12 milhões de pessoas estejam infectadas e que, aproximadamente, 350 milhões de pessoas vivem em áreas caracterizadas pela transmissão ativa de *Leishmania*, em países atingidos pela pobreza no Sudeste Asiático, África Oriental e América Latina, principalmente (SAVOIA, 2015; WHO, 2017)

O ciclo de transmissão tem início quando a fêmea de insetos da subfamília Phlebotominae (Díptera, Psychodidae), denominados genericamente de flebotomos, regurgita promastigotas metacíclicas de *Leishmania* – forma móvel e altamente infectante – juntamente com sua saliva na derme do hospedeiro vertebrado, no momento do repasto sanguíneo. Os danos nos tecidos causados pela probóscide do inseto vetor e as substâncias presentes em sua saliva – moléculas com propriedades farmacológicas já descritas como vasodilatadoras, anticoagulantes e com efeitos imunomodulatórios (PRATES et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2014; LESTINOVA et al., 2017) – são capazes de gerar um compartimento na derme denominado lago sanguíneo, o que facilita a obtenção de sangue pelo inseto vetor, além de ser um potente estímulo para o recrutamento de células do sistema imune. No lago sanguíneo, as promastigotas são fagocitadas por neutrófilos e macrófagos. Dentro do vacúolo parasitóforo - organela formada a partir da fusão do fagossoma, gerado durante a fagocitose do parasito, com os lisossomos – as promastigotas se diferenciam em amastigotas - forma evolutiva redonda e imóvel - (PESSOA et al., 2016). As amastigotas passam então a se multiplicar até que as células infectadas são lisadas e as amastigotas liberadas para o meio extracelular, a fim de infectar e parasitar novas células.

O ciclo completa-se quando, em um novo repasto sanguíneo, fêmeas do vetor flebotomíneo não infectadas se alimentam de sangue do hospedeiro vertebrado contendo células infectadas pelas formas amastigotas de *Leishmania*. No trato digestivo do vetor, ocorre rompimento da membrana dos macrófagos e as amastigotas liberadas diferenciam-se na forma promastigota, onde se fixam e sofrem uma série de modificações bioquímicas em sua superfície, perdem a capacidade de adesão ao epitélio do intestino do vetor, tornando-se móveis e

altamente infectantes, em um processo denominado metaciclogênese. Assim, as promastigotas metacíclicas migram para a probóscide do inseto vetor, podendo iniciar um novo ciclo de transmissão durante um novo repasto sanguíneo do flebotomo (GOSSAGE, ROGERS e BATES, 2003; SINAN/SVS/MS, 2013) (Figura 1).

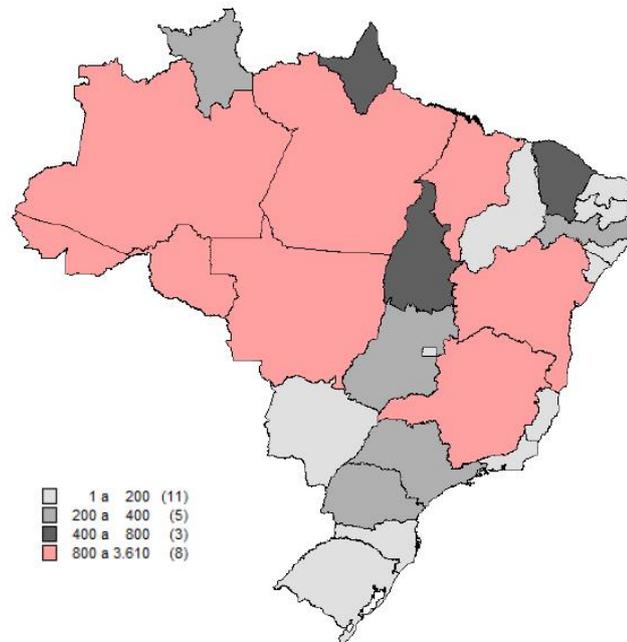


**Figura 1.** Ciclo biológico da *Leishmania* sp. (Adaptado de <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>).

As diversas manifestações clínicas da leishmaniose são um resultado da interação entre vários fatores, como a espécie de *Leishmania* envolvida, virulência da cepa, quantidade de parasitos inoculados no momento da infecção, *background* genético do hospedeiro e da resposta imunológica por ele desenvolvida. De uma forma geral, a doença apresenta-se sob duas formas principais: a Leishmaniose Tegumentar, que varia desde lesões cutâneas localizadas, à lesões difusas e disseminadas (formas raras de LT), bem como à lesões mucocutâneas; e a Leishmaniose Visceral, forma clínica potencialmente letal, caso não seja tratada adequadamente (CHOUHAN et al., 2014; PACE, 2014).

A leishmaniose tegumentar (LT) é a forma clínica mais comum de leishmaniose. Estima-se que o número de novos casos anuais esteja entre 0.7-1.2 milhões, onde 75% dos casos

ocorrem predominantemente no Afeganistão, Brasil, República Islâmica do Irã, Iraque e na República Árabe da Síria. (BRASIL, 2007b; WHO, 2012). Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, a LT é encontrada em todos os estados brasileiros (Figura 2), com relato de 19.395 números de casos em 2015 e 12.690 números de casos em 2016, mantendo-se valores semelhantes em anos anteriores, denotando assim, característica de doença endêmica nacional. As regiões norte e nordeste do Brasil apresentaram o maior número de casos registrados em 2016 (5.075 e 3.166, respectivamente). Na Bahia, a LT encontra-se dispersa por todo o estado, com existência de focos em 25 das 29 Regiões de Saúde (86,2%). O número de casos relatados em 2016 foi de 1.724, indicando um coeficiente de detecção médio de 11,3 casos/100.000 habitantes (SESAB, 2016; BRASIL, 2017).



**Figura 2.** Casos de Leishmaniose Tegumentar por UF – Brasil, 2015.  
Adaptado de BRASIL, 2017.

No Brasil, as espécies de *Leishmania* relacionadas à LT são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) lainsoni* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, das quais a espécie *Leishmania (V.) braziliensis* é o principal agente etiológico da LT (BRASIL, 2017; DE OLIVEIRA & BRODSKYN, 2012).

A infecção causada por *L. braziliensis* pode progredir para duas formas subclínicas diferentes: a leishmaniose cutânea localizada (LCL) e a leishmaniose mucosa ou mucocutânea (LMC), quando ocorre disseminação do parasito para o trato nasofaríngeo. A LCL é a subforma

clínica mais comum da LT e é caracterizada pela presença de pápula eritematosa, seguida de nódulo e posterior o surgimento de úlceras múltiplas na pele, com formato redondo ou ovalado, bordas proeminentes, eritematosas e de fundo granuloso, localizadas principalmente nas áreas expostas do corpo, acessíveis à picada do vetor flebotomíneo. As lesões causadas por *L. braziliensis* possuem infiltração dérmica mais modesta na qual macrófagos e parasitas são geralmente escassos, devido à forte resposta CD4 tipo-Th1, com produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e óxido nítrico (NO). A cura ocorre ao longo de vários meses/anos e pode deixar uma cicatriz e alterações permanentes na pigmentação da pele, o que pode comprometer o bem-estar psíquico e social dos indivíduos acometidos. Apesar de não apresentar risco de vida ao indivíduo acometido, há uma grande variabilidade no tempo de cicatrização, aumento da frequência de falha terapêutica e risco de desenvolvimento de lesões mucosas, meses ou anos após uma lesão cutânea primária (SILVEIRA et al., 2004; BOAVENTURA et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2008; BRASIL, 2007a).

## 1.2 TRATAMENTOS

### 1.2.1 Antimoniais pentavalentes (Sb<sup>+5</sup>)

As drogas de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (Sb<sup>+5</sup>) desde 1945 (LIMA et al., 2007). Há duas apresentações comerciais de antimônio pentavalente empregadas na prática clínica, o antimônio de N-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>) e o estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>), não comercializado no Brasil (BRASIL, 2017). Essas apresentações são quimicamente semelhantes, e sua toxicidade e eficácia estão relacionadas ao seu conteúdo antimônio: a solução de antimônio de N-metilglucamina contém 8,1% de Sb<sup>+5</sup> (81 mg/mL), enquanto que a solução de estibogluconato de sódio contém 10% de Sb<sup>+5</sup> (100 mg/mL) (WHO, 2010).

Apesar do mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes não ser completamente entendido, acredita-se que o Sb<sup>+5</sup> se comporte como uma pró-droga, sendo convertido, posteriormente, à forma trivalente (Sb<sup>+3</sup>), mais ativa e tóxica (FRÉZARD, DEMICHELI e RIBEIRO, 2009; HANSEN et al., 2011). Esses compostos interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*. Tanto a glicólise quanto a oxidação dos ácidos graxos são inibidos, sendo que esta inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP (BRASIL, 2017). Além disso, estudos sugerem que estes compostos são capazes de induzir

apoptose do parasito através da indução de estresse oxidativo – inibindo a tripanotiona redutase, uma enzima responsável pela proteção do parasito contra espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, produzidas pela célula hospedeira – e do aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (BASU et al., 2006; FRÉZARD, DEMICHELI e RIBEIRO, 2009; SINGH e KUMAR, 2012; KIP et al., 2018).

Para tratamento da LCL, a OMS recomenda a administração parenteral (intravenosa ou intramuscular) de 10 a 20 mg/Sb<sup>+5</sup>/Kg/dia durante 20 dias consecutivos. Se não houver cicatrização completa no período de três meses (12 semanas) do término do tratamento, o esquema deverá ser repetido, prolongando-se, desta vez, a duração da série para 30 dias. Persistindo o insucesso, administra-se uma das drogas de segunda escolha, Anfotericina B ou Pentamidina® (BRASIL, 2017).

A terapia com os antimoniais pentavalentes apresenta limitações, como efeitos colaterais sistêmicos: mialgia, artralgia, anorexia, cólicas abdominais, diarreia, erupções cutâneas e uma toxicidade significativa para o fígado, coração, rim e pâncreas; além do uso parenteral e esquema terapêutico prolongado (20-30 dias), exigindo uma supervisão médica muito cuidadosa (SUNDAR et al., 2010; ZUCCA et al., 2013; FRÉZARD et al., 2014). Ademais, não devem ser utilizados em gestantes, uma vez que estas drogas atravessam a barreira transplacentária e podem impregnar o tecido nervoso do feto, e há restrições do uso dos antimoniais em pacientes com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas (BRASIL, 2017). Apesar de tantas limitações, os antimoniais pentavalentes ainda permanecem como primeira escolha de tratamento para as leishmanioses devido ao seu baixo custo (~ US\$ 39,50 para um paciente de LT com 35 kg) e devido à alta taxa de cura - cerca de 90% - (WHO, 2010; ZUCCA, 2013; CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015). Entretanto, tem havido cada vez mais evidências de eficácia variável e crescente número de casos de resistência, que depende da espécie de *Leishmania*, região geográfica, presença de cepas resistentes, múltiplas lesões, ampla utilização em áreas endêmicas e esquemas terapêuticos empregados – i.e., utilização de doses inadequadas e/ou esquemas terapêuticos obsoletos - (ROMERO et al., 2001; SUNDAR, 2001; CROFT e COOMBS, 2003; ALMEIDA et al., 2005; LLANOS-CUENTAS et al., 2008; KAUR e RAJPUT, 2014). Nesses casos, novamente, a solução é empregar umas das drogas de segunda escolha.

### 1.2.2 Pentamidina®

A Pentamidina® (ou isotionato de pentamidina) é um derivado sintético da amidina aromática. Assim como os antimoniais pentavalentes, também foi descoberta na década de 40, passando a ser empregada no tratamento da LV na Índia na década de 80. Entretanto, devido à alta toxicidade e à redução de eficácia, sua utilização no tratamento da LV foi abandonada (SUNDAR and CHAKRAVARTY, 2015). Atualmente, é utilizada no tratamento da pneumonia causada por *Pneumocystis jiroveci*, na tripanossomíase humana africana (doença do sono) de primeiro estágio e na LT na América do Sul (DORLO e KAGER, 2008; ZUCCA et al., 2013; KIP et al., 2018). Para tratamento da LCL, a dose recomendada é de 4 mg/kg/dia, por via intramuscular profunda, de dois em dois dias, por um total de 4-10 injeções, não se devendo ultrapassar a dose total de 2 g (BRASIL, 2017; MONGE-MAILLO e LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

De Paula e colaboradores (2003) relataram eficácia de 71,05% empregando a Pentamidina® no tratamento de pacientes com LCL causada por *L. braziliensis* no Brasil. Enquanto que em outro estudo, também realizado no Brasil, o medicamento apresentou eficácia de apenas 58,1% no tratamento de LCL causada por *L. guyanensis* (NEVES et al., 2011). A Pentamidina® também foi estudada no tratamento da LMC causada por *L. braziliensis* no Brasil. Nos estudos, utilizou-se a dose de 4 mg/kg/dia a cada 48h até a cura das lesões, obtendo-se, assim, eficácia entre 90-94% (AMATO et al., 1996, 1998 e 2009).

Entretanto, o tratamento com a Pentamidina® apresenta sérias reações adversas, como dor, abscessos estéreis no local da aplicação, náuseas, vômitos, tontura, fraqueza, mialgia, cefaleia, hipotensão, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia. Para se evitar os efeitos decorrentes do metabolismo da glicose, recomenda-se que o paciente se alimente antes e permaneça em repouso por 15 minutos após as injeções. Além disso, sua utilização é contraindicada em gestantes, pacientes com diabetes mellitus, insuficiência renal, insuficiência hepática, doenças cardíacas e em crianças com peso inferior a 8 kg. (NEVES et al., 2011; BRASIL, 2017; SILVA et al., 2013). Seu provável mecanismo de ação no parasito envolve o colapso do potencial de membrana da mitocôndria e inibição da cadeia respiratória do complexo II, além da condensação e comprometimento da síntese do DNA do cinetoplasto (SINGH e KUMAR, 2012; YANG et al., 2016).

Outras drogas aprovadas pela OMS para o tratamento das leishmanioses são a Miltefosina® e a Paromomicina® (WHO, 2010).

### 1.2.3 Miltefosina<sup>®</sup>

A Miltefosina<sup>®</sup>, também conhecida como hexadecilfosfocolina, é uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente para o tratamento de metástase cutânea em carcinoma mamário, na década de 80. Em 2002, foi aprovada para ser empregada no tratamento da leishmaniose visceral na Índia, tornando-se o primeiro e único fármaco leishmanicida de uso oral. A dose recomendada é de 2,5 mg/kg/dia, com dose máxima de 150 mg por via oral, durante 28 dias (BRASIL, 2016). O provável mecanismo de ação desse composto no parasito envolve a indução de apoptose e inibição da síntese de esterol e fosfolípido (KHADEM VATAN et al., 2011; DORLO et al., 2012; GETACHEW e GEDAMU, 2012).

Estudos realizados na Índia, mostraram uma eficácia em torno de cerca de 97% da Miltefosina<sup>®</sup> no tratamento da leishmaniose visceral (SUNDAR et al., 2002 e BHATTACHARYA et al., 2004). Em relação à LT do Novo Mundo, em estudos randomizados e incluindo pacientes infectados com *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. amazonensis*, esse composto apresentou uma eficácia variável, entre 21% a 91% (SOTO et al., 2004; MACHADO et al., 2010; VÉLEZ et al., 2010; CHRUSCIAK-TALHARI et al., 2011; GARCÍA et al., 2014).

Assim como outras drogas leishmanicidas, a terapia com a Miltefosina<sup>®</sup> também apresenta algumas limitações, principalmente em relação ao alto custo do tratamento (US\$ 65-150, para um paciente com 35 kg) e em relação aos efeitos adversos, que incluem náuseas, vômitos, tonturas, dor de cabeça, diarreia, toxicidade hepática e renal. Além disso, a Miltefosina<sup>®</sup> é teratogênica e abortífera. Por isso, orienta-se o emprego de métodos contraceptivos, para mulheres em idade fértil, durante e em até três meses após a sua utilização, sendo contraindicada durante a amamentação (WHO, 2010; SINGH e KUMAR, 2012; ZUCCA et al., 2013; KEVRIC et al., 2015).

### 1.2.4 Paromomicina<sup>®</sup>

A Paromomicina<sup>®</sup> é um antibiótico aminoglicosídeo que possui atividade leishmanicida e bactericida. Esse composto foi registrado em 2006 para utilização no tratamento da leishmaniose visceral na Índia, após apresentar 95% de eficácia em ensaios clínicos de fase III (SUNDAR et al., 2007). A Paromomicina<sup>®</sup> é utilizada de forma parenteral (intramuscular) no tratamento da LV – 15 mg/kg/dia durante 21 dias - e de forma tópica para o tratamento da LT – em uma formulação contendo 15% de Paromomicina<sup>®</sup> e 12% de cloreto de metilbenzetônio, aplicada duas vezes por dia durante 3 a 6 semanas (KEVRIC, 2015).

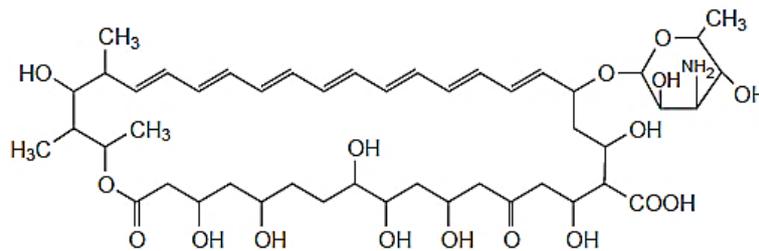
Krause e colaboradores (1994) relataram eficácia de 76% do uso tópico desse composto em pacientes com LCL causada por *L. panamensis* no Equador. A eficácia aumentou para 90% quando o tratamento tópico foi associado ao uso parenteral de Glucantime<sup>®</sup>. Do mesmo modo, o uso tópico do composto apresentou taxa de cura de 82% em LCL causada por *L. major* na Tunísia (SALAH et al., 2013). Contudo, o tratamento da LT empregando Paromomicina<sup>®</sup> de forma sistêmica é raro, uma vez que este composto apresentou baixa eficácia no tratamento da LMC (ROMERO et al., 1996, 1998; LLANOS-CUENTAS et al., 2007), bem como eficácia variável para LCL. Soto e colaboradores (1994) relataram eficácia < 50% em pacientes com LCL causada por *L. panamensis* na Colômbia. Hepburn e colaboradores (1994) compararam a eficácia da Paromomicina<sup>®</sup> ao Estibogluconato de Sódio, em um estudo randomizado com pacientes apresentando LCL causada por *L. braziliensis* e *L. mexicana*, em Belize. Neste estudo, a Paromomicina<sup>®</sup> apresentou eficácia de 59%, enquanto que o Estibogluconato de Sódio apresentou eficácia de 88%. Em contrapartida, na região de Corte de Pedra na Bahia, Brasil, Correia e colaboradores (1996) obtiveram eficácia de 90% empregando-se a Paromomicina<sup>®</sup> na terapia de pacientes com LCL causada por *L. braziliensis*, não havendo diferença estatística entre a eficácia apresentada por este esquema terapêutico e pelos grupos que receberam Pentamidina<sup>®</sup> e Glucantime<sup>®</sup>. Contudo, os autores relataram que a alta eficácia obtida com a Paromomicina<sup>®</sup> deve-se à dose mais alta empregada no estudo, 20 mg/kg/dia durante 20 dias.

O mecanismo de ação deste composto no parasito não é compreendido. Estudos sugerem a mitocôndria como alvo principal, bem como a inibição da síntese proteica (SINGH e KUMAR, 2012). Este medicamento é considerado seguro. Seu maior efeito adverso é dor leve no local da injeção, relatada em 55% dos pacientes (WHO, 2010; SUNDAR and CHAKRAVARTY, 2013).

### 1.3 ANFOTERICINA B

A Anfotericina B é um composto natural produzida pela actinobactéria *Streptomyces nodosus*, isolada do solo do rio Orinoco na Venezuela e caracterizada no início da década de 50 por Gold e colaboradores (1956). Quimicamente, a AnB é definida como um antibiótico poliênico de cadeia macrocíclica. Isso significa que o composto apresenta 37 átomos de carbono formando um anel macrocíclico, sendo que, em uma das porções da molécula, existe uma sequência de ligações duplas carbono-carbono, conferindo-lhe propriedade lipofílica. Ademais, na outra extremidade dessa molécula existe uma cadeia polihidroxilada com uma série de sete

hidroxilas livres, que lhe confere característica hidrofílica. Assim, a AnB é um composto anfipático. Esse composto também apresenta uma cadeia lateral, formada por um resíduo micosamina com um grupo amina livre (Figura 3). Desse modo, o nome Anfotericina B provém da propriedade anfipática e anfotérica do composto, esta última atribuída pela presença de um grupo carboxila no anel principal e pela presença de um grupamento amina na cadeia lateral. (GANIS et al., 1971; ASHER e SCHURARTZMAN, 1977).



Anfotericina B

**Figura 3.** Molécula de Anfotericina B. Adaptado de ODDS, 2003.

### 1.3.1 Mecanismo de ação

Acredita-se que a AnB exerça ação no parasito em dois diferentes níveis: dois eventos ocorreriam a nível membranar e outro de forma intracelular.

Os eventos a nível membranar estão relacionados com a afinidade da molécula da AnB pelo ergosterol. O ergosterol é o principal esteroide encontrado na membrana dos fungos e outros parasitos, como o *Leishmania*. A ligação da molécula de AnB ao ergosterol se dá através da porção lipofílica do composto e permite a formação de múltiplos poros. A formação de poros de membrana permite a passagem de eletrólitos, como  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  bem como de outros componentes citoplasmáticos, levando à morte celular. O segundo evento a nível membranar seria o sequestro do ergosterol pela AnB, de forma a impedir que este esteroide exerça seu papel na membrana celular, como endocitose, fusão de vacúolos e estabilização e manutenção da fluidez da membrana e de suas proteínas. Entretanto, a AnB também consegue se ligar ao colesterol da membrana de mamíferos, o que explica os efeitos tóxicos observado no hospedeiro. Contudo, a afinidade pelo ergosterol é cerca de dez vezes superior em comparação ao colesterol. Isso, provavelmente, se deve à conformação cilíndrica do ergosterol, que possibilita uma melhor ligação à molécula de AnB em comparação à estrutura sigmoide do

colesterol (GALE, 1974; SOKOL-ANDERSON et al., 1986; ODDS, 2003; MATSUMORI et al., 2009; MESA-ARANGO et al., 2012; YANG et al., 2013).

O modo de ação a nível intracelular da AnB no parasito seria a indução de estresse oxidativo e acúmulo de radicais livres na célula do parasito, levando à múltiplos efeitos deletérios sobre os componentes essenciais da célula (membrana, proteínas, DNA e mitocôndrias) e resultando na morte celular. Entretanto, os mecanismos envolvidos ainda não são completamente entendidos (SOKOL-ANDERSON et al., 1988; SANGALLI-LEITE et al., 2011; MESA-ARANGO et al., 2012, 2014).

Ademais, vários estudos vêm sugerindo que a anfotericina B pode exercer um potente efeito imunomodulador, oferecendo, assim, um mecanismo de ação alternativo para este composto (MESA-ARANGO et al., 2012). Mas, ao mesmo tempo, esse efeito tem sido relacionado à toxicidade associada ao composto devido à transcrição e produção de múltiplos mediadores, como TNF- $\alpha$ , prostaglandinas, IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1 e óxido nítrico, em modelos utilizando macrófagos peritoneais de diversas linhagens de camundongos (C57BL/6, BALB/c, C3H/HeJ e C3H/HeOUJ) ou linhagem de macrófagos RAW, linhagem monocítica humana THP-1 e monócitos humanos (SAU et al., 2003; CAMACHO et al., 2004; SIMITSOPOULOU et al., 2005). Contudo, os mecanismos envolvidos na imunomodulação mediada pela AnB são controversos. Acredita-se que o mecanismo responsável pela indução de EROs e NO seria através da ligação da AnB ao colesterol presente na membrana plasmática, o que induziria alterações conformacionais que levariam à ativação da enzima NADPH oxidase, resultando no *burst* oxidativo (CHAPMAN e HIBBS, 1978; WILSON, et al., 1991). Além disso, trabalhos sugerem que a AnB pode ligar-se aos receptores *Toll-like* (TRL), como TRL2 e TRL4, e ao co-receptor CD14. A ligação da AnB aos TRLs desencadearia o recrutamento da proteína adaptadora MyD88, resultando na translocação nuclear do NF- $\kappa$ B, que induz a expressão de genes de citocinas, quimiocinas e iNOS (SHOHAM et al., 2001; SAU et al., 2003; BELLOCCHIO et al., 2005).

Como seu mecanismo de ação principal se dá através da afinidade pelo ergosterol, a AnB possui ação em ambas as formas evolutivas da *Leishmania*, amastigota e promastigota, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e, por isso, constitui um potente candidato à terapêutica (VERMEERSCH et al., 2009).

### 1.3.2 Anfotericina B desoxicolato

Apesar da Anfotericina B ser um composto anfipático, a parte lipofílica da molécula a torna insolúvel em meios aquosos. Por isso, a primeira formulação de Anfotericina B, aprovada para uso clínico, foi associada ao desoxicolato de sódio (AnB-D) para estabilizar a solução em meio aquoso, através da formação de micélios. Essa formulação recebeu o nome de Fungizone<sup>®</sup> e foi introduzida no mercado em 1958 para administração intravenosa. A AnB-D foi considerada por muito tempo droga de referência para tratamento de infecções sistêmicas, como em infecções disseminadas por *Candida spp*, meningite criptocócica e zigomicose invasiva (SAAG et al., 2000; ZHANG et al., 2006; WANESS et al., 2009), devido ao seu amplo espectro de ação e eficácia, tanto em relação à fungos quanto em relação à parasitos, como *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus multilocularis* e *Leishmania spp* (YARDLEY e CROFT, 1999; REUTER et al., 2003; MONÉ et al., 2010; PAILA et al., 2010). Em relação à leishmaniose, a AnB-D era utilizada como droga de segunda escolha, na dose de 0.5 a 1mg/kg/dia por 15 consecutivos ou alternados (SUNDAR et al., 2007; WHO, 2010).

Apesar de possuir eficácia clínica de ~100%, o uso clínico da AnB-D é limitado, tanto pela necessidade de aplicação intravenosa quanto, principalmente, pelos efeitos adversos, imediatos ou tardios (SUNDAR and CHAKRAVARTY, 2015). Acredita-se que os efeitos imediatos, como febre, mal-estar, calafrios e dores generalizadas, acometam cerca de 80% dos pacientes (SAWAYA et al., 1995). A nefrotoxicidade é o efeito adverso tardio mais comum com o uso da AnB-D e pode acometer cerca de 65% dos pacientes. Trata-se de uma nefrotoxicidade reversível, se tomado os devidos cuidados - como, principalmente, a suspensão do tratamento -, mas que pode evoluir para falência renal. Na formulação com o desoxicolato de sódio, a AnB é liberada dos micélios na corrente sanguínea e cerca de 95% liga-se altamente às lipoproteínas plasmáticas HDL e, principalmente, ao LDL. A nefrotoxicidade mediada pelo uso da AnB-D pode ser originada pela interação direta da AnB-D com as membranas das células epiteliais do rim, uma vez que os receptores de LDL têm uma maior expressão nas células endoteliais do glomérulo renal. A internalização do complexo AnB-LDL pelos receptores LDL das células renais causaria alterações na permeabilidade da membrana (mesmo mecanismo responsável pela ação antiparasitária) e uma grave vasoconstrição renal, reduzindo o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular (SAWAYA et al., 1995; FANOS e CATALDI, 2000; LEMKE, 2005). Outros efeitos adversos são anemia normocítica normocrômica, neurotoxicidade (delírio, depressão, convulsões, confusão, tremores, hemiparesia, dentre outros) e, menos frequente, toxicidade hepática e cardíaca (PATEL, 2000; DEVUYST et al.,

2018). Contudo, a AnB-D, juntamente com a Paromomicina<sup>®</sup>, são os únicos fármacos leishmanicidas que podem ser empregados no tratamento de gestantes (BRASIL, 2017).

### 1.3.3 Formulações Lipídicas

Apesar de ser considerada o composto leishmanicida mais potente disponível atualmente, a AnB-D é também um dos compostos mais tóxicos utilizados no tratamento antimicrobiano (BEKERSKY et al., 1999). Com o objetivo de reduzir o efeito tóxico da AnB-D, foram desenvolvidas novas formulações desse composto. Atualmente, existem três formulações lipídicas aprovadas para uso clínico: complexo lipídico de AnB, formulação com dispersão coloidal de AnB e formulação lipossomal.

Apesar das formulações lipídicas necessitarem de doses maiores para exercer eficácia semelhante à AnB-D, todas as três formulações apresentam menor toxicidade e, principalmente, menor nefrotoxicidade em comparação à formulação convencional AnB-D (DORA, 2005). Entretanto, o mecanismo exato responsável pela reduzida toxicidade não é bem compreendido. Quando transportada por lipídios, a AnB é rapidamente removida da circulação pelas células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), atingindo maiores concentrações no fígado e baço e menor concentração nos rins, em comparação à AnB-D (JANKNEGT et al., 1992; LEMKE, 2005). Além disso, diferente da AnB-D, que é prontamente liberada dos micélios na corrente sanguínea, ficando livre para ligar-se ao LDL, as formulações lipídicas apresentam maior estabilidade, sendo a AnB liberada aos poucos dos complexos lipídicos. Isso pode resultar em uma menor concentração de AnB livre para ligar-se ao LDL e, assim, causar efeitos nefrotóxicos. Em contrapartida, as formulações lipídicas são discretamente mais hepatotóxicas que a AnB-D (JANKNEGT et al., 1992; PATEL, 2000; MARTINEZ, 2006).

O complexo lipídico macromolecular de AnB (AnB-CL) é uma formulação que emprega dois fosfolipídios, a dimiristoilfosfatidilcolina e dimiristoilfosfatidilglicerol, constituindo partículas em forma de fitas, com tamanhos entre 1,6 e 11 nm. Seu representante comercial é o Abelcet<sup>®</sup>. A FDA dos EUA aprovou a utilização do Abelcet<sup>®</sup> para o tratamento de todas as infecções fúngicas invasivas em pacientes refratários ou intolerantes à terapia com AnB-D. O regime recomendado é de 5 mg/kg/dia (BEKERSKY et al., 1999).

Na formulação com dispersão coloidal (AnB-DC), a AnB está contida, juntamente com sulfato de colesterol, em microdiscos com diâmetro médio de 122 nm. Seus representantes comerciais são o Amphocil<sup>®</sup> e Amphotec<sup>®</sup>. Essa formulação foi aprovada como tratamento de

segunda escolha para aspergilose nos EUA e Europa na dose de 3,4 mg/kg/dia (ANAISSIE et al., 1998).

Das três formulações lipídicas de AnB existentes, a formulação lipossomal, representada pelo Ambisome<sup>®</sup> (AnB-L), é a que apresenta menor toxicidade e melhor eficácia. Por isso, foi a única formulação lipídica de AnB aprovada em 1997 pela FDA para utilização no tratamento de LV. Ademais, também é aprovada como tratamento de segunda escolha para aspergilose, candidíase e criptococose, na Europa, Ásia e América Latina (BEKERSKY et al., 1999; MEYERHOFF, 1999). Essa formulação emprega lipossomos unilamelares, com diâmetro entre 50 e 100 nm e preparados com fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol e diesteroilfosfatidilglicerol. A fosfatidilcolina de soja hidrogenada e o distearoilfosfatidilglicerol foram utilizados por terem estabilidade a 37 °C. Já o colesterol foi adicionado para proporcionar mais estabilidade na formulação e para manter a AnB dentro do lipossomo, já que a AnB tem afinidade pelo colesterol (FALCI, 2015).

A dose recomendada para utilização na LV é de 3 mg/kg/dia por sete dias ou 4 mg/kg/dia por cinco dias em infusão venosa (WHO, 2010; BRASIL, 2011). Estudos apontam eficácia de ~ 90% da AnB-L no tratamento de LV (SUNDAR, 2010; SALIH et al., 2014). No Brasil, Romero e colaboradores (2017) compararam a eficácia terapêutica da AnB-L, do antimoniato de meglumina ou da associação antimoniato de meglumina + AnB-L em um estudo randomizado realizado com pacientes com LV provenientes do Ceará, Minas Gerais, Piauí e Sergipe. O estudo mostrou eficácia de 77.5% para o antimoniato de meglumina, 87.2% para a AnB-L e 83.9% para a associação antimoniato de meglumina + AnB-L. Além disso, a AnB-L mostrou-se mais segura que o antimoniato de meglumina, sugerindo que o tratamento da LV com AnB-L pode ser mais adequado comparado ao tratamento de primeira escolha.

Por outro lado, o alto custo do Ambisome<sup>®</sup> torna sua ampla utilização proibitiva em muitas partes do mundo, principalmente em países pobres ou em desenvolvimento. No Brasil, esta formulação era utilizada apenas em pacientes com LV que possuíam idade superior a 50 anos, portadores de insuficiência renal e em transplantados cardíacos, hepáticos e renais. A partir de 2014, após um acordo entre a OMS e a Gilead (fabricante do Ambisome<sup>®</sup>) para reduzir o custo do medicamento para países em desenvolvimento, o MS do Brasil ampliou a utilização do Ambisome<sup>®</sup> como fármaco de primeira escolha para o tratamento da LV em pacientes pertencentes aos seguintes grupos de risco: idade inferior a 1 ano e superior a 50 anos; pacientes com insuficiência renal, cardíaca e hepática; transplantados cardíacos, hepáticos e renais; pacientes com hipersensibilidade ou que tenha apresentado falha terapêutica ao Glucantime<sup>®</sup>;

coinfecção com HIV; comorbidades ou uso de medicamento que comprometam a imunidade; gestantes, dentre outros critérios. Com exceção dessas situações, o MS continua indicando o uso do Glucantime<sup>®</sup> como primeira escolha para o tratamento da LV (BRASIL, 2014; SUNDAR and CHAKRAVARTY, 2015).

Estudos realizados com LCL no novo e velho mundo mostram taxa de eficácia da AnB-L entre 85 a 100% (WORTMANN et al., 2010; SOLOMON et al., 2013). Em relação à LCM, a AnB-L também tem mostrado bons resultados, com taxa de eficácia entre 88 a 100% (SAMPAIO e MARSDEN, 1997; AMATO et al., 2011; ROCIO et al., 2014). Entretanto, há poucos estudos empregando a AnB-L no tratamento da LT, devido ao preço proibitivo e a falta de um grande ensaio clínico randomizado e controlado. Por isso, no Brasil, a AnB-L está registrada na ANVISA apenas para o tratamento da LV, sendo considerada medicamento *off label* para o tratamento da LT (BRASIL, 2017; SUNDAR and CHAKRAVARTY, 2015).

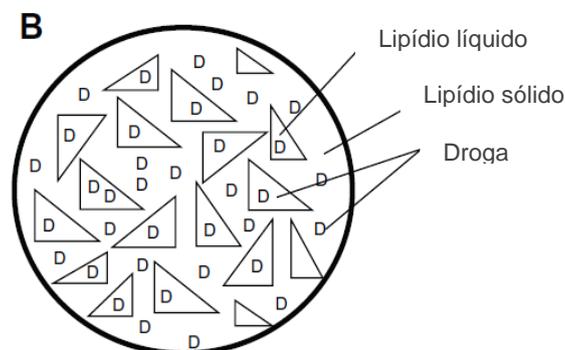
Apesar da reduzida toxicidade e, conseqüentemente, aumento do índice terapêutico e melhora da qualidade de vida dos pacientes, e mesmo com a iniciativa da OMS em reduzir o valor do Ambisome<sup>®</sup>, o tratamento com esse fármaco ainda continua extremamente custoso. Segunda a OMS, uma ampola do medicamento com 50 mg custa US\$ 18. Sendo assim, o tratamento de uma pessoa com 35 kg, no regime de 4 mg/kg/dia por 5 dias, teria um custo de US\$ 252 (WHO, 2010). Considerando-se todos os dados apresentados, acreditamos que o desenvolvimento de novas formulações de AnB, eficazes, seguras e, principalmente, mais acessíveis em comparação às formulações existentes é imprescindível (ULIANA et al., 2017).

#### 1.4 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

Considerando a busca por drogas leishmanicidas mais eficientes e menos tóxicas, o esforço para projetar sistemas estáveis de entrega de drogas (Drug Delivery Systems - DDSs) baseados em nanotecnologia é umas das principais estratégias no combate à doença. A utilização de lipossomos representa padrão ouro para desenvolvimento de novas formulações e são, atualmente, utilizados como DDS em uma variedade de diferentes tratamentos (BRUNI et al., 2017). O Ambisome<sup>®</sup> é um exemplo de fármaco que emprega lipossomos em sua formulação para aumentar a taxa de encapsulação e melhorar a entrega do fármaco, o que reduz os efeitos tóxicos do composto encapsulado. Entretanto, o alto custo do processo de fabricação dessa formulação representa uma grande desvantagem a ser superada.

Nesse cenário, os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs) ganharam destaque no DDS por causa da sua capacidade de aumentar a biodisponibilidade e promover a liberação controlada de drogas em locais específicos (principalmente drogas lipofílicas, como a AnB) (PARDESHI et al., 2012). Os CLNs, em geral, são partículas lipídicas esféricas, com tamanho de 10-1000 nm e preparados com uma mistura de lipídios sólidos e líquidos com diferentes pontos de fusão à temperatura ambiente, resultando em uma matriz nuclear lipídica sólida (estabilizada por surfactantes) encapsulando compartimentos de lipídios líquidos. A mistura de lipídios sólidos e líquidos resulta em uma matriz nanoestrutura com imperfeições entre os lipídios, o que fornece espaços para acomodar a droga na matriz, levando à alta capacidade de carregamento de drogas, além de modular o perfil de liberação dos fármacos veiculadas e fornecer uma maior estabilidade dos mesmos (Figura 4) (JENNING et al., 2000; MÜLLER et al., 2002; SAUPE et al., 2005). Os lipídios utilizados na construção dos CLNs são fisiológicos e biodegradáveis ou substâncias lipídicas e estabilizantes que são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS). Comparado com outros DDSs, como lipossomos, microemulsões e nanopartículas poliméricas, os CLNs possuem outras vantagens, como a não utilização de solventes orgânicos ou altas concentrações de surfactantes, estabilidade física por longo tempo e facilidade de transposição para a escala industrial (SAUPE et al., 2005).

Diante de tantas vantagens, há vários relatos na literatura demonstrando e avaliando a importância e eficiência dos CLNs. Kaddar e colaboradores (2011) demonstraram a capacidade de CLN em aumentar a biodisponibilidade da curcumina. Já Lim e colaboradores (2014) relataram que o CLN atua como um sistema de liberação sustentada para a liberação de itraconazol no cérebro.



CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

**Figura 4.** Estrutura esquemática dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.  
Adaptado de ALI KHAN et al., 2013.

Em relação às infecções parasitárias, como a leishmaniose, a eficácia do tratamento também reflete um grande desafio científico e tecnológico, especialmente porque a droga deve superar as barreiras celulares e atingir o parasita dentro do vacúolo parasitóforo de macrófagos infectados (BRUNI et al., 2017). Em vista disso, o uso de CLNs projetados com fosfolípidos sensíveis ao pH como transportadores para AnB apresenta uma alternativa potencial para reduzir sua toxicidade e aumentar a eficácia, levando a uma liberação direcionada na região infectada.

## 2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses distribuem-se fundamentalmente entre as populações com menos recursos econômicos e são consideradas um importante problema de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A Anfotericina B é o composto leishmanicida mais eficiente disponível comercialmente. A formulação lipossomal de Anfotericina B (Ambisome<sup>®</sup>) representou uma grande vantagem para a terapêutica devido à sua reduzida toxicidade em relação às formulações convencionais. Entretanto, o fator limitante para a utilização clínica e científica da Anfotericina lipossomal é o seu alto custo. Produzida pela *Gilead Sciences*, companhia biofarmacêutica norte-americana, segundo dados da OMS, o Ambisome<sup>®</sup> possui custo de US\$18 por ampola, tornando-se um medicamento altamente custoso para países de baixa renda. Os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs) são partículas lipídicas esféricas, com tamanho de 10-1000 nm, que vêm ganhando atenção da comunidade científica por proporcionar aumento da biodisponibilidade, liberação controlada em sítios específicos de fármacos, segurança e reduzido custo. Neste trabalho, avaliamos o efeito dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados com Anfotericina B (CLN-AnB) no controle da infecção *in vitro e in vivo* por *L. braziliensis*, principal agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar no Brasil. O CLN-AnB utilizado nesse trabalho foi produzido por duas empresas brasileiras: a Apis Flora Industrial e Comercial Ltda e a Eleve Pesquisa & Desenvolvimento, com custo de R\$ 5,87 produção/ampola. Assim, o projeto possui potencial inovador e poderá propor a utilização de uma nova formulação de Anfotericina B para o tratamento da LT segura, eficaz e produzida no Brasil, o que contribuirá para a manutenção do seu reduzido custo.

### 3. HIPÓTESE

Os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados com Anfotericina B (CLN-AnB) são capazes de controlar a infecção por *L. braziliensis* *in vitro* e *in vivo*.

### 4. OBJETIVOS

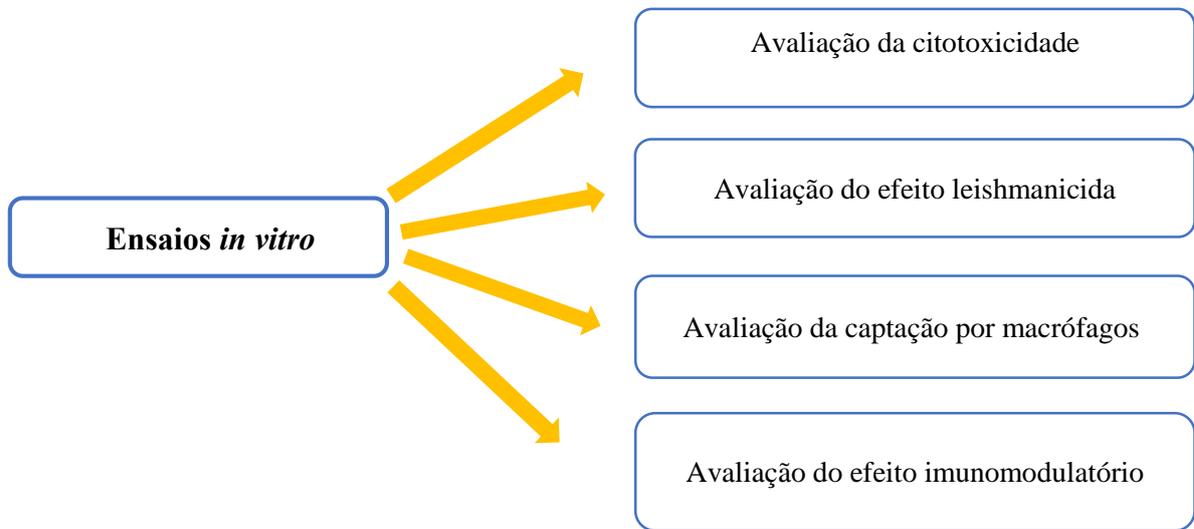
#### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o controle da infecção por *L. braziliensis* *in vitro* e *in vivo* pelos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados com Anfotericina B (CLN-AnB) para o tratamento da Leishmaniose Cutânea Localizada.

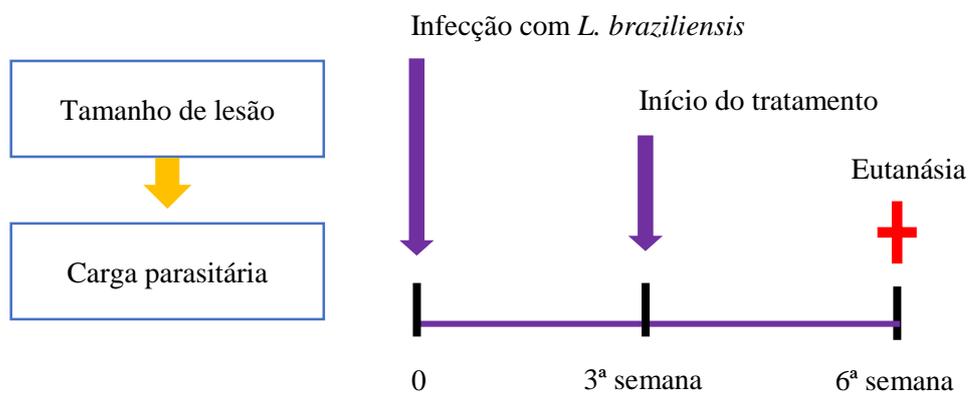
#### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade dos CLN-AnB em cultura de macrófagos não infectados;
- Testar o efeito dos CLN-AnB na infecção de macrófagos com *L. braziliensis*;
- Avaliar a captação dos CLN-AnB por macrófagos infectados com *L. braziliensis* GFP;
- Avaliar a produção de óxido nítrico e TNF- $\alpha$  em macrófagos infectados com *L. braziliensis* e tratados com os CLN-AnB;
- Avaliar a capacidade de controle da infecção dos CLN-AnB em modelo experimental utilizando camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*.

## 5. DESENHO EXPERIMENTAL



### Ensaio in vivo



#### Grupos Experimentais:

- 1) Dextrose 5%
- 2) Glucantime 100mg/Sb<sup>5+</sup>/kg/dia
- 3) Ambisome 3mg/kg/dia
- 4) CLN-Ø 3mg/kg/dia
- 5) CLN-AnB 3mg/kg/dia

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 PREPARAÇÃO DOS CLNs

O CLN conjugado a Anfotericina B (CLN-AnB) e o CLN vazio, preparado na ausência do fármaco (CLN-Ø), utilizados neste estudo foram cedidos pelas Dr<sup>as</sup> Franciane Oliveira e Andresa Berretta (Apis Flora Industrial e Comercial Ltda / Eleve Pesquisa & Desenvolvimento.). Ambos os compostos foram obtidos de acordo com os métodos descritos em detalhes em Tadini e colaboradores (2017). Brevemente, os CLNs foram preparados a partir da diluição do método de microemulsão aquecida, misturando o surfactante contendo fosfoetanolamina (Lipoid GMBH, Ludwigshafen, Alemanha), a matriz lipídica - composta de ácido esteárico (Sigma Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) e óleo de coco (Lipoid GMBH, Ludwigshafen, Alemanha) - e a fase aquosa – composta por colato de sódio (Sigma Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), polietilenoglicol 400 USP (CosmoQuímica, Barueri, Brasil) e água deionizada - a 60 – 70 °C sob agitação (100 rpm). Os CLNs-AnB foram obtidos pela incorporação de anfotericina B (North China Pharmaceutical Huasheng, Hong Kong, China) à microemulsão e a vitamina E (Tovani Ltda, São Paulo, Brasil) foi utilizada como antioxidante (TADINI et al., 2017).

### 6.2 FÁRMACOS

Neste estudo, utilizou-se duas formulações de anfotericina B empregadas na prática clínica: o Unianf<sup>®</sup>, representando a formulação de anfotericina B desoxicolato (AnB-D) e o Ambisome<sup>®</sup>, representando a formulação de anfotericina B lipossomal (AnB-L). O insumo farmacêutico de anfotericina B (AnB) foi utilizado como controle do composto no estado livre. Como representante comercial do Sb<sup>5+</sup> utilizado na prática clínica no Brasil, utilizou-se o Glucantime<sup>®</sup>.

### 6.3 ANIMAIS

Camundongos machos BALB/c (*Mus musculus*) de 6-8 semanas de idade, obtidos do Biotério do Instituto Gonçalo Muniz (IGM/FIOCRUZ) e mantidos em condições livre de

patógenos. Todos os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal do IGM/FIOCRUZ – protocolo 018/2017.

#### 6.4 PARASITOS

Promastigotas de *Leishmania Viannia braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) foram cultivadas a 24°C, em meio *Schneider Insect* (Sigma Aldrich) suplementado com 10% de SBF e 100 U/mL de penicilina-estreptomicina-glutamina (todos da Gibco). Promastigotas de *Leishmania Viannia braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) modificadas para expressar a proteína verde fluorescente (GFP) foram cultivadas a 24°C, em meio *Schneider Insect* suplementado com 10% de SBF, 100 U/mL de penicilina-estreptomicina-glutamina e 50µg/mL do antibiótico Geneticin® (G418; Gibco), utilizado para seleção dos parasitos modificados.

#### 6.5 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA

Macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) foram isolados através da lavagem do compartimento interno do fêmur e tíbia de camundongos BALB/c. Após a eutanásia, o abdômen e as patas do camundongo foram lavados com álcool 70%. Realizou-se uma incisão na linha média do abdômen e a pele foi puxada, expondo-se o músculo das patas posteriores. As patas foram removidas com tesoura cirúrgica e a tíbia e o fêmur de cada pata foram dissecados. Os ossos foram lavados com álcool 70% e realizou-se a lavagem interna do fêmur e tíbia. As células obtidas foram cultivadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, em meio RPMI suplementado com 20% de SBF, 20% de sobrenadante de fibroblastos L929 e 100 U/mL de penicilina-estreptomicina-glutamina (todos da Gibco).

#### 6.6 AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE DOS CLNs EM MDMO

MDMO, obtidos como acima descrito, foram distribuídos em placas de 96 poços, na densidade de  $2 \times 10^5$ /poço e incubados por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de aderência, os MDMO foram tratados com AnB, AnB-D ou com CLN-AnB em diferentes concentrações (8 – 0,0078 µg/mL) e incubados por 48h à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Meio RPMI, suplementado com 5% de SBF e 100 U/mL de penicilina-estreptomicina-glutamina, e os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados vazios (CLN-Ø) foram utilizados como controles. Em

seguida, as células foram incubadas por 4h com 10% de Alamar Blue e a absorbância foi lida a 570 e 600 nm.

#### 6.7 DETERMINAÇÃO DO IC<sub>50</sub> DO CLN-ANB SOBRE A VIABILIDADE INTRACELULAR DE *L. BRAZILIENSIS*

Para determinação do IC<sub>50</sub> dos CLN-AnB, MDMO foram distribuídos na densidade de  $1 \times 10^5$ /poço em placas de 96 poços por 24h. Em seguida, os macrófagos foram infectados com *L. braziliensis* na proporção 10:1 (*L. braziliensis* : macrófagos), por 24h. Posteriormente, as culturas de macrófagos foram lavadas 2x com salina, para remover os parasitos não internalizados, e tratados com diferentes concentrações (250 – 3,9 ng/mL) da AnB, AnB-D ou dos CLN-AnB, por 48h, à 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Meio RPMI suplementado e os CLN-Ø foram utilizados como controles. Após o tempo de tratamento, o meio foi trocado para o meio Schneider suplementado e as culturas celulares foram incubadas em estufa B.O.D por 6 dias a 24°C. A contagem dos parasitos viáveis foi realizada por microscopia óptica utilizando-se Câmara de Neubauer. Após a obtenção do IC<sub>50</sub> dos compostos, uma densidade de  $1 \times 10^5$ /MDMO/poço ou  $2 \times 10^5$ /MDMO/poço foi plaqueada em placas de 96 poços ou sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços, respectivamente. As células foram então infectadas e tratadas com a concentração do IC<sub>50</sub> dos compostos, como acima descrito. As lamínulas foram coradas com H&E para o cálculo do índice de infecção ou tiveram o meio trocado, para contagem de promastigotas viáveis. O índice de infecção (porcentagem de células infectadas x média do número de amastigotas por célula) foi determinado pela contagem randômica de 200 células por campos das lamínulas, utilizando microscopia ótica de luz.

#### 6.8 AVALIAÇÃO DA CAPTAÇÃO (UPTAKE) DOS CLN-ANB POR MACRÓFAGOS MURINOS

MDMO, obtidos como acima descrito, foram plaqueados numa densidade de  $10^5$ /poço sobre lamínulas de vidro, em placas de 24 poços e incubadas *overnight* a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após o tempo de adesão, os macrófagos foram infectados com *L. braziliensis* GFP na proporção 10:1 (*L. braziliensis* : macrófagos), por 24h. Após lavagem com salina, as células foram tratadas com uma diluição de 1:200 (~ 4 µg/mL) ou com a concentração do IC<sub>50</sub> da suspensão de CLN-AnB ou do CLN-Ø contendo o fluorocromo Lumogen Red F300 (BASF, Ludwigshafen,

Alemanha- 0,02%<sub>p/v</sub>). As placas foram incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 1, 2, 24 e 48h. Após cada tempo de tratamento, as células foram lavadas 2x com PBS 1X e fixadas com solução de paraformaldeído a 4%. Em seguida, as lamínulas foram marcadas com DAPI (Invitrogen), e mantidas protegidas da luz e a -20°C até a observação em microscópio confocal espectral (TCS SP8, Leica Microsystems, Alemanha).

## 6.9 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E TNF- $\alpha$

MDMO foram plaqueados na densidade de  $1 \times 10^6$ /poço, em placas de 24 poços e estimulados com IFN- $\gamma$  (100U/mL). Posteriormente, as células foram infectadas com *L. braziliensis* por 24h. A estimulação de IFN- $\gamma$  foi, então, reaplicada juntamente com a concentração do IC<sub>50</sub> da AnB, AnB-D e CLN-AnB. Macrófagos não infectados e não estimulados com IFN- $\gamma$ , macrófagos infectados e estimulados com IFN- $\gamma$  e CLN- $\emptyset$  foram utilizados como controles. As culturas foram incubadas e os sobrenadantes das células foram coletados após 48h. A concentração de óxido nítrico foi avaliada através da determinação dos níveis de nitrito, utilizando o método de Griess. A produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) foi quantificada utilizando Quantikine ELISA kit (R&D Systems), de acordo com as instruções do fabricante.

## 6.10 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS BALB/C COM CLN-ANB

Camundongos BALB/c, machos, 6-8 semanas de idade, foram desafiados com  $10^5$  promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária (em 10 $\mu$ l de soro fisiológico), na derme da orelha esquerda, utilizando uma agulha de calibre 30 G (BD Ultra-fine II®). Após três semanas de infecção, os animais foram divididos em cinco grupos experimentais (n=5) e tratados intraperitonealmente com: 1) CLN- $\emptyset$  2) CLN-AnB ou 3) AnB-L (Ambisome®) a 3mg/kg/dia por 7 dias alternados. Em paralelo, um grupo experimental de camundongos recebeu 4) Sb<sup>5+</sup> (Glucantime® a 100mg/ Sb<sup>5+</sup>/kg/dia) cinco vezes na semana por cinco semanas (CELES et al., 2016). O controle não tratado foi realizado injetando-se 5) solução de dextrose a 5% nos camundongos. O desenvolvimento das lesões foi acompanhado semanalmente durante 6 semanas, utilizando um paquímetro analógico (Kroeplin, Schlüchtern, GER).

## 6.11 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DO LINFONODO DRENANTE E ORELHA

A carga parasitária foi determinada utilizando um ensaio de diluição limitante-quantitativa, conforme descrito por Titus e colaboradores (1985). As orelhas infectadas e dos gânglios linfáticos que drenam o local da infecção foram assepticamente retirados na 6<sup>a</sup> semana após a infecção e homogeneizados em meio Schneider suplementado. Os homogeneizados foram diluídos em série e dispostos em placas de 96 poços. O número de parasitas viáveis foi determinado a partir da mais alta diluição à qual as promastigotas foram capazes de crescer após cerca de 2 semanas de incubação na B.O.D, a 24°C.

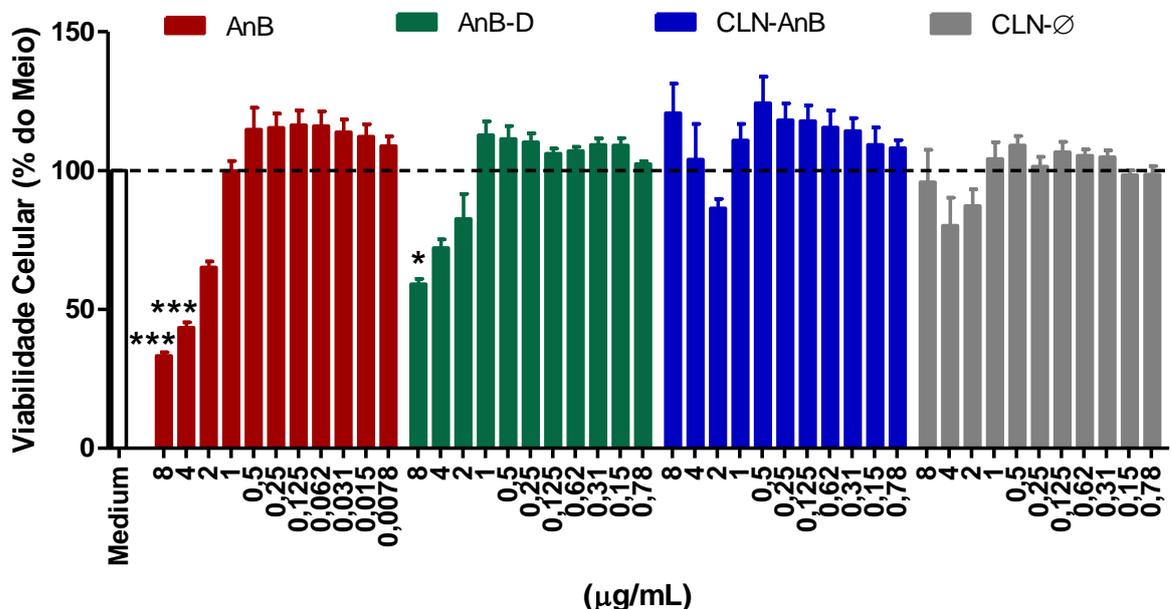
## 6.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados quanto às diferenças estatísticas utilizando diferentes testes, a depender dos dados obtidos. Para múltiplas comparações foram utilizados Kruskal-Wallis, sendo os valores considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . A concentração de inibição média ( $IC_{50}$ ) sobre a viabilidade intracelular do parasito e a concentração de citotoxicidade que implica em 50% da viabilidade celular ( $CC_{50}$ ) foram determinadas a partir de regressão sigmoidal das curvas de concentração-resposta. O índice de seletividade (IS) foi calculado como a razão entre o  $CC_{50}$  para MDMO não infectados e o  $IC_{50}$  para o parasito intracelular ( $CC_{50} / IC_{50}$ ). As análises foram feitas no GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego California).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 CLN-AnBs MOSTRAM-SE MENOS TÓXICOS PARA MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS

A citotoxicidade das formulações de anfotericina B sobre macrófagos não infectados foi avaliada por meio do teste de redução de Alamar Blue, utilizando uma faixa de concentração de 0,0078 – 8  $\mu\text{g/mL}$ . Após 48h de tratamento, todas as formulações de anfotericina B apresentaram redução da viabilidade celular a partir de 2  $\mu\text{g/mL}$ , onde a AnB foi capaz de reduzir 34,8% da viabilidade celular, seguido de 17,5% e 13,5% para a AnB-D e CLN-AnB, respectivamente (Fig. 5). O efeito citotóxico foi dose-dependente nas amostras tratadas com a AnB e AnB-D, apresentando, respectivamente, redução de 66,7% e 40,8% na maior concentração testada ( $p < 0.0001$  e  $p < 0.05$ ). Nenhum efeito citotóxico foi observado nas amostras tratadas com o CLN-AnB nessa mesma concentração. Dessa forma, determinou-se que a faixa de concentração segura para realização das análises posteriores seria inferior a 1  $\mu\text{g/mL}$ .

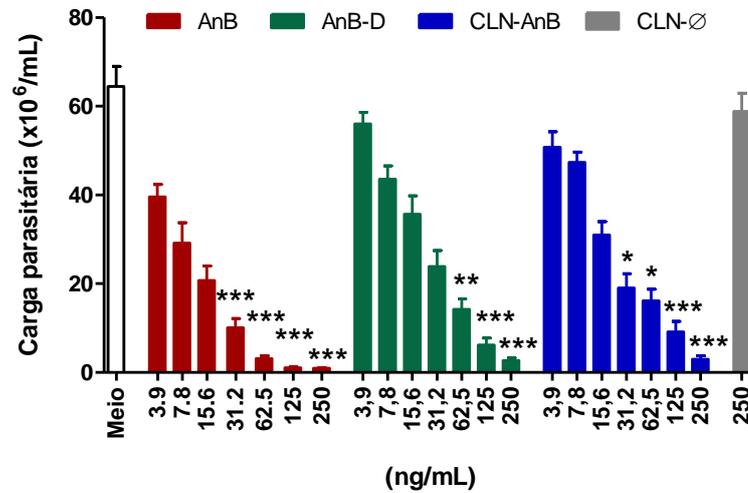


**Figura 5.** CLN-AnB são citocompatíveis *in vitro*. MDMO foram tratados com AnB, AnB-D ou com CLN-AnB por 48h. A viabilidade celular foi observada pelo percentual de redução de Alamar Blue. Barras representam  $\pm$  SEM de dois experimentos. Teste não-paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, foi utilizado para comparação entre os grupos experimentais (\* $p < 0.05$  e \*\*\* $p < 0.0001$ ).

## 7.2 REDUÇÃO DA VIABILIDADE INTRACELULAR DE *L. BRAZILIENSIS* PELOS CLNs-ANB

Devido aos dados anteriores de citotoxicidade e sabendo que a Anfotericina B é um composto que exerce efeito tóxico sobre o parasito em baixas concentrações, avaliamos o potencial efeito leishmanicida do CLN-AnB sobre a viabilidade intracelular do parasito de forma *in vitro*, utilizando para isso uma faixa de concentração entre 3,9 – 250 ng/mL. Após 48h de tratamento, todas as formulações de Anfotericina B foram capazes de reduzir a viabilidade intracelular de *L. braziliensis* de forma dose-dependente (Fig. 6). A AnB e o CLN-AnB reduziram a viabilidade intracelular do parasito de forma estatisticamente significativa a partir de 31,2 ng/mL,  $p < 0.0001$  e  $p < 0.01$ , respectivamente. O efeito leishmanicida foi potencializado na maior concentração utilizada para todas as formulações (250 ng/mL),  $p < 0.0001$ . Como já esperado, os CLN-Ø não apresentaram efeito leishmanicida sob a forma intracelular de *L. braziliensis* (Fig. 6).

O valor do  $IC_{50}$  encontrado para o parasito intracelular foi de  $5,3 \pm 0.558$ ;  $13 \pm 0.577$  e  $11,7 \pm 1.73$  ng/mL para a AnB, AnB-D e CLN-AnB, respectivamente. Além de apresentar menor valor de  $IC_{50}$  para o parasito intracelular, a AnB também apresentou menor valor de  $CC_{50}$  para macrófagos não infectados ( $4311 \pm 266$  ng/mL) em relação às outras formulações:  $10795 \pm 1542$  e  $12343 \pm 2673$  ng/mL para AnB-D e CLN-AnB, respectivamente. O CLN-AnB apresentou maior valor do índice de seletividade (IS) (1046) em relação à AnB (813) e ao AnB-D (830). O IS é o resultado da razão  $CC_{50} / IC_{50}$  e indica o quão seletivo o composto é ao parasito em relação aos macrófagos, Tabela 1.



**Figura 6. Determinação do IC<sub>50</sub> dos CLN-AnB sobre a forma intracelular de *L. braziliensis*.** MDMO foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com AnB, AnB-D ou com CLN-AnB por 48h. Meio RPMI suplementado (Meio) e os carreadores vazios (CLN-Ø – 250 ng/mL) foram utilizados como controles. Barras representam ± SEM de quatro experimentos. Teste não-paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, foi utilizado para comparação entre os grupos experimentais (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.0001).

**Tabela 1. Efeito leishmanicida e citotóxico das diferentes formulações de Anfotericina B.**

Composto	Amastigota IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ± SEM <sup>b</sup> (ng/mL)	Macrófago CC <sub>50</sub> <sup>c</sup> ± SEM (ng/mL)	IS <sup>d</sup>
Anfotericina B	5.3 ± 0.558 *	4311 ± 266	813
AnB-D	13 ± 0.577	10795 ± 1542	830
CLN-AnB	11.7 ± 1.73	12343 ± 2673	1046

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>: Concentração que causa 50% de inibição do crescimento.

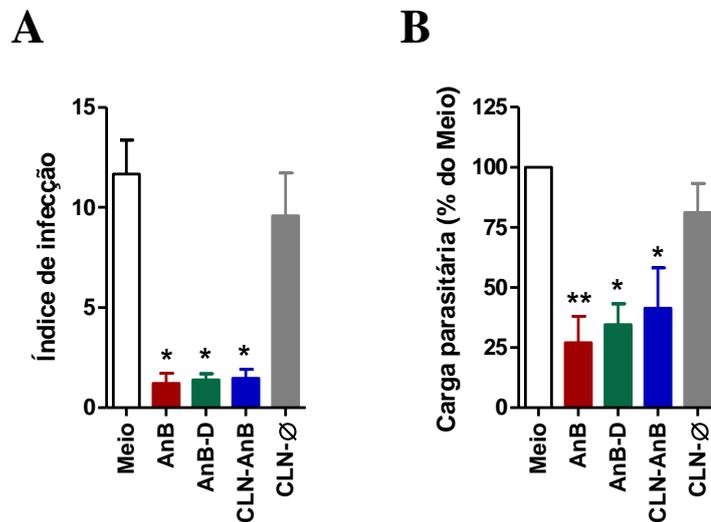
<sup>b</sup> SEM: Erro padrão da média.

<sup>c</sup> CC<sub>50</sub>: Concentração que causa citotoxicidade em 50% das células.

<sup>d</sup> IS: Índice de seletividade. CC<sub>50</sub> de macrófagos/IC<sub>50</sub> de intracelular amastigota (ng/mL).

\* Indica diferença estatística (p = 0.0210) em relação à AnB-D.

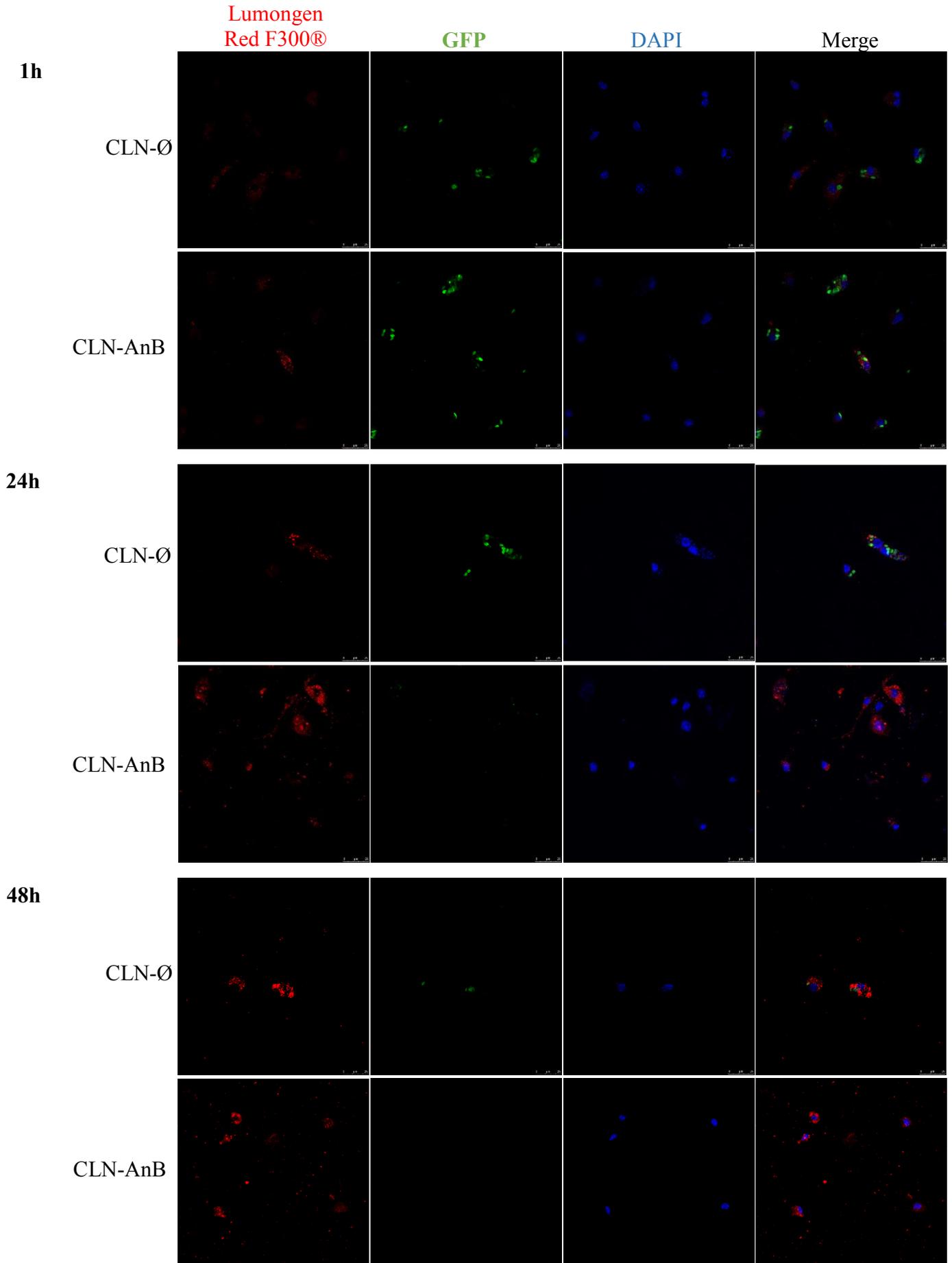
Após determinação do IC<sub>50</sub> dos compostos testados, validamos esse achado analisando o efeito leishmanicida sobre macrófagos infectados e tratados com as formulações de AnB através do índice de infecção, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Nossos dados mostram que o índice de infecção foi semelhante entre todas as formulações de AnB testadas e estatisticamente significativa em relação ao controle (Meio),  $p < 0.05$  (Fig. 7A). A recuperação de promastigotas recuperadas no sobrenadante de macrófagos infectados e tratados mostrou eficácia semelhante entre a AnB-D e CLN-AnB e maior eficácia para a AnB livre,  $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ , respectivamente, (Fig. 7B).

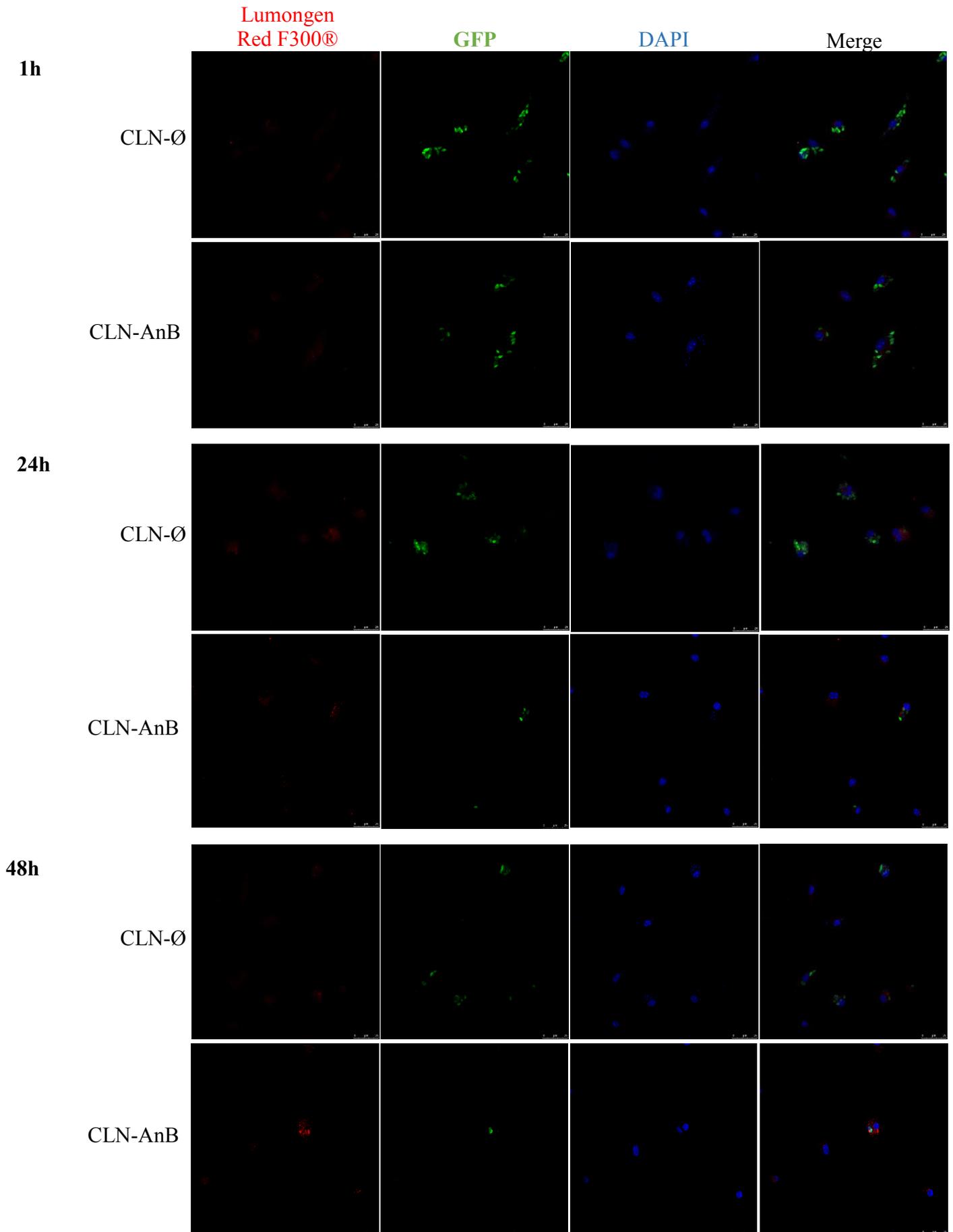


**Figura 7. Efeito leishmanicida das diferentes formulações de Anfotericina B.** MDMO foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com a concentração do IC<sub>50</sub> da AnB, AnB-D ou do CLN-AnB por 48h. Meio RPMI suplementado (Meio) e os carreadores vazios foram utilizados como controles. (A) Índice de infecção de MDMO infectados, avaliado por microscopia óptica de luz, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. (B) Contagem direta de promastigotas viáveis recuperados no sobrenadante de macrófagos infectados. Barras representam  $\pm$  SEM de três experimentos. Teste não-paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, foi utilizado para comparação entre os grupos experimentais (\* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ ).

### 7.3 CLNs SÃO RAPIDAMENTE CAPTADOS POR MACRÓFAGOS INFECTADOS

A avaliação da capacidade dos CLNs atravessarem a membrana do macrófago infectado com *L. braziliensis* GFP foi realizada por meio de uma cinética de tratamento nos tempos de 1, 2, 24 e 48h. Verificou-se que após 1h de tratamento, com ambas as concentrações empregadas ( $\sim 4\mu\text{g/mL}$  ou  $\text{IC}_{50}$ ), já é possível detectar os CLNs no citoplasma dos macrófagos (com núcelos marcados em azul) (Figuras 8A e 8B). A intensidade de fluorescência dos CLNs (mostrada em vermelho) foi maior na mais alta concentração utilizada e aumentou de acordo com o tempo. Também foi possível observar a colocalização das nanopartículas com as formas amastigotas (mostradas em verde). Como consequência, observamos a redução da fluorescência do parasito, quando empregado o CLN-AnB, principalmente na mais alta concentração do composto e de acordo com o tempo, o que demonstra, mais uma vez, a capacidade do CLN-AnB em reduzir a viabilidade intracelular do parasito. A intensidade de fluorescência intracelular dos CLNs no tempo de 2h foi semelhante ao tempo de 1h e, por isso, não é mostrado.

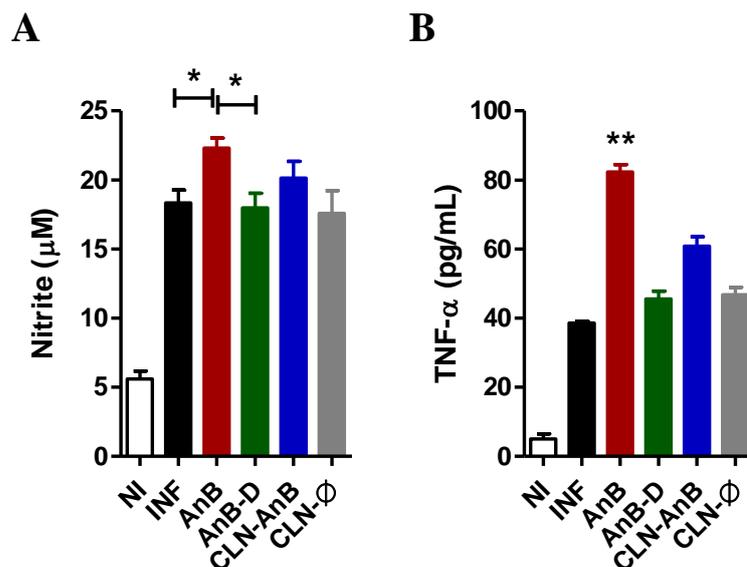
**A**

**B**

**Figura 8. Localização intracelular dos CLNs.** Microscopia confocal de MDMO infectados com *L. braziliensis* GFP e tratados com (A) 4 µg/mL ou (B) IC<sub>50</sub> de CLN-AnB ou CLN-Ø por 1, 24 e 48h. Vermelho: CLNs contendo fluorocromo Lumogen Red F300®; Verde: *L. braziliensis* GFP; Azul: núcleo marcado com DAPI.

#### 7.4 MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E TNF- $\alpha$ PELAS DIFERENTES FORMULAÇÕES DE ANFOTERICINA B

A capacidade imunomodulatória dos compostos foi avaliada através da produção de óxido nítrico (NO) e TNF- $\alpha$ . O NO e TNF- $\alpha$  foram quantificadas em culturas de MDMO previamente estimulados com IFN- $\gamma$ , infectados com *L. braziliensis* e tratados com a concentração do IC<sub>50</sub> das formulações de anfotericina B. Apenas a AnB foi capaz de induzir de forma estatisticamente significativa a produção de NO, tanto em relação ao controle infectado quanto em relação à AnB-D (Fig. 9A), e de TNF- $\alpha$  em relação ao controle infectado (Fig. 9B).

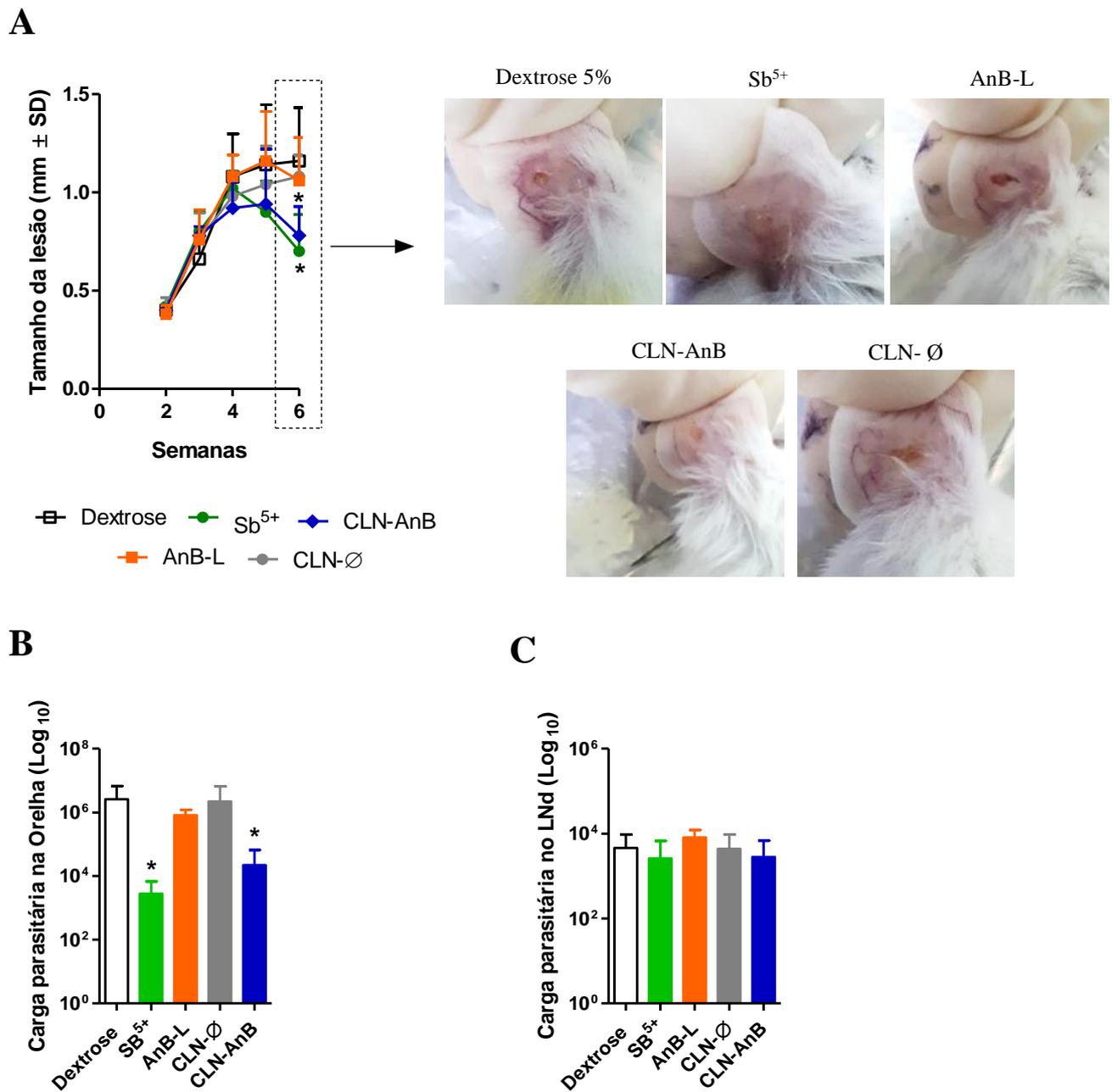


**Figura 9. Modulação da produção de óxido nítrico e TNF- $\alpha$  pelas diferentes formulações de Anfotericina B.** MDMO infectados com *L. braziliensis* foram tratados com a concentração do IC<sub>50</sub> da AnB, AnB-D ou do CLN-AnB por 48h. (A) produção de NO foi determinada pelos níveis de nitrito através da reação de Griess; (B) produção de TNF- $\alpha$  analisada por ELISA. Barras representam  $\pm$  SEM de quatro experimentos para o NO e  $\pm$  SD de um experimento realizado em triplicada para o TNF- $\alpha$ . Teste não-paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, foi utilizado para comparação entre os grupos experimentais (\* $p$  < 0.05 e  $p^{**}$  < 0.01).

NI: Não infectada; INF: Infectado.

## 7.5 AVALIAÇÃO *IN VIVO*

Devido aos resultados promissores obtidos *in vitro*, realizamos então uma avaliação *in vivo*, com 5 animais por grupo e acompanhados até a sexta semana pós infecção, para analisar o efeito do CLN-AnB no controle da infecção por *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c foram inoculados na derme da orelha esquerda com promastigotas de *L. braziliensis*. Na terceira semana pós infecção, os animais foram tratados intraperitonealmente com Sb<sup>5+</sup> (Glucantime<sup>®</sup>) e AnB-L (Ambisome<sup>®</sup>), como controles medicamentosos de fármacos de primeira e segunda escolha utilizados no tratamento da Leishmaniose, respectivamente, e com CLN-AnB. Solução glicosada a 5% (Dextrose 5%) foi utilizada como controle não tratado e de veículo de diluição dos compostos e solução com os carreadores sem a AnB incorporada (CLN-Ø) foi utilizado como controle do próprio carreador. O esquema terapêutico empregado, bem como as dosagens utilizadas foram realizados conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Na sexta semana pós infecção, os animais tratados com CLN-AnB e Sb<sup>5+</sup> (Glucantime<sup>®</sup>) tiveram tamanho da lesão da orelha significativamente menor, comparado ao controle Dextrose 5% (Figura 10A), bem como menor carga parasitária na orelha infectada,  $p > 0.05$  (Figura 10B). Observamos que o tratamento com Sb<sup>5+</sup> apresentou menores médias do tamanho de lesão e da carga parasitária no sítio da infecção (derme da orelha infectada) em relação à CLN-AnB, apesar de não haver diferença estatística entre as médias desses dois grupos. Em contrapartida, a AnB-L (Ambisome<sup>®</sup>) não foi eficaz em reduzir o tamanho da lesão nem a carga parasitária da orelha infectada, na concentração e esquema terapêuticos empregados. Nenhum tratamento utilizado foi capaz de reduzir a carga parasitária no linfonodo drenante (Figura 10C).



**Figura 10. Tratamento *in vivo* com CLN-AnB reduz infecção por *L. braziliensis*.** Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com *L. braziliensis* e três semanas depois tratados intraperitonealmente com Dextrose 5%, Sb<sup>5+</sup> (Glucantime® 100mg/ Sb<sup>5+</sup>/kg/dia, 5x na semana), AnB-L (Ambisome®), CLN-AnB ou CLN-Ø, a 3mg/kg/dia por sete dias alternados, (A) Desenvolvimento do tamanho da lesão acompanhado semanalmente e fotografia da lesão na sexta semana pós infecção. Carga parasitária da orelha infectada (B) e no linfonodo drenante (C). Barras representam  $\pm$  SD de um experimento realizado com 5 animais por grupo. Teste não-paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, foi utilizado para comparação entre os grupos experimentais (\*p < 0.05).

## 8. DISCUSSÃO

O arsenal terapêutico para tratamento da leishmaniose possui sérias limitações, como alto custo e toxicidade. Desenvolver novas drogas utilizando sistemas estáveis de entrega baseados em nanotecnologia e capazes de alcançar os parasitos intracelularmente é uma das principais estratégias no combate à doença. Pertencente à classe de antibióticos poliênicos, conhecidos por exercer efeito em baixas concentrações, a Anfotericina B é a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente (COHEN, 1998). Entretanto, se no passado sua ampla utilização na prática clínica era limitada devido aos sérios efeitos tóxicos (AnB-D), atualmente, não só a sua utilização na prática clínica, mas como também seu emprego em estudos científicos são limitados devido ao seu alto custo (formulações lipídicas) (SUNDAR and CHAKRAVARTY, 2015). O Ambisome<sup>®</sup> foi a primeira formulação de AnB lipídica aprovada para uso na LV e já vem sendo utilizado com sucesso no Brasil para tratamento de pacientes com LV pertencentes a grupos prioritários, devido à alta eficácia e baixos efeitos tóxicos dessa formulação em relação ao tratamento de primeira escolha com Sb<sup>5+</sup> (BRASIL, 2014). Contudo, sua ampla utilização no tratamento da LV, e até mesmo da LT, ainda é proibitiva devido ao alto custo. Prévios relatos já mostram eficácia de até 100% da AnB-L no tratamento de LCL (WORTMANN et al., 2010; SOLOMON et al., 2013) e LCM (SAMPAIO e MARSDEN, 1997; AMATO et al., 2011; ROCIO et al., 2014). Contudo, a falta de grandes estudos empregando a AnB-L no tratamento da LT, ainda torna esta formulação *off label* para o tratamento da LT no Brasil.

Os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados com Anfotericina B (CLN-AnB) estão emergindo como uma abordagem promissora devido à alta capacidade de carregamento de drogas, perfil de liberação controlado dos fármacos veiculados, maior estabilidade e reduzido custo (MÜLLER, et al., 2002). Os CLN-AnB utilizados neste estudo foram desenvolvidos e caracterizados pelas Dr<sup>a</sup> Franciane Oliveira, Dr<sup>a</sup> Andresa Berretta e pela Msc Maraine Tadini, em uma parceria com duas empresas brasileiras Apis Flora Industrial e Comercial Ltda / Eleve Pesquisa & Desenvolvimento, com o objetivo de desenvolver uma formulação de AnB eficaz, segura e, principalmente, com custo mais acessível. O custo do CLN-AnB é de aproximadamente R\$ 5,87 para produção/ampola, valor muito inferior aos US\$ 18/ampola do Ambisome<sup>®</sup>, produzido pela *Gilead Sciences*, companhia biofarmacêutica norte-americana (WHO, 2010).

No mais, as análises físico-químicas, realizadas por Tadini e colaboradores (2017), mostraram que os CLN-AnB são partículas esféricas com tamanho médio de  $268,0 \pm 11,8$  nm, o que representa uma vantagem farmacocinética, uma vez que o transporte de partículas de tamanho reduzido através das barreiras biológicas é facilitado, além de proporcionar maior superfície de contato com o microambiente (KHAN et al., 2013). Ademais, o Potencial Zeta, uma importante medida da carga elétrica na superfície das partículas e que pode prever a estabilidade em sistemas de suspensão, observado para os CLN-AnB foi de  $-42,5 \pm 1,5$  mV, o que sugere maior estabilidade, reduzindo o risco de agregações indesejáveis, uma vez que valores ideais de Potencial Zeta estão entre  $|30|$  e  $|60|$  mV (HEURTAULT et al., 2003). Nas análises de liberação em pH 7.4 (fisiológico) e em pH 5 (ácido), os CLN-AnB apresentaram um semelhante perfil de liberação controlada, sustentado por até 46 horas e foi mais eficiente em proteger da degradação em pH ácido o composto carregado (AnB), em comparação à formulação micelar (AnB-D). Os vacúolos parasitóforos (VP) são compartimentos ácidos com propriedades de fagolisossomais, onde as formas amastigotas do parasito se replicam. O pH sugerido para os VPs de *Leishmania* está entre 4.74 a 5.26 (ANTOINE et al., 1990). Sendo assim, nanocarreadores com perfil de liberação controlado e estável em pH acidificado, como os CLN-AnB, são promissores para controle intracelular do parasito e, portanto, para o tratamento das leishmanioses.

Neste trabalho, demonstramos pela primeira vez o potencial efeito leishmanicida *in vitro* e *in vivo* do CLN-AnB na infecção por *L. braziliensis*. Nossos dados sugerem que os CLN-AnB possuem reduzido efeito tóxico sobre MDMO *in vitro*, em comparação à AnB livre (insumo farmacêutico) e à AnB-D (medicamento Unianf<sup>®</sup>). Nossos dados corroboram com Tadini e colaboradores (2017), que também observaram que o tratamento de fibroblastos com os CLN-AnB por 24h ou 48h obteve reduzido efeito citotóxico comparado à AnB e AnB-D. Em relação ao efeito leishmanicida, a contagem de promastigotas viáveis no sobrenadante de MDMO infectados revelou que o CLN-AnB possui efeito leishmanicida semelhante ao AnB-D, demonstrado através dos valores de IC<sub>50</sub> bastante próximos para esses compostos em nosso modelo. Trata-se de um dado promissor, visto que as formulações lipídicas de AnB aprovadas para uso clínico, no geral, necessitam de concentrações maiores para obter eficácia comparável à AnB-D *in vitro* (HANSON e STEVENS, 1992; JOHNSON et al., 1998).

Neste estudo, só comparamos a eficácia dos CLN-AnB com a AnB-L (Ambisome<sup>®</sup>) de forma *in vivo*, uma vez que esta formulação apresentou eficácia variável em testes preliminares realizados *in vitro* (dados não mostrados). Ademais, o reduzido efeito citotóxico observado em

nosso modelo é devido não somente à utilização de lipídios GRAS, mas também, principalmente, ao perfil de liberação do CLN-AnB, o qual libera controladamente a AnB. Isso reflete em menos composto livre para causar efeitos tóxicos na célula hospedeira. Mesmo possuindo um perfil de liberação que disponibiliza uma menor concentração de AnB no meio biológico, porém de forma controlada ao longo do tempo, o CLN-AnB apresentou efeito leishmanicida semelhante ao observado na formulação AnB-D, a qual libera rapidamente a AnB dos micélios (PATEL, 2000; TADINI et al., 2017). Nossos achados corroboram com a já descrita característica farmacológica da AnB em possuir efeito sobre o parasito em baixas concentrações, e reforça nossos dados sobre o índice de seletividade de 1046 para a CLN-AnB e de 830 para AnB-D.

O grande desafio em usar um carreador com dimensões reduzidas é tornar sua entrega sítio-específico no interior dos macrófagos, uma vez que múltiplas membranas devem ser atravessadas pelo agente terapêutico para alcançar o parasito em seu sítio intracelular. Neste trabalho, avaliamos o *uptake* dos CLNs associados à fluorocromos por MDMO em diferentes tempos de tratamento (1, 24 e 48 h) e em duas concentrações diferentes (4 µg/mL e IC<sub>50</sub>). Nosso resultado mostra que o *delivery* intracelular dos CLNs foi eficiente, mesmo na baixa concentração representada pelo IC<sub>50</sub>. Essa rápida captação pelos macrófagos reduziria o acúmulo do medicamento em tecidos normais e saudáveis, refletindo no aumento da eficácia, na redução da toxicidade e prevenção de possíveis efeitos colaterais (BRUNI et al., 2017).

O principal mecanismo de ação sugerido para a AnB é a formação de poros na membrana do parasito, o que permitiria a passagem de eletrólitos, como K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, levando à morte celular. Entretanto, a indução do *burst* oxidativo e de efeitos imunomoduladores na célula hospedeira, são propostos como mecanismos alternativos, que complementariam a ação direta da AnB sobre as membranas (MESA-ARANGO et al., 2012). Aqui, investigamos a produção de NO e TNF-α pelas células hospedeiras infectadas e tratadas com AnB, AnB-D e CLN-AnB, por se tratar dos principais mecanismos imunológicos associado ao controle intracelular do parasito *Leishmania*. O NO é um produto de macrófagos ativados por citocinas, compostos microbianos ou ambos, e funciona como um potente agente antimicrobiano *in vitro* e *in vivo*, podendo reagir com moléculas inorgânicas, estruturas do DNA, grupos protéticos ou proteínas (BOGDAN, 2001). No contexto de leishmaniose, sabe-se que a produção de NO é importante para a resolução de leishmaniose cutânea, tanto em camundongos resistentes à infecção, como a linhagem C57BL/6 (STENGER et al., 1994, 1996), quanto em camundongos susceptíveis à infecção, como o BALB/c (NAHREVANIAN et al.,

2007, 2009), quanto em estudos em humanos (QADOUMI et al., 2002). O TNF- $\alpha$ , por sua vez, é uma citocina produzida principalmente por macrófagos e importante em processos inflamatórios. A sua produção está relacionada à ativação da atividade leishmanicida através do aumento da produção de NO, e cuja importância já foi demonstrado de forma *in vitro* e *in vivo* (TITUS et al., 1989; LIEW et al., 1990a, 1990b; NOVAIS et al., 2009). Em estudos com pacientes com LCL, D'Oliveira Junior e colaboradores (2002) associaram os altos níveis de TNF- $\alpha$  antes do tratamento e sua subsequente redução pós-tratamento à cura clínica.

Nossos resultados *in vitro* mostraram que somente a AnB livre foi capaz de induzir de forma estatisticamente significativa a produção de NO e TNF- $\alpha$  na concentração testada (IC<sub>50</sub>) em MDMO infectados com *L. braziliensis*. Trabalhos com AnB e AnB-D relatam que ambas são capazes de induzir produção de mediadores relacionados com a ativação celular e inflamação, como TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, IL1- $\beta$ , NO e EROs, porém, em diferentes intensidades. Evidências também sugerem que a produção de mediadores pró-inflamatórios induzida pela AnB é associada à toxicidade *in vitro* e aos efeitos agudos relacionados à infusão do medicamento AnB-D, como febre, dor de cabeça, dor generalizada e náuseas, efeito não observado na administração da AnB-L (GIGLIOTTI et al., 1987; CHIA et al., 1990; ARNING, et al., 1995; ROGERS et al., 1999; SAU et al., 2003). Apesar da AnB-D não induzir a produção de NO e TNF- $\alpha$  em nosso modelo de estudo, os resultados de citotoxicidade e efeito leishmanicida relatados para a AnB-D em relação à AnB, bem como os resultados encontrados para a AnB corroboram com os relatos da literatura científica prévia. Assim, este trabalho sugere uma ordem de classificação comparativa de citotoxicidade: AnB > AnB-D > CLN-AnB e de atividade leishmanicida: AnB > AnB-B = CLN-AnB, o que já era esperado, uma vez que a AnB se encontra livre para reagir no meio biológico, enquanto que nas outras duas formulações a AnB encontra-se associada e protegida por micélios ou carreadores lipídicos.

Devido aos resultados promissores nos estudos *in vitro*, nos perguntamos se o CLN-AnB seria eficaz no modelo de infecção *in vivo* por *L. braziliensis*. Para tanto, demos início a um teste piloto em modelo murino com camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*, o qual reproduz aspectos da infecção natural, como a presença de uma lesão ulcerada e a disseminação do parasito para os linfonodos drenantes (DE MOURA et al., 2005). Os animais infectados foram submetidos a diferentes esquemas terapêuticos, de acordo com o fármaco/formulação utilizado. Os medicamentos utilizados como controle medicamentoso em nosso estudo foram o Sb<sup>5+</sup> (Glucantime<sup>®</sup>, droga de primeira escolha para tratamentos das leishmanioses no Brasil) e a AnB-L (Ambisome<sup>®</sup>, emprega como primeira escolha para

tratamento da LV em grupos prioritários no Brasil). Como controle não tratado utilizamos solução glicosada a 5% (Dextrose 5%), e como controle do CLN-AnB utilizamos os carreadores sem a AnB incorporada (CLN-Ø).

Observamos que o tratamento com CLN-AnB apresentou eficácia comparável ao  $Sb^{5+}$ , que por sua vez, apresentou menores médias do tamanho de lesão e da carga parasitária no sítio da infecção na derme da orelha em relação à CLN-AnB e de forma estatisticamente significativa em relação ao controle não tratado (Dextrose 5%). Nenhum tratamento empregado foi capaz de reduzir a carga parasitária no linfonodo drenante. Resultados semelhantes foram encontrados no mesmo modelo murino de infecção por *L. braziliensis*. Santos e colaboradores (2014) avaliaram o efeito leishmanicida do 17-AAG, um inibidor da proteína HPS90, e observaram redução do tamanho de lesão e carga parasitária o sítio de infecção, sem, contudo, haver redução da carga parasitária do LN<sub>d</sub>. Celes e colaboradores (2016), avaliaram a eficácia de membranas de celulose bacteriana contendo dietilditiocarbamato (DETC) e também não observaram redução da carga parasitária no LN<sub>d</sub>, apesar de ter demonstrado ação leishmanicida no sítio de infecção, tanto para as membranas de DETC testadas quanto para o controle medicamentoso com  $Sb^{5+}$  (Glucantime<sup>®</sup>). Contudo, o mecanismo pelo qual os parasitos persistem dentro dos órgãos linfoides secundários não é conhecido. Acredita-se que persistência de patógenos, como o *Leishmania*, no hospedeiro possa ter feitos benéficos na imunidade contra o parasito, refletindo estratégias de sobrevivência tanto do parasito quanto do hospedeiro (BELKAID et al., 2002).

Apesar da AnB-L (Ambisome<sup>®</sup>) já ter sido empregada com sucesso a 5mg/kg/dia, em modelo murino de BALB/c infectado na pata com *L. major* - espécie relacionada à LT no Velho Mundo - (IMAN et al., 2017), em nosso modelo, o emprego da dose recomendada pelo MS do Brasil para este fármaco (3mg/kg/dia) não foi eficaz. Em relação a dose do  $Sb^{5+}$  utilizada nesse estudo (100mg/kg/  $Sb^{5+}$ /dia), dados do nosso grupo não mostram eficácia quando utilizado a dose de 20mg/kg/  $Sb^{5+}$ /dia, recomendada pelo MS do Brasil, no mesmo modelo de camundongo BALB/c (dados não mostrados), sendo a dose de 100mg/kg/  $Sb^{5+}$ /dia a mais eficaz para utilização como controle medicamentoso (CELES et al., 2016).

Como perspectiva, pretendemos aumentar o número de animais por grupo, avaliar em paralelo o efeito dose-resposta do CLN-AnB e AnB-L (3mg/kg/dia e 6mg/kg/dia), além da resposta imune celular e histopatologia das orelhas infectadas dos animais tratados. Esses dados poderão nos fornecer evidências robustas sobre o potencial efeito no controle da infecção por *Leishmania* pré-clínico dessa formulação.

## 9. CONCLUSÃO

Neste estudo, demonstramos pela primeira vez o potencial efeito leishmanicida *in vitro* e *in vivo* do CLN-AnB na infecção por *L. braziliensis*. Entretanto, mais estudos do efeito leishmanicida *in vivo* são necessários para consolidar a formulação de CLN-AnB como um promissor candidato para o tratamento da leishmaniose. Pensando em perspectiva, acreditamos que os CLN-AnB possam não apenas contribuir aumentando o índice terapêutico das leishmanioses, como também fomentando estudos mais profundos sobre a utilização de sistemas estáveis de entrega de droga, principalmente, em LT, devido ao seu baixo custo.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. P. et al. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 1, p. 79–81, 2005.

AMATO, V. et al. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, n. 9, p. 1026–1034, 2009.

AMATO, V. S. et al. Short report: Can we use a lower dose of liposomal amphotericin B for the treatment of mucosal American leishmaniasis? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 5, p. 818–819, 2011.

AMATO, V et al. Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isothionate. **Annals Dermatology Venereology**, v. 125, n. 8, p. 492–495, 1998.

AMATO, V. et al. Treatment of american cutaneous leishmaniasis, with lesions in the mucosa, using pentamidine isethionate. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 5, p. 477–481, 1996.

ANAISSIE, E. J. et al. Treatment of invasive fungal infections in renally impaired patients with amphotericin B colloidal dispersion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 3, p. 606–611, 1998.

ANTOINE, J. C. et al. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis* infected macrophages maintain an acidic pH. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 3, p. 779–787, 1990.

ARNING, M. K et al. Infusion-related toxicity of three different amphotericin B formulations and its relation to cytokine plasma levels. **Mycoses**, v. 465, p. 459–465, 1995.

ASHER, I.M. et al. Amphotericin B. **Analytical Profiles of Drug Substances**, v. 6, p. 1–42, 1977.

BASU, J. et al. Gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania*, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 1788–1797, 2006.

BEKERSKY, I. et al. Lipid-based amphotericin B formulations: From animals to man, **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 2, n. 6, p. 230–236, 1999.

BELKAID, Y. et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. **Nature**, v. 420, p. 502–507, 2002.

BELLOCCHIO, S. et al. Liposomal amphotericin B activates antifungal resistance with reduced toxicity by diverting Toll-like receptor signalling from TLR-2 to TLR-4. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 214–222, 2005.

BHATTACHARYA, S. K. et al. Efficacy and Tolerability of Miltefosine for Childhood Visceral Leishmaniasis in India. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 2, p. 217–221, 2004.

BOAVENTURA, V.S. et al. Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 2, p. 267–269, 2006.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature**, v. 2, n. 10, p. 907–916, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Erratas Manual 2014**. Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Tegumentar - Gráficos e Mapas**. 2017. p. 6.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2.ed. Brasília, MS., 2007,a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Serie A. Normas e Manuais Técnicos**. Brasília, Ministério da Saúde, 2007, b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar**, *Conitec*, 2016. p. 27.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tegumentar americana**. Brasília, 2013.

BRUNI, N. et al. Nanostructured delivery systems with improved leishmanicidal activity: A critical review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 5289–5311, 2017.

BUSTOS, M. F. et al. Miltefosina versus antimoniato de meglumina en el tratamiento de la leishmaniasis mucosa. **Medicina** (Argentina), v. 74, n. 5, p. 371–377, 2014.

CAMACHO, M. et al. Modification of prostanoid secretion in endothelial cells by amphotericin B acting synergistically with interleukin-1beta: possible explanation of proinflammatory effects. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 5, p. 1026–1032, 2004.

CELES, F. S. et al. DETC-based bacterial cellulose bio-curatives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. et al. Review Article New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 235–242, 2016, 2015.

CHOUHAN, G. et al. Exploring the role of medicinal plant-based immunomodulators for effective therapy of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 5, p. 1993, 2014.

CHRUSCIAK-TALHARI, A. et al. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 255–260, 2011.

COHEN, B. E. Amphotericin B toxicity and lethality : a tale of two channels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, p. 95–106, 1998.

CORREIA, D. et al. Estudo Comparativo Entre Antlmoniato De Meglumina, Isotianato De Pentamidina E Sulfato De Aminosidine, No Tratamento De Lesões Cutâneas Primárias Causadas Por *Leishmania (Viannia) Braziliensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 5, p. 447–453, 1996.

CROFT, S. L. et al. Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502–508, 2003.

DEVUYST, O. et al Case Report Nephrology Dialysis Transplantation Recurrent hemiparesis under amphotericin B for *Candida albicans* peritonitis. **Nephrol Dial Transplantation** , v. 10, n. 5, p. 699–701, 1995.

DONOVICK, R., et al. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. **Antibiot Annual**, v. 3, p. 579–586, 1956.

DORA, C. L. et al. Novas Formas Comerciais de Anfotericina B. **Revista Ciência Médica**, v. 14, n. 2, p. 187–197, 2005.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576–2597, 2012.

DORLO, T. P. C. and KAGER, P. A. Pentamidine dosage: A base/salt confusion. **PLoS Neglected Trop Dis**, v. 2, n. 5, p. 1–3, 2008.

FALCI, D. R., et al. Amphotericin b: a review on different formulations, side effects, and toxicity. **Clinical Biomedical Research**, v. 35, n. 2, p. 65–82, 2015.

FANOS, V.; CATALDI, L. Amphotericin B-Induced Nephrotoxicity. **Journal of Chemotherapy**, v. 12, p. 463–470, 2000.

FRÉZARD, F. et al. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 2009.

FRÉZARD, F. et al. Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 119–132, 2014.

GALE, E. F. The release of potassium ions from *Candida albicans* in the presence of polyene antibiotics. **Journal General Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 451–465, 1974.

GANIS, P. et al. Polyene Macrolide Antibiotic Amphotericin-B - Crystal Structure of N-Iodoacetyl Derivative. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 18, p. 4560, 1971.

GETACHEW, F.; GEDAMU, L. *Leishmania donovani* mitochondrial iron superoxide dismutase A is released into the cytosol during miltefosine induced programmed cell death. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 183, n. 1, p. 42–51, 2012.

GIGLIOTTI, F. et al. Induction of prostaglandin synthesis as the mechanism responsible for the chills and fever produced by infusing amphotericin B. **Journal of Infectious Disease.**, v. 156, n. 5, p. 784–789, 1987.

GOSSAGE, S. M. et al. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027–1034, 2003.

HANSEN, C. et al. Reduction of Sb(V) in a human macrophage cell line measured by HPLC-ICP-MS. **Biological Trace Element Research**, v. 144, n. 1–3, p. 234–243, 2011.

HANSON, L. H. et al. Comparison of antifungal activity of amphotericin B deoxycholate suspension with that of amphotericin B cholesteryl sulfate colloidal dispersion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 2, p. 486–488, 1992.

HAROLD, A. et al. Modulation of macrophage tumoricidal capability by polyene antibiotics: support for membrane lipid as a regulatory determinant of macrophage function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, p. 4349–4353, 1978.

HEPBURN, N. C. et al. Aminosidine (paromomycin) versus sodium stibogluconate for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 6, p. 700–703, 1994.

HEURTAULT, B. et al. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4283–4300, 2003.

JANKNEGHT, R. et al. Liposomal and Lipid Formulations of Amphotericin B: Clinical Pharmacokinetics. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 23, n. 4, p. 279–291, 1992. d

JENNING, V. et al. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, n. 2, p. 167–177, 2000.

JOHN, K. S. et al. In Vitro Tumor Necrosis Factor Induction Assay for Analysis of Febrile Toxicity Associated with Amphotericin B Preparations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 5, p. 906–908, 1990.

JOHNSON, E. M. et al. Comparison of in vitro antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 1412–1416, 1998.

JUNIOR, A. D. O. et al. Evaluation of IFN-  $\gamma$  and TNF-  $\alpha$  as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis IFN-  $\gamma$  e TNF-  $\alpha$  como marcadores da resposta clínica na leishmaniose cutânea. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 1, p. 7–10, 2002.

KAKKAR, V. et al. Exploring solid lipid nanoparticles to enhance the oral bioavailability of curcumin. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, n. 3, p. 495–503, 2011.

KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin b, and pentamidine resistance in leishmania. **Journal of Parasitology Research**, v. 2014, 2014

KEVRIC, I. et al. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KHADEM VATAN, S. et al. Miltefosine-Induced Apoptotic Cell Death on Leishmania major and L. tropica Strains. **Korean Journal of Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 17–23, 2011.

KHAN, A. A. et al. Advanced drug delivery to the lymphatic system: Lipid-based nanoformulations. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2733–2744, 2013.

KIP, A. E. et al. Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 57, n. 2, p. 151–176, 2018.

KRAUSE, G. K. A. Topical treatment of American methylbenzethonium chloride : cutaneous leishmaniasis with paramomycin and a clinical study under field conditions in Ecuador. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 1, p. 92–94, 1994.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**. **Nature Publishing Group**, v. 3, n. 3, p. e13, 2014.

LEMKE, M. A. Amphotericin B. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 68, p. 151–162, 2005.

LESTINOVA, T. et al. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and Leishmania. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–26, 2017.

LIEW, F. Y. et al. Tumour necrosis factor (TNF $\alpha$ ) in leishmaniasis. **Immunology**, v. 69, p. 570–573, 1990.

LIM, W. M. et al. Formulation and delivery of itraconazole to the brain using a nanolipid carrier system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 2117–2126, 2014.

LIMA, E. B. et al. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana \*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111–124, 2007.

LLANOS-CUENTAS, A. et al. Parenteral aminosidine is not effective for Peruvian mucocutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 6, p. 1128–1131, 2007.

LLANOS-CUENTAS, A. et al. Clinical and Parasite Species Risk Factors for Pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 223–231, 2008.

MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by leishmania braziliensis in Brazil: A randomized and controlled trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. 1–6, 2010.

MARTINEZ, R. An update on the use of antifungal agents. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449–460, 2006.

MATSUMORI, N. et al. Direct interaction between amphotericin B and ergosterol in lipid bilayers as revealed by <sup>2</sup>H NMR spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 33, p. 11855–11860, 2009.

MESA-ARANGO, A. C. et al. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6627–6638, 2014.

MESA-ARANGO, A. C., et al. It only takes one to do many jobs : Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1–10, 2012.

MEYERHOFF, A. U.S Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Disease**, v. 28, n. 1, p. 49–51, 1999.

MONÉ, Y. et al. Experimental Parasitology Effect of amphotericin B on the infection success of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v. 125, n. 2, p. 70–75, 2010.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Drugs**, v. 73, n. 17, p. 1889–1920, 2013.

DE MOURA, T. R. et al. Toward a novel experimental model of infection to study american cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5827–5834, 2005.

MÜLLER, R. H. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 131–155, 2002.

NAHREVANIAN, H. et al. Pharmacological evaluation of anti-leishmanial activity by in vivo nitric oxide modulation in Balb/c mice infected with *Leishmania major* MRHO/IR/75/ER: An Iranian strain of cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 233–240, 2007.

NAHREVANIAN, H. et al. Evaluation of anti-leishmanial activity by induction of nitric oxide and inhibition of prostaglandin in Balb/c mice infected with *Leishmania major*. **Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health**, v. 40, n. 6, p. 1188–98, 2009.

NEVES, L. O. et al. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092–1101, 2011.

NOGUEIRA, M. F. et al. American tegumentary leishmaniasis: Langerhans cells in Montenegro skin test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 5, p. 283–6, 2008.

NOVAIS, F. O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **Journal of immunology**, v. 183, n. 12, p. 8088–8098, 2009.

ODDS, F. C. et al. Antifungal agents: Mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, 2003.

DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontiers in Immunology**, 3, pp. 1–9, 2012.

PACE, D. Leishmaniasis. **The Journal of Infection**, v. 69, n. 1, p. S10-18, 2014.

PAILA, Y. D. et al. Amphotericin B inhibits entry of *Leishmania donovani* into primary macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, n. 3, p. 429–433, 2010.

PARDESHI, C. et al. Solid lipid based nanocarriers: An overview. **Acta Pharmaceutica**, v. 62, n. 4, p. 433–472, 2012.

PATEL, R. Amphotericin B colloidal dispersion. **Expert Opin Pharmacother**, v. 1, n. 3, p. 475–488, 2000.

DE PAULA, C. D. R. et al. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 365–371, 2003.

PESSOA, C. C. et al. *Trypanosoma cruzi* differentiates and multiplies within chimeric parasitophorous vacuoles in macrophages coinfecting with *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 5, p. 1603–1614, 2016.

PRATES, D. B. et al. New insights on the inflammatory role of *Lutzomyia longipalpis* saliva in leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

QADOUMI, M. et al. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Skin Lesions of Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4638–4642, 2002.

REUTER, S. et al. Effect of Amphotericin B on Larval Growth of *Echinococcus multilocularis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 620–625, 2003.

ROCIO, C. et al. Liposomal formulation of amphotericin B for the treatment of mucosal leishmaniasis in HIV-negative patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 3, p. 176–178, 2014.

ROGERS, P. D. et al. Amphotericin B – Induced Interleukin-1 b Expression in Human Monocytic Cells is Calcium and Calmodulin Dependent. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 4, p. 1259–1266, 1999.

ROMERO, G. A. S. et al. Open therapeutic study with aminosidine sulfate in mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 6, p. 557–565, 1996.

ROMERO, G. A. S. et al. Mucosal leishmaniasis treatment with aminosidine sulfate: results of two year follow-up'. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 6, p. 511–516, 1998.

ROMERO, G. A. S. et al. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–25, 2017.

ROMERO, G. A. S. et al. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Therapeutic response to meglumine antimoniate. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 456–465, 2001.

SAAG, M. S. et al. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 710–718, 2000.

SALAH, A. et al. Topical Paromomycin with or without Gentamicin for Cutaneous Leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 6, p. 524–532, 2013.

SALIH, N. A. W. et al. Liposomal amphotericin B for complicated visceral leishmaniasis (kala-azar) in eastern Sudan: How effective is treatment for this neglected disease? **Tropical Medicine and International Health**, v. 19, n. 2, p. 146–152, 2014.

SAMPAIO, R. N. R. et al. Tratamento da forma mucosa de leishmaniose sem resposta a glucantime, com anfotericina B liposomal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 2, p. 125–128, 1997.

SANGALLI-LEITE, F. et al. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 5, p. 457–467, 2011.

SANTOS, D. M. et al. Chemotherapeutic Potential of 17-AAG against Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*, **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 8(10), p. e3275, 2014.

SAU, K. et al. The Antifungal Drug Amphotericin B Promotes Inflammatory Cytokine Release by a Toll-like Receptor- and CD14-dependent Mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 37561–37568, 2003.

SAUPE, A. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) -- structural investigations on two different carrier systems. **Biomedical Mater Eng**, v. 15, n. 5, p. 393–402, 2005.

SAVOIA, D. View of Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **JIDC**, v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.

SAWAYA, B., et al. Amphotericin B nephrotoxicity: the adverse consequences of altered membrane properties. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 6, n. 2, p. 154–164, 1995.

SESAB. **Situação epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)** . Bahia , 2016. p. 2909.

SHOHAM, S. et al. Toll-Like Receptor 4 Mediates Intracellular Signaling Without TNF- Release in Response to *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide Capsule. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 7, p. 4620–4626, 2000).

SUNDAR, S. CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 9, p. 1275–1276, 2013.

SUNDAR, S. et al. Oral miltefosine for indian visceral leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 22, p. 1462–1471, 2002.

SILVA, J. S. F. e. et al. Treatment of American tegumentary leishmaniasis in special populations: A summary of evidence. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 669–677, 2013.

SILVEIRA, F. T. et al. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

SIMITSOPOULOU, M. et al. Differential Expression of Cytokines and Chemokines in Human Monocytes Induced by Lipid Formulations of Amphotericin B. **Society**, v. 49, n. 4, p. 1397–1403, 2005.

SINAN/SVS/MS. **Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas.** 1990 a 2013, 2013.

SINGH, N. et al. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012.

SOKOL-ANDERSON, M. et al. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 5, p. 702–705, 1988.

SOKOL-ANDERSON, M. et al. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 1, p. 76–83, 1986.

SOLOMON, M. et al. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis in travelers. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 68, n. 2, p. 284–289, 2013.

SOTO, J. et al. Limited efficacy of injectable aminosidine as single-agent therapy for Colombian cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 6, p. 695–698, 1994.

SOTO, J. et al. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1266–1272, 2004.

STENGER, S. et al. Tissue Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Is Closely Associated with Resistance to *Leishmania major*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 3, p. 783–793, 1994.

STENGER, S. et al. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 4, p. 1501–1514, 1996.

SUNDAR, et al. Single-Dose Liposomal Amphotericin B for Visceral Leishmaniasis in India Shyam. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 2, p. 504–512, 2010.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 11, p. 849–854, 2001.

SUNDAR, S. et al. Amphotericin B Treatment for Indian Visceral Leishmaniasis: Response to 15 Daily versus Alternate-Day Infusions. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 5, p. 556–561, 2007.

SUNDAR, S. et al. Injectable Paromomycin for Visceral Leishmaniasis in India. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, p. 2571–2581, 2007.

SUNDAR, S. et al. An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis Shyam. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237–252, 2015.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4267–4277, 2010.

TADINI, M.C. et al. Assessments of nanostructured lipid carriers loaded with amphotericin B: a proposal for increased stability and safety for infectious diseases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 145, p. 576–585, 2017.

TITUS, B. Y. R. G. et al. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 170, n. 6, p. 2097–2104, 1989.

TITUS, R.G. et al. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunology**, v. 7, n. 5, p. 545–55, 1985.

ULIANA, S. R. B. et al. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464–480, 2018.

VASCONCELOS, C. O. et al. Distinct cellular migration induced by *leishmania infantum* chagasi and saliva from *lutzomyia longipalpis* in a hemorrhagic pool model. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 21–27, 2014.

VÉLEZ, I. et al. Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 351–356, 2010.

VERMEERSCH, M. et al. *In vitro* susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: Practical relevance of stage-specific differences. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3855–3859, 2009.

WANESS, A. et al. The Rise of an opportunistic infection called “Invasive zygomycosis”. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 131, 2009.

WHO. Control of the leishmaniases. **World Health Organization Technical Report Series**, n. 949, p. 22–26, 2010.

WHO. WHO: Weekly epidemiological record: Global leishmaniasis update, 2006-2015, a turning point in leishmaniasis surveillance. **World Health Organization Geneva**, v. 92, n. 38, p. 557–572, 2017.

WILSON, E. et al. Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 5, p. 796–800, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis: worldwide epidemiology and drug access update. **WHO**, 2012.

WORTMANN, G. et al. Liposomal Amphotericin B for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 5, p. 1028–1033, 2010.

YANG, G. et al. Antileishmanial Mechanism of Diamidines Involves Targeting Kinetoplasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6828–6836, 2016.

YANG, T. et al. Quantifying membrane permeability of amphotericin B ion channels in single living cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1828, n. 8, p. 1794–1801, 2013.

YARDLEY, V.; CROFT, S. L. In vitro and in vivo activity of amphotericin B-lipid formulations against experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p. 193–197, 1999.

ZHANG, Y. et al. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 561–580, 2006.

ZUCCA, M. et al. New Chemotherapeutic Strategies Against Malaria, Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 502–526, 2013.

## ANEXOS

**Artigo 1. Artigo:** Parasite Killing of *Leishmania (V) braziliensis* by Standardized Propolis Extracts

## Research Article

# Parasite Killing of *Leishmania (V) braziliensis* by Standardized Propolis Extracts

Jéssica Rebouças-Silva,<sup>1,2</sup> Fabiana S. Celes,<sup>1</sup> Jonilson Berlink Lima,<sup>3</sup> Hernane S. Barud,<sup>4,5</sup> Camila I. de Oliveira,<sup>1</sup> Andresa A. Berretta,<sup>6,7</sup> and Valéria M. Borges<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

<sup>3</sup>Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, BA, Brazil

<sup>4</sup>Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

<sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Araraquara, Araraquara, SP, Brazil

<sup>6</sup>Apis Flora Industrial e Comercial Ltda., Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>7</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida do Café s/n, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Andresa A. Berretta; [andresa.berretta@apisflora.com.br](mailto:andresa.berretta@apisflora.com.br) and Valéria M. Borges; [vborges@bahia.fiocruz.br](mailto:vborges@bahia.fiocruz.br)

Received 16 February 2017; Revised 10 April 2017; Accepted 27 April 2017; Published 13 June 2017

Academic Editor: Salvatore Chirumbolo

Copyright © 2017 Jéssica Rebouças-Silva et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Treatments based on antimonials to cutaneous leishmaniasis (CL) entail a range of toxic side effects. Propolis, a natural compound widely used in traditional medical applications, exhibits a range of biological effects, including activity against infectious agents. The aim of this study was to test the potential leishmanicidal effects of different propolis extracts against *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and intracellular amastigotes in vitro. Stationary-phase *L. (V) braziliensis* promastigotes were incubated with medium alone or treated with dry, alcoholic, or glycolic propolis extract (10, 50, or 100 µg/mL) for 96 h. Our data showed that all extracts exhibited a dose-dependent effect on the viability of *L. (V) braziliensis* promastigotes, while controlling the parasite burden inside infected macrophages. Dry propolis extract significantly modified the inflammatory profile of murine macrophages by downmodulating TGF-β and IL-10 production, while upmodulating TNF-α. All three types of propolis extract were found to reduce nitric oxide and superoxide levels in activated *L. braziliensis*-infected macrophages. Altogether, our results showed that propolis extracts exhibited a leishmanicidal effect against both stages of *L. (V) braziliensis*. The low cell toxicity and efficient microbicidal effect of alcoholic or glycolic propolis extracts make them candidates to an additive treatment for cutaneous leishmaniasis.

## 1. Introduction

Leishmaniasis is a neglected vector-borne tropical disease caused by obligate protozoan parasites of the genus *Leishmania* [1–3]. Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common form of leishmaniasis worldwide, representing 50–75% of all new cases. According to the World Health Organization (WHO), the number of CL cases is around 1–1.5 million annually [4, 5]. In Brazil, *Leishmania (V) braziliensis* is the etiological agent mainly responsible for CL [6]. The CL lesion then ulcerates and may become secondarily infected with

bacteria. Secondary bacterial infections in CL lesions are responsible for pain, can prolong disease duration, increase tissue destruction, and result in increased scarring [7, 8].

Treatment of CL can be complex, and this disease may be chronic and latent in the human host. Chemotherapy to treat leishmaniasis has been based on the parenteral administration of pentavalent antimonials for more than 60 years [9]. These compounds are highly toxic and expensive and have been associated with drug resistance [1]. Amphotericin B and Paromomycin, two other currently available second-line antileishmanial treatments [10, 11], also present significant

shortcomings with regard to toxicity, cost, and duration of treatment. In this context, the search for new, safer, and more effective formulations [12], including substances from natural sources, offering less expensive and less toxic treatment options is urgently needed [13].

Propolis, a natural compound produced by *Apis mellifera* honeybees, has been widely used in traditional applications [14]. This substance has shown promising results against different infectious agents and exhibits a broad spectrum of biological properties [15–18]. The chemical composition of propolis is dependent on the biodiversity of each area visited by bees, as well as the method of extraction. These can influence the quantity and makeup of the specific biologically active compounds present in each sample, potentially leading to a range of biological effects [19, 20].

Previous studies using alcoholic and glycolic EPP-AF® extracts showed a potential antibacterial and antifungal effect in in vitro and in vivo models against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990) [21], *Saccharomyces cerevisiae* [22], and *Candida albicans* [23]. Berretta et al. [24] also showed the ability of glycolic extract to improve skin wound healing, such as in rat models of burn injury. Furthermore, a recent study also showed the ability of alcoholic propolis extract to inhibit the inflammasome, a key function mediated by the innate immune system, by reducing IL-1 $\beta$  secretion in mouse macrophages and decreasing the activation of caspase-1 [25].

Previous reports have shown that propolis extracts, mainly alcoholic extract, exhibit prominent microbicidal effects in vitro against *Leishmania* parasites, as well as reduced lesion size during experimental infection [26–30]. The present study shows for the first time a comparison of the potential leishmanicidal effect among distinct presentations of green propolis extracts, against promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania (V.) braziliensis*. Uncovering which type of excipient and chemical presentation produces the extract with most potent leishmanicidal effect is critical for development of more effective adjunct therapies to patients with poor response to conventional antimicrobial treatment.

## 2. Methodology

**2.1. Material and Reagents.** Purified water (Milli-Q), HPLC grade methanol (J. T. Baker, L. 9093-68), formic acid (Vetec, L.0804789), caffeic acid (Fluka, L. 43706045), *p*-coumaric acid (Fluka, L.3250759), cinnamic acid (Fluka, L.21907066), isosakuranetin (ChromaDex), Artepillin C (Wako, L. 016.19131), 3,4-dicaffeoylquinic acid (Phytolab; L. 13672938;  $\geq 90,0\%$  de purity), 3,5-dicaffeoylquinic acid (Phytolab; L. 13672946;  $\geq 90,0\%$  of purity), 4,5-dicaffeoylquinic acid (Phytolab; L. 13672903;  $\geq 90,0\%$  purity), gallic acid (Synth, L.109250), sodium bicarbonate (Vetec, L.0906112), and aromadendrin-4<sup>l</sup>O-methyl ether were previously isolated, identified, and [31] kindly provided by the authors. High performance liquid chromatography (HPLC) was performed using a Shimadzu chromatograph equipped with a CBM-20A controller, LC-20AT quaternary pump, an SPD-M

diodes 20A array detector, a Shimadzu Shim-Pack column CLC-ODS (M) (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5 mm particle diameter, pore diameter, 100 Å), and Shimadzu LC software version 1.21 SPI. Schneider's insect medium, lipopolysaccharide (LPS), Acridine Orange, Ethidium Bromide, IFN- $\gamma$ , and hydroxylamine were obtained from SIGMA-Aldrich (St Louis, MO, USA). Inactive fetal bovine serum (FBS), RPMI medium, penicillin, and Amphotericin B were purchased from GIBCO (Carlsbad, CA, USA). Streptomycin, L-glutamine, and Alamar Blue® were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). In addition, macrophage colony stimulating factor (M-CSF) was purchased from PEPROTECH (Rocky Hill, NJ, USA), mouse TNF-alpha and TGF-beta 1 Quantikine ELISA kits were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN), and a superoxide dismutase activity assay kit was purchased from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan).

**2.2. Propolis Extract Preparation.** Standardized alcoholic propolis extract (Batch 1402110) (PSE), glycolic propolis extract (Batch 1480210) (PGE), and water-soluble propolis dry extract (Batch 9050213) (PSDE) were produced by Apis Flora (Ribeirão Preto/SP-Brazil) by formulating a mixture of raw propolis materials [24]. These “blends” of raw propolis material were made to effectively standardize the qualitative and quantitative chemical composition of all batches, that is, ensuring reproducibility, since the compounds and concentrations of substances present in propolis vary in accordance with each geographical region of production (the states of Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul) [24].

To prepare the three different extracts, a mixture of raw propolis materials was first kept in a freezer for 12 hours and then reduced to a fine powder under maceration. To obtain each type of extract, standardized crude propolis material was initially extracted using an alcohol solution (7:3) in a dynamic maceration process, followed by percolation and filtration. Propolis glycolic extract (PGE) was obtained from standardized alcoholic propolis extract after evaporation of the ethanol portion and the addition of propylene glycol. The alcoholic and glycolic extracts contained 11% w/v of propolis dry matter. The dry propolis extract was obtained via a concentration of alcoholic extract containing around 80% of propolis dry material, followed by alkaline hydrolysis and conversion in aqueous extract by slowly adding heated purified water. The hydrolysis process following the evaporation of the hydroalcoholic solvent resulted in the ionization of the compounds found in propolis, transforming them into water-soluble structures (aqueous extract) [32]. Maltodextrin, at a ratio of 7:3 (propolis:maltodextrin by dry weight), was added and mixed under stirring and then is dried using a spray drying process.

**2.3. HPLC Chemical Characterization.** The propolis extracts were quantitatively analyzed on high performance liquid chromatography (HPLC). The mobile phase consisted of a gradient of methanol and acidified water with formic acid (0.1% v/v) ranging from 20% to 95%, for a runtime of 77 minutes at a flow rate of 0.8 mL/min. The detection wavelength was set at 275 nm [24]. To assess the flavonoid

content in the extracts, the aluminium chloride method was employed as previously described by Woisky and Salantino [33]. All samples were prepared in accordance with the mass and dilutions necessary to quantification in the analytical curve.

#### 2.4. Biological Assay

**2.4.1. Ethics Statement.** Male BALB/c mice aged 6–8 weeks were obtained from the animal care facility at CPqGM/FIOCRUZ, located in the city of Salvador, Bahia, Brazil. All animal experimentation was conducted in accordance with the Guidelines for Animal Experimentation as established by the Brazilian Council for Animal Experimentation Control (CONCEA). The present study received approval from the local institutional review board (CEUA) (protocol: CEUA-015/2015-CPqGM/FIOCRUZ).

**2.4.2. Parasites.** *Leishmania Viannia braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) parasites were cultured in Schneider's insect medium supplemented with 10% inactive fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine in 25 cm<sup>2</sup> flasks at 24°C for seven days.

**2.4.3. *L. (V.) braziliensis* Promastigote Viability Assay.** Stationary-phase *L. (V.) braziliensis* promastigotes ( $2 \times 10^5$ /mL) were cultivated in supplemented Schneider medium (as described above) alone or in the presence of three concentrations (10, 50, and 100 µg/mL) of dry, alcoholic, or glycolic propolis extract. Amphotericin B (0.25 µg/mL) was used as a positive control. All cultures were incubated for 120 hours at 24°C, after which the number of viable promastigotes was determined by direct counting performed daily in a Neubauer Chamber.

**2.4.4. Fluorescence Microscopy.** Stationary-phase *L. (V.) braziliensis* promastigotes ( $5 \times 10^5$ /mL) were cultured in supplemented Schneider medium (as described above) alone or in the presence of dry, alcoholic, and glycolic propolis extract (50 µg/mL) for 96 h at 24°C. Treatment with Amphotericin B (0.5 µg/mL) was used as positive control. The samples were mounted on cytospin slides to fluorescence microscopy. A solution containing 100 µg/mL Acridine Orange and 100 µg/mL Ethidium Bromide was prepared as previously described and added to the slides containing promastigotes [34, 35]. Parasite staining was assessed using a fluorescence microscope (OLYMPUS, Japan). Parasite promastigotes were considered alive when positively stained by Acridine Orange, while Ethidium Bromide staining was used to detect dead cells.

**2.4.5. Scanning Electron Microscopy.** Stationary-phase *L. (V.) braziliensis* promastigotes ( $5 \times 10^5$ /mL) were cultured in supplemented Schneider medium (as described above) with dry, alcoholic, and glycolic propolis extracts (50 µg/mL) for 96 h at 24°C. Supplemented Schneider medium was used as a control. The samples were then attached to coverslips and fixed in a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH =

7.4). After fixation, cells were washed in cacodylate buffer and postfixed with 1% osmium tetroxide. All samples were then dehydrated in an ethanol series (70, 80, 90, and 100°GL). Cells were finally dried by the critical point method, mounted on stubs, coated with gold (20–30 nm), and observed in a Jeol JSM 6390LV scanning electron microscope.

**2.4.6. Transmission Electron Microscopy.** Stationary-phase *L. (V.) braziliensis* promastigotes ( $10^7$ /mL) were cultured in Schneider's medium with dry extract and alcoholic and glycolic propolis extracts (50 µg/mL) for 96 h. Supplemented Schneider medium was used as a control. All samples were fixed and postfixed as described above. Cells were then dehydrated in an acetone series (70, 80, 90, and 100°GL) and embedded in Polybed resin. Ultrathin sections were mounted on 300-mesh grids, stained with 5% uranyl acetate and lead citrate, and then observed using a Jeol Jem 1230 transmission electron microscope.

**2.4.7. Macrophage Toxicity Assay.** Human macrophages ( $3 \times 10^5$ /well) were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy donors by Ficoll gradient centrifugation and plastic adherence and then allowed to differentiate into macrophages in vitro (7 days), with RPMI medium supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 mmg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine and 50 nM of M-CSF.

Bone marrow-derived murine (BMM) cells were harvested from BALB/c mice femurs and cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 7 days in RPMI medium supplemented with 20% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine and 30% L929 cell culture supernatant as a source of macrophage colony stimulating factor. Next, differentiated BMMs were detached from the plate using cold saline solution. BMMs ( $10^5$ /well) were plated in 96-well plates and cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-supplemented medium for 24 hours.

Human and BMMs uninfected macrophages were then treated with either dry extract and alcoholic or glycolic propolis extracts at varying concentrations (10, 50, and 100 µg/mL) at 37°C for 48 h. Next, the cells were reincubated for another 4 h with supplemented RPMI medium containing 10% Alamar Blue. The reagent absorbance was read at 570 nm and 600 nm using a spectrophotometer (SPECTRA Max 190). Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was used as positive control.

**2.4.8. Macrophage Infection.** Human and BMM monocytes were isolated as described above and  $2 \times 10^5$ /cells per well were seeded in 96-well plates. Macrophages were infected (10:1) with stationary-phase *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) promastigotes for 24 h and treated with varying concentrations (10, 50, and 100 µg/mL) of one of the three propolis extracts for 48 h. Next, the medium was replaced with 0.2 mL of supplemented Schneider medium. Cells were then cultured at 24°C for an additional five days and the number of viable parasites was determined by direct counting. Amphotericin B (0.25 µg/mL) was used as positive control.

TABLE 1: Chemical characterization of propolis samples.

Compounds	Alcoholic (mg/g)	Glycolic (mg/g)	Dry (mg/g)
Caffeic acid	0.215 ± 0.001	0.200 ± 0.001	0,642 ± 0.032
p-Coumaric acid	1.315 ± 0.008	1.272 ± 0.006	1.037 ± 0.003
3,5-Dicaffeoylquinic acid	1.617 ± 0.020	1.703 ± 0.017	0.696 ± 0.019
4,5-Dicaffeoylquinic acid	3.732 ± 0.231	2.488 ± 0.031	1.422 ± 0.012
Cinnamic acid	0.306 ± 0.014	ND	0.029 ± 0.001
Aromadendrin	0.955 ± 0.028	0.479 ± 0.027	0.064 ± 0.007
Drupanin	3.254 ± 0.060	2,993 ± 0.148	2.167 ± 0.008
Artepillin C	5.329 ± 0.077	4.675 ± 0.182	7.076 ± 0.040
Baccharin	0.500 ± 0.026	0.452 ± 0.045	0.907 ± 0.007
Total flavonoids	5.794 ± 0.017	6.625 ± 0.026	4,744 ± 0.359

Alcoholic and glycolic extract contained 11% w/v of propolis dry matter ( $n = 3$ ). Data shown represent mean and SD values. ND: not detected.

**2.4.9. Quantification of Inflammatory and Oxidative Stress Mediators.** BMMs ( $10^6$ /well) were stimulated with IFN- $\gamma$  (100 UI/mL) for 24 h and infected with *L. (V) braziliensis* stationary-phase promastigotes ( $10^7$ /well) for another 24 h. The macrophages were then washed to remove any noninternalized parasites, the RPMI cell medium was replaced, and IFN- $\gamma$  stimulation was reapplied together with 50  $\mu$ g/mL of dry extract and alcoholic or glycolic propolis extract for 48 h [13, 36]. Next, culture supernatants were collected. The Griess reaction was used to measure nitric oxide (NO) and superoxide ( $O_2^-$ ) production.  $O_2^-$  production was assessed by adding hydroxylamine (0.5 mM) to infected macrophages, which converts superoxide into nitrite [37]. Background levels of nitrite generated by the release of NO were determined in parallel with  $O_2^-$ , without the addition of hydroxylamine [13]. Superoxide dismutase (SOD) activity was determined using an SOD activity assay kit. Production of IL-10, TGF- $\beta$ , and TNF- $\alpha$  was evaluated using a Quantikine ELISA kit in accordance with manufacturer instructions.

**2.4.10. Statistical and Data Analyses.** Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) from experiments performed in quintuplicate. GraphPad Prism Software 5.0 (GraphPad, San Diego, CA) was used for all data analyses. The Kruskal–Wallis nonparametric test with Dunn's posttest was used for multiple comparisons. Linear trend ad hoc analysis was used to evaluate statistical significance among the groups, considered when  $p < 0.05$ .

### 3. Results

**3.1. Chemical Characterization of Standardized Propolis Extracts.** The chemical compounds found in each type of extract, following normalization to 11% of propolis dry matter, are listed in Table 1. Alcoholic extract presented higher values for each compound, except Artepillin C, baccharin, and total flavonoids as quercetin (5.329, 0.500, and 5.794 mg/g resp.). Glycolic extract showed the highest values of 3,5-dicaffeoylquinic acid (1.703 mg/g) and total flavonoids (6.625 mg/g), while dry extract (dryness) showed markedly more caffeic acid (0.642 mg/g), Artepillin C (7.076 mg/g), and baccharin (0.907 mg/g).

**3.2. Exposure to Propolis Extract Reduces the Viability of *Leishmania (V.) braziliensis* Promastigotes.** To analyze the direct effect of each type of propolis extract on parasite viability, stationary-phase *L. (V.) braziliensis* promastigotes were incubated with one of three extracts: dry, alcoholic, and glycolic extract at different concentrations (10, 50, and 100  $\mu$ g/mL) for 96 h. The viability assay (Figures 1(a)–1(c)) showed a dose-dependent reduction in the number of viable promastigotes in comparison with untreated controls, as demonstrated by analysis of the Area under the Curve (Figures 1(d)–1(f)). The propolis extracts used at 50  $\mu$ g/mL and 100  $\mu$ g/mL concentrations demonstrated significant leishmanicidal effect in comparison to untreated controls (Figure 2). The following reductions in promastigotes were observed at treatment concentrations of 10, 50, and 100  $\mu$ g/mL, respectively, in comparison to untreated parasites ( $123 \pm 15.6$ ): dry extract: 58.3% ( $58.3 \pm 21.8$ ), 98.5% ( $1.7 \pm 0.19$ ), and 99.5% ( $0.5 \pm 0.14$ ); alcoholic extract: 65.9% ( $41.9 \pm 13.6$ ), 82.6% ( $21.4 \pm 1.8$ ), and 98.8% ( $1.3 \pm 0.05$ ); glycolic extract: 67.7% ( $39.7 \pm 3.5$ ), 96.7% ( $3.96 \pm 0.16$ ), and 99.5% ( $0.6 \pm 0.03$ ). Treatment with Amphotericin B (0.25  $\mu$ g/mL), used as positive control for leishmanicidal activity, completely eliminated all parasites after 24 h of treatment (data not shown).

The propolis extract treatment concentration was standardized at 50  $\mu$ g/mL for subsequent promastigote experimentation and analysis. Moreover, fluorescence microscopy employing double staining with Acridine Orange/Bromide Ethidium (OA/BE) (Figure 3) revealed that no significant cell death was observed in the untreated control group (medium), whereas all types of propolis extract (50  $\mu$ g/mL), as well as the positive control (Amph. B), successfully killed *L. (V.) braziliensis* in vitro (Figure 3).

**3.3. Morphological and Ultrastructural Analyses of Treated *Leishmania (V.) braziliensis* Promastigotes.** Scanning electron microscopy (SEM) was employed to document morphological changes induced by treatment with propolis extract. Normal morphology was preserved in untreated parasites (Figures 4(a) and 4(b)), for example, stable cell surfaces, typically elongated shapes, and longer flagella. On the other hand, parasites treated with each type of propolis extract (50  $\mu$ g/mL) exhibited marked morphological changes, such

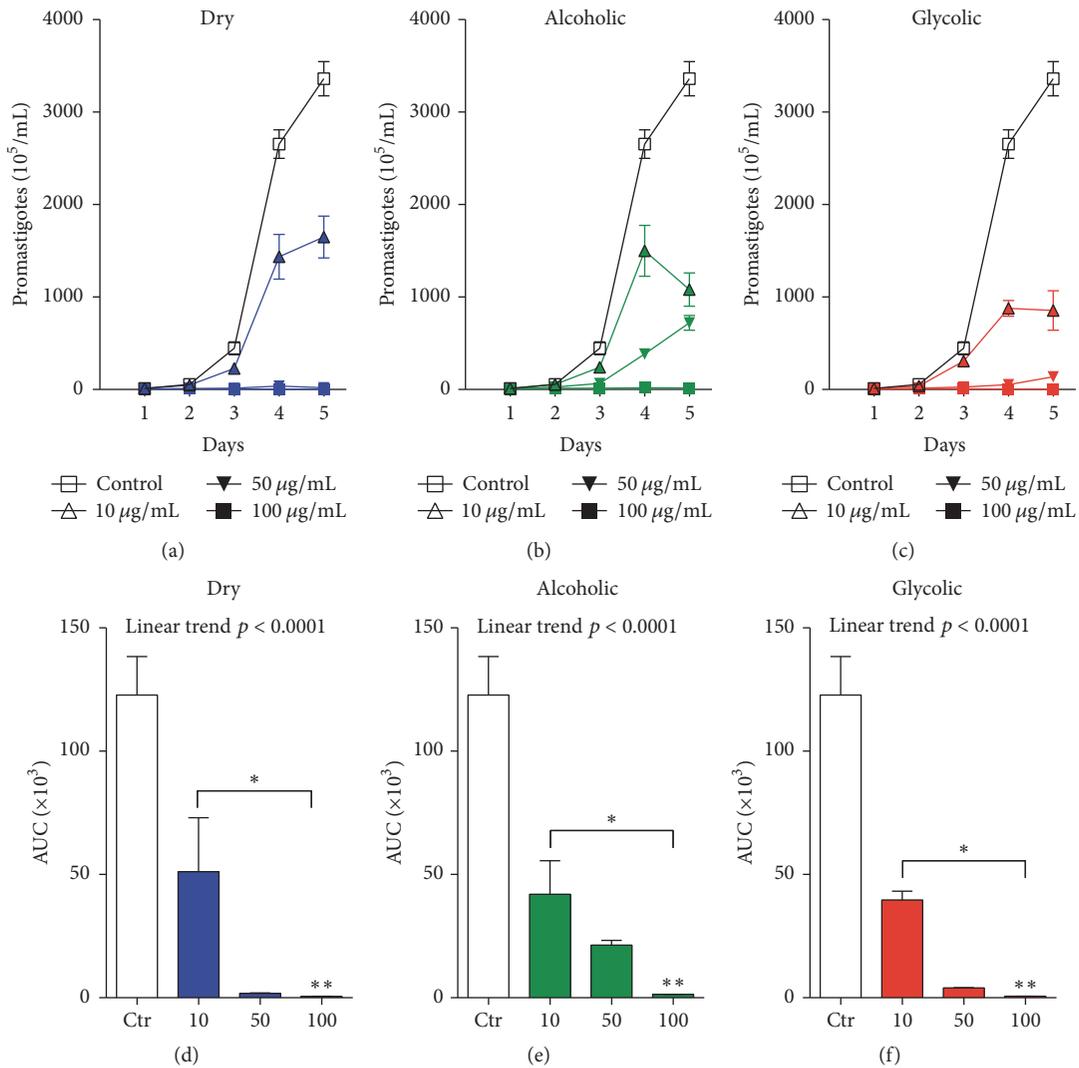


FIGURE 1: Dose-response effect of propolis extract on *L. (V. braziliensis)* promastigote viability. Parasites were incubated for 96 h with 10, 50, or 100  $\mu\text{g/mL}$  of either (a and d) dry, (b and e) alcoholic, or (c and f) glycolic propolis extract. Bars represent means  $\pm$  SD of two representative experiments performed in quadruplicate. AUC accounts for Area under the Curve and it corresponds to the area of the geometric figure made by the concentration curve of a drug as a function of time. The Kruskal–Wallis nonparametric test, followed by Dunn's posttest, was used to compare among experimental groups ( $* p < 0.05$ ,  $** p < 0.01$ , and, posttest for linear trend,  $p < 0.0001$ ).

as cell shrinkage and rounded forms, in addition to irregular surface protrusions and indentations in the plasma membrane (Figures 4(c)–4(h)).

Transmission electron microscopy (TEM) was used to investigate ultrastructural changes in treated *L. (V. braziliensis)* promastigotes (Figure 5). Analysis by TEM showed that control parasites retained normal morphology, with clearly defined membranes, preserved nuclei, Golgi complex, and flagellar pocket. In contrast, the parasites treated with alcoholic and glycolic extracts showed electron-dense granules in the cytoplasm without well-demarcated cytoplasmic organelles, suggestive of cell death. The parasites treated with dry extract showed less-marked morphological alterations, with irregular cell surfaces and an increased density of electron-dense granules in comparison to untreated promastigotes.

**3.4. Macrophage Viability and the Leishmanicidal Effects of Propolis Extract on Human and Murine Macrophages In Vitro.** Cell viability was unaffected by each concentration propolis extract tested, as assayed by Alamar Blue, in human (Figure 6(a)) and BALB/c murine macrophages (Figure 6(b)).

The leishmanicidal effect of varying concentrations (10, 50, and 100  $\mu\text{g/mL}$ ) of the three propolis extracts (dry, alcoholic, and glycolic extract) was evaluated in human and BALB/c macrophages infected with *L. (V. braziliensis)* (Figure 7). A significant reduction in the number of viable promastigotes recovered from infected cells was observed in human macrophages treated with alcoholic or glycolic extract, in comparison to untreated cells. The propolis extract treatment concentration was standardized at 50  $\mu\text{g/mL}$  for all subsequent macrophage experimentation and analysis.

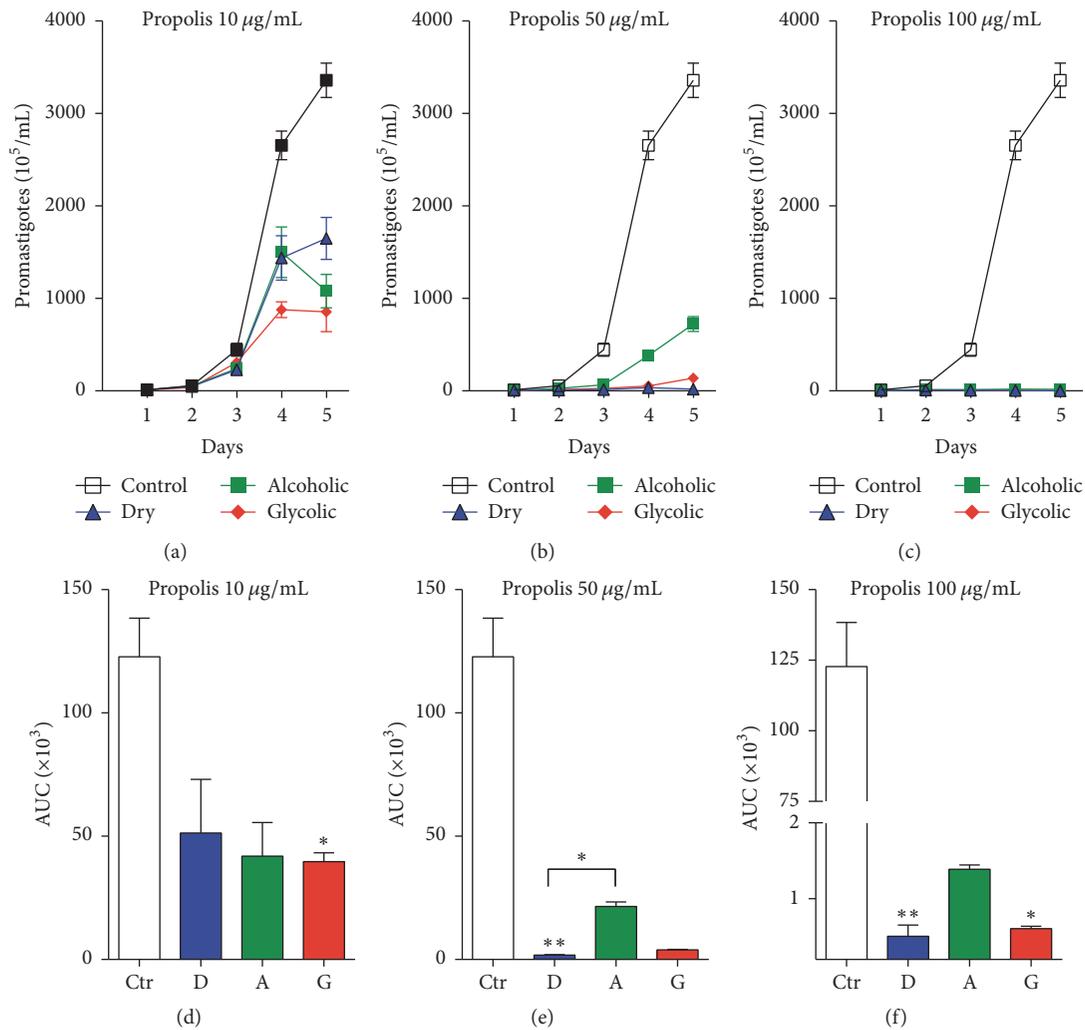


FIGURE 2: Viability of *L. (V) braziliensis* promastigotes in response to each type of propolis extract. Parasites were incubated for 96 h with dry, alcoholic, and glycolic propolis extract at (a and d) 10  $\mu\text{g/mL}$ , (b and e) 50  $\mu\text{g/mL}$ , or (c and f) 100  $\mu\text{g/mL}$ . Bars represent means  $\pm$  SD of two representative experiments performed in quadruplicate. AUC accounts for Area under the Curve and it corresponds to the area of the geometric figure made by the concentration curve of a drug as a function of time. The Kruskal–Wallis nonparametric test, followed by Dunn's posttest, was used to compare among experimental groups (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and, posttest for linear trend,  $p < 0.0001$ ).

**3.5. Inflammatory Mediator Production in Response to Propolis Extract Treatment in *L. (V) braziliensis*-Infected Murine Macrophages.** Cytokine production by unstimulated, or  $\text{INF-}\gamma$ -activated, infected murine macrophages was assessed in vitro (Figure 8). Similar levels of IL-10 and TNF- $\alpha$  were seen in unstimulated infected macrophages treated with alcoholic and glycolic extracts, without statistical significance in relation to untreated infected cells. In contrast, the unstimulated infected macrophages treated with dry extract exhibited downmodulated IL-10 but upregulated TNF- $\alpha$  production, when compared to untreated infected cells. Additionally, increased IL-10 production was observed in the  $\text{INF-}\gamma$ -activated *L. (V) braziliensis*-infected macrophages treated with glycolic extract in comparison to activated infected controls. Finally, dry extract was observed to downmodulate TGF- $\beta$ , but upregulate TNF- $\alpha$  production, in  $\text{INF-}\gamma$ -activated infected macrophages, compared to activated infected controls (Figure 8).

**3.6. Antioxidant Effects of Propolis Extract in *L. (V) braziliensis*-Infected Murine Macrophages.** All three types of propolis extract were found to reduce nitric oxide and superoxide levels in activated *L. (V) braziliensis*-infected macrophages (Figure 9). Moreover, glycolic extract was observed to significantly increase SOD activity in both non-activated and activated *L. (V) braziliensis*-infected macrophages, while alcoholic extract significantly increased SOD activity only in activated *L. (V) braziliensis*-infected macrophages, all in comparison to  $\text{INF-}\gamma$ -activated infected macrophages.

## 4. Discussion

Propolis, a complex and resinous substance composed of variable vegetable sources and honeybee secretions [20, 38], has a broad spectrum of biological effects and, therefore, has attracted the attention of scientists as an alternative to

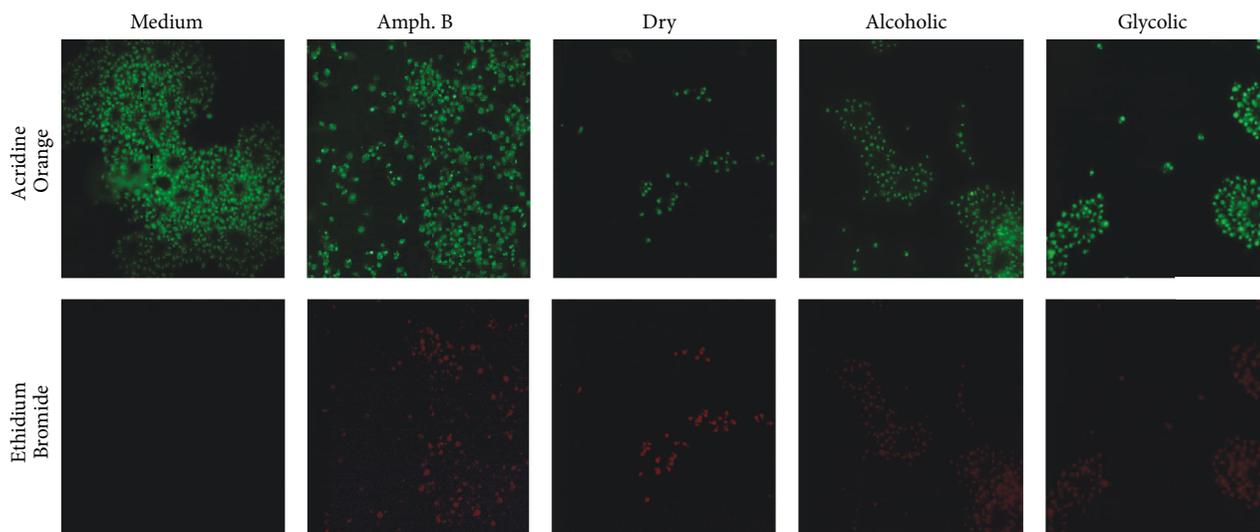


FIGURE 3: *L. (V) braziliensis* promastigote viability assessed by fluorescence microscopy. Live cells were stained with Acridine Orange (green color) and dying cells with Ethidium Bromide (red color). *L. braziliensis* promastigotes were treated with medium alone or with dry, alcoholic, or glycolic extracts of propolis (50  $\mu\text{g/mL}$ ) for 96 h. Amphotericin B treatment (0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h was used as a positive control for cell death. Magnification: 1000x.

traditional treatment in several diseases [15, 39]. Several studies have shown antileishmanial effects in vitro and in vivo in *Leishmania* parasites using murine models employing propolis extracts from different sources, including propolis from Paraná, red propolis from Alagoas, and green propolis from Minas Gerais in Brazil [14, 26, 27, 40–43].

The chemical composition of propolis varies greatly in accordance with the climatic conditions and local flora at the site of collection [15, 28–30], in addition to the method of extraction. Here, we used standardized green propolis presented in three different pharmaceutical preparations: dry, alcoholic, and glycolic extract. The most prevalent chemical components detected were phenolic acids (e.g., *p*-coumaric acid, drupanin, Artepillin C, caffeic acid, and baccharin), which is consistent with previous reports [21, 44–46]. Moreover, Artepillin C, a characteristic compound found in Brazilian green propolis, was the primary component found in the propolis extracts utilized herein. Phenolic compounds have been associated with antimicrobial, antioxidant, trypanocidal, and antitumoral activities [44, 47–52]. Previous studies have demonstrated the antileishmanial effects of *p*-coumaric acid and quercetin in in vitro and in vivo models [53, 54]. Herein, the levels of *p*-coumaric acid were found to be similar in all extracts evaluated, while total flavonoid content was higher for glycolic and alcoholic extracts (Table 1). Although it is extremely important to elucidate the chemical composition of propolis, its distinct pharmacological activities are considered complex and may be the result of synergistic interactions among various chemical compounds [55].

All propolis extracts demonstrated a direct effect against the proliferation of axenic promastigotes. The dosage of 50  $\mu\text{g/mL}$  was shown to reduce parasite viability, verified by fluorescent double staining with Acridine Orange and Ethidium Bromide. Furthermore, the alcoholic and glycolic

extracts were also shown to induce morphological and ultrastructural changes in parasites, whereas dry extract was only able to induce morphological changes. Similar morphological and ultrastructural changes consistent with decreased cell viability have been previously reported, suggestive of an apoptosis-like process induced by drugs traditionally used to treat leishmaniasis [56, 57].

None of the three propolis extracts exhibited any cytotoxic effects on BMMs or human cells after 48 h of treatment, as determined by the Alamar Blue assay. Importantly, in in vitro infection, all propolis extracts were shown to reduce *L. (V) braziliensis* burden in a dose-dependent manner. This finding is in agreement with previous reports that obtained propolis from different sources [19, 41, 58]. Moreover, treatment with alcoholic and glycolic extracts was shown to be more effective at reducing parasite numbers than dry extract, perhaps due to the distinct chemical compositions among these extracts.

The *L. (V) braziliensis*-infected macrophages treated with propolis extract were shown to modulate the production of inflammatory mediators, as well as markers of oxidative stress. Dry propolis extract significantly modified the inflammatory profile of murine macrophages by downmodulating TGF- $\beta$  and IL-10 production, while upmodulating TNF- $\alpha$ . TGF- $\beta$  and IL-10 are known to play an important role in macrophage deactivation, leading to increased parasite load in experimental models of *L. (L) amazonensis*, *L. (V) braziliensis*, and *L. (L) major* infection [59–62]. In addition, dos Santos Thomazelli et al. [63] reported an immunomodulatory effect by treatment with hydroalcoholic propolis extract on PBMCs from CL patients, as well as on PBMCs from healthy donors infected or not with *Leishmania (V) braziliensis*, in which the extract was shown to increase IL-4 and IL-17, while decreasing IL-10 levels.

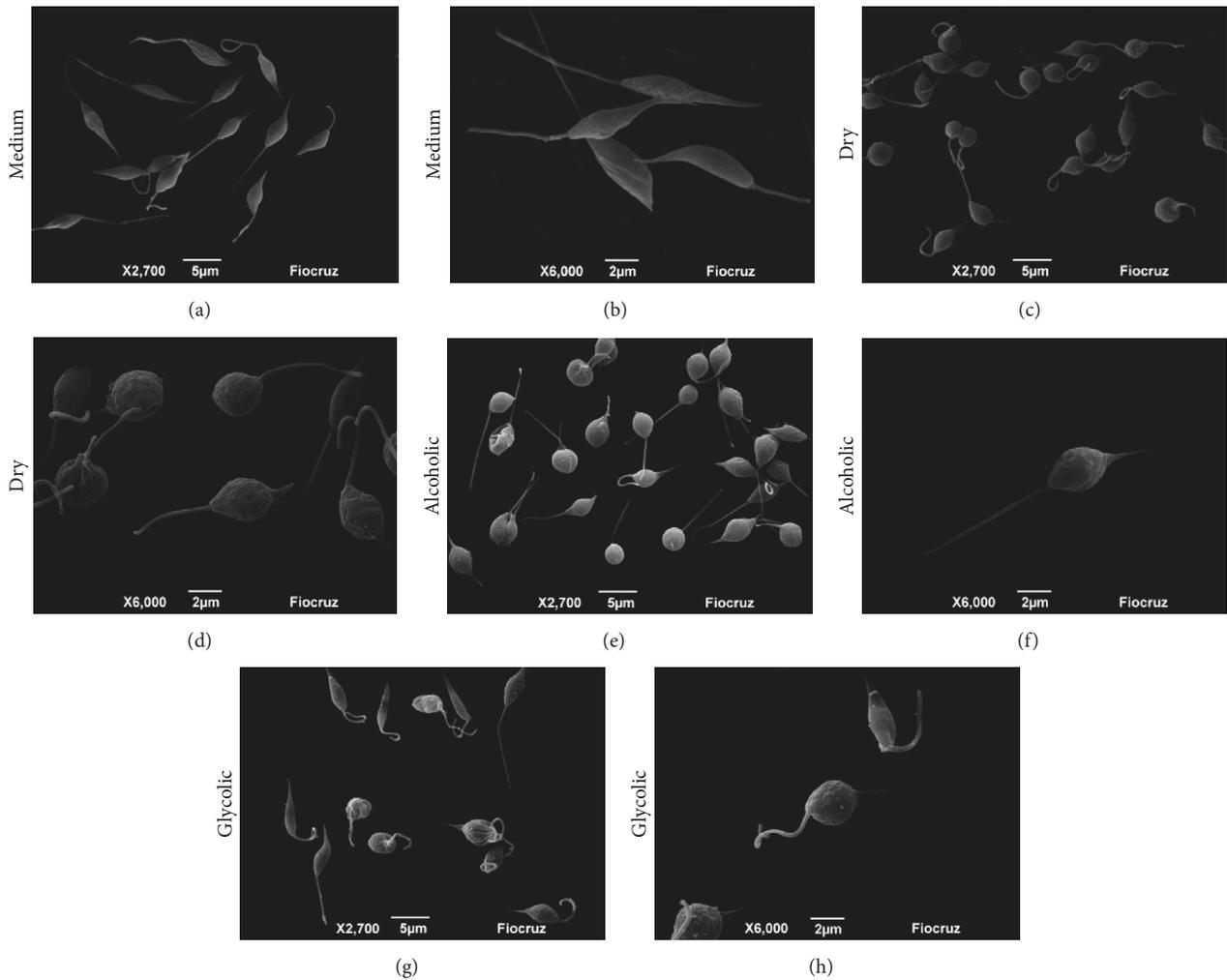


FIGURE 4: Scanning electron microscopy of morphological changes in *L. (V) braziliensis* promastigotes. Parasites were treated with either medium alone or dry, alcoholic, or glycolic extracts of propolis (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 96 h. Image amplifications show scale bar representative of 5  $\mu\text{m}$  or 2  $\mu\text{m}$ .

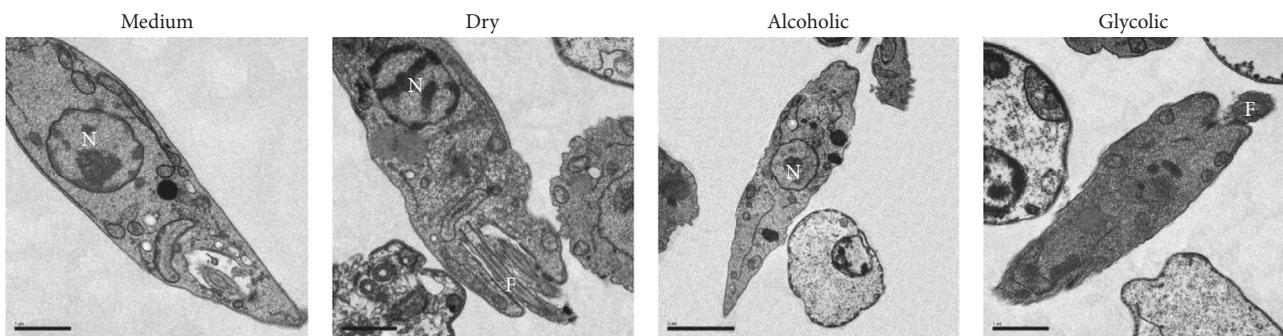


FIGURE 5: Transmission electron microscopy of ultrastructural changes and cell death in *L. (V) braziliensis* promastigotes. Parasites were treated with either medium alone or dry, alcoholic, or glycolic extracts of propolis (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 96 h. Nucleus (N). Flagellum (F). Scale bars represent 1  $\mu\text{m}$ .

The generation of reactive oxygen species (ROS), especially superoxide, and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) had both been shown to play an important role in the control of cutaneous leishmaniasis. Previous reports

have demonstrated that increases in TNF- $\alpha$  and superoxide production effectively decrease parasite load, resulting in the elimination of *L. (V) braziliensis* in vitro [64]. All of the extracts herein confirmed the antioxidant effects of

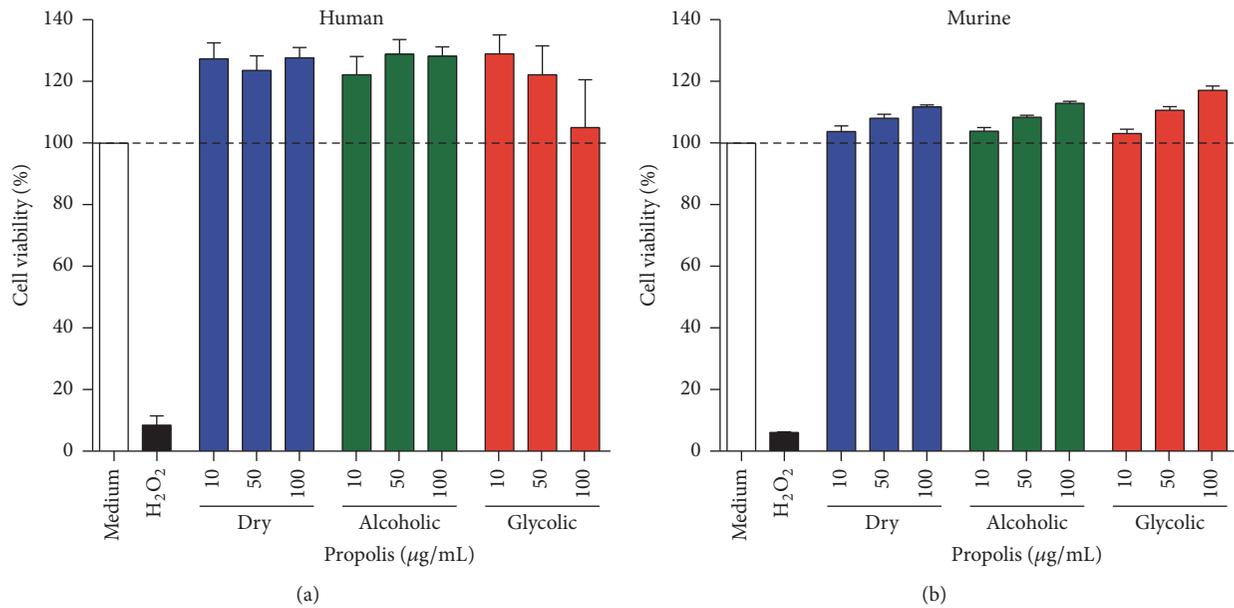


FIGURE 6: Cell cytotoxicity assessment by Alamar Blue. Data representative of viability of uninfected (a) human and (b) murine macrophages treated for 48 h with either medium alone or the dry, alcoholic, or glycolic (10, 50, and 100 µg/mL) extracts of propolis. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was used as a positive control for cell death. Bars represent mean ± SD values of three representative experiments performed using cells from six healthy human donors or in quintuplicate for murine cells.

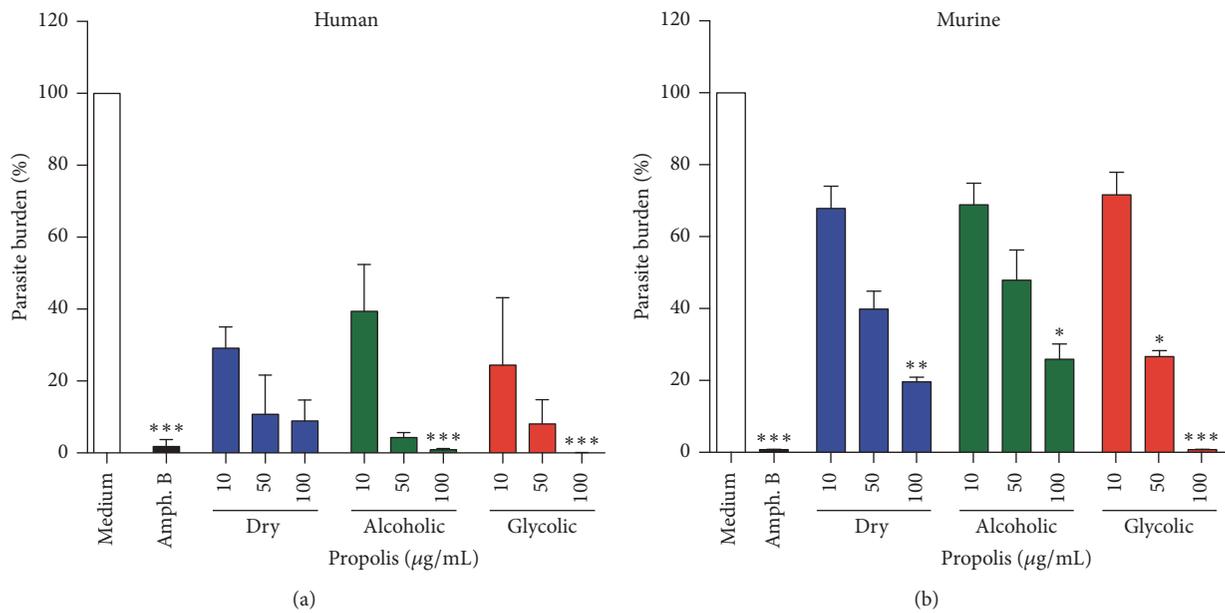


FIGURE 7: Evaluation of viability of promastigotes recovered from *L. (V) braziliensis*-infected macrophages. Human (a) and murine (b) macrophages infected for 24 h with *L. braziliensis*, treated with medium alone or with dry, alcoholic, or glycolic extracts of propolis (10, 50, and 100 µg/mL) for 48 h. Amphotericin B (0.25 µg/mL) was used as a positive control. Bars represent means ± SD of two representative experiments performed using cells from six healthy human donors or in quintuplicate for murine cells. Kruskal–Wallis nonparametric test, followed by Dunn's posttest, was used to compare among experimental groups (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ ).

propolis, as evidenced by significant decreases in nitric oxide and superoxide production [65–69]. In addition, our results showed increased superoxide dismutase (SOD) activity following treatment by alcoholic and glycolic extracts. Pronounced SOD-1 expression levels were also detected in

biopsies from New World cutaneous leishmaniasis patients [70]. The results presented herein demonstrate that different presentations of propolis extract reacted differently against *L. (V) braziliensis*. Numbers of intracellular amastigotes were reduced following treatment of infected host cells with dry

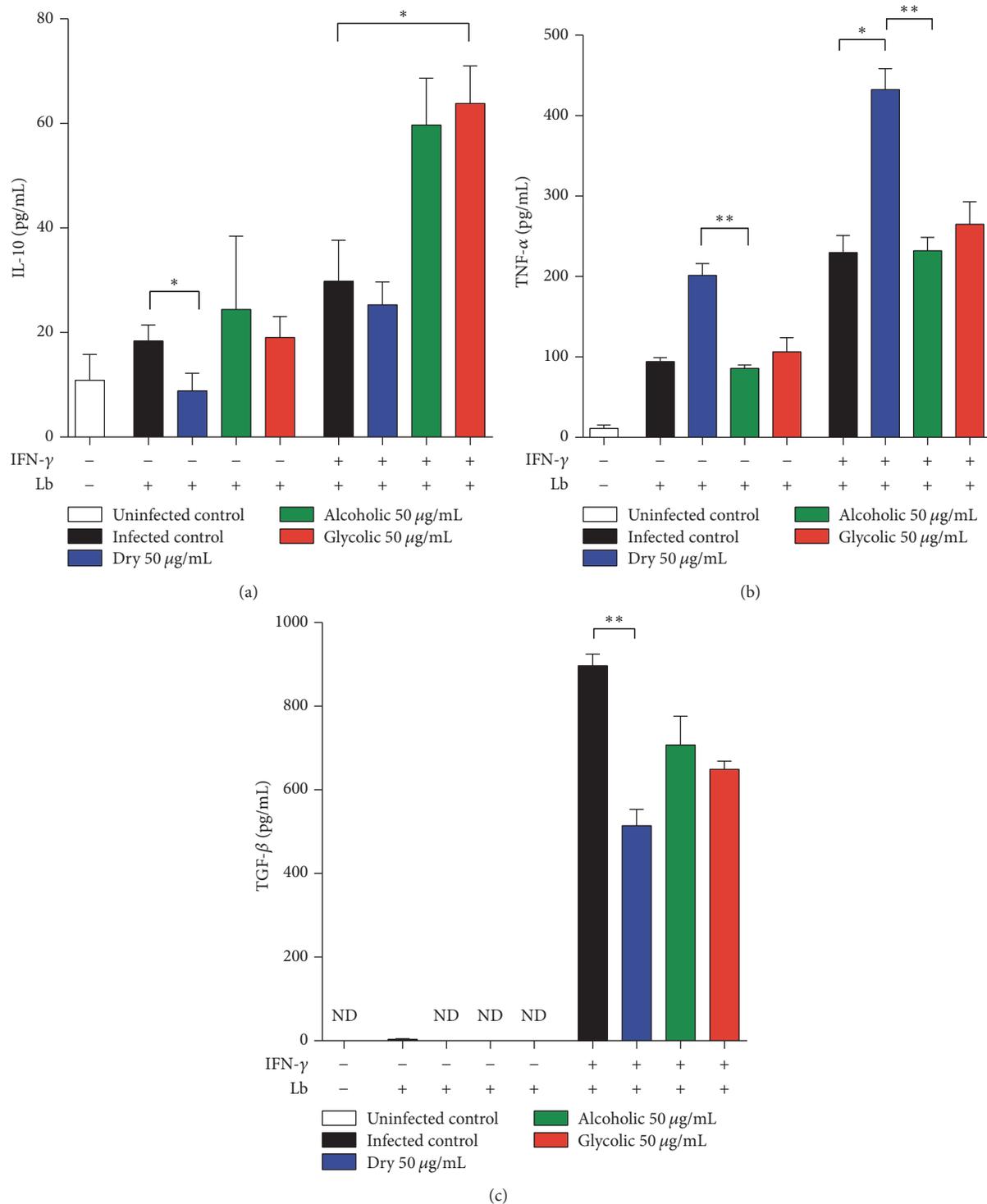


FIGURE 8: Modulation of cytokine production by propolis extract treatment. Quantification of inflammatory mediators secreted by propolis extract-treated *L. (V) braziliensis*-infected macrophages, stimulated by IFN- $\gamma$  or not, and measured in cellular supernatant, as described in Materials and Methods: (a) interleukin-10 (IL-10), (b) Transforming Growth Factor (TGF- $\beta$ ), and (c) tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ). The Kruskal-Wallis nonparametric test, followed by Dunn's posttest, was used to compare among experimental groups (\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ ).

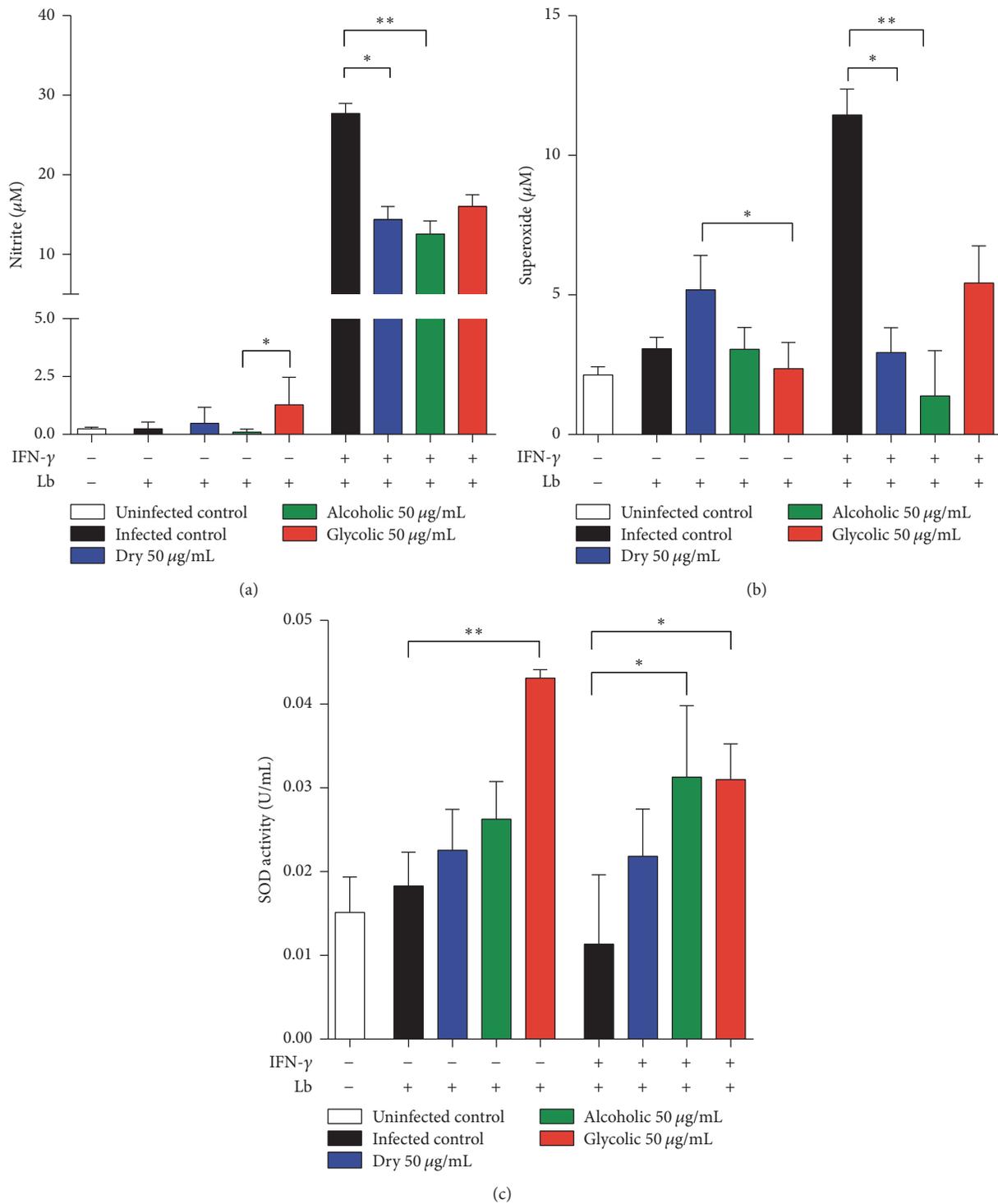


FIGURE 9: Modulation of oxidative response by propolis extract treatment. Quantification of mediators of oxidative stress released by propolis extract-treated *V. braziliensis*-infected macrophages, stimulated by IFN- $\gamma$  or not, and measured in cellular supernatant, as described in Materials and Methods: (a) nitric oxide; (b) superoxide; (c) superoxide dismutase (SOD) activity. The Kruskal–Wallis nonparametric test, followed by Dunn’s posttest, was used to compare among experimental groups (\*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ ).

extract, which was shown to produce greater levels of TNF- $\alpha$  than murine macrophages treated with alcoholic and glycolic propolis extract. This is suggestive of host cell activation, which may have led to parasite killing via the TNF- $\alpha$  pathway. Furthermore, host cells treated with the alcoholic and glycolic extracts both were shown to effectively reduce the number of amastigotes, similarly to the dry extract, but with significant increases in SOD, which is indicative of the downmodulation of the oxidative stress response. Further investigations are warranted to elucidate the underlying mechanisms by which the alcoholic and glycolic extracts act upon specific pathways, potentially offering both control of parasite burden and an anti-inflammatory effect.

## 5. Conclusions

Our findings demonstrate that propolis induced-inflammatory imbalance involving cytokines and oxidative response hallmarks the outcome of *Leishmania* infection. This would be extremely beneficial in the context of CL treatment, due to the high inflammatory profile of this disease, which leads to severe tissue damage.

## Disclosure

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision of publishing, or preparation of the manuscript.

## Conflicts of Interest

The authors declare that they do not have a commercial association that might pose conflicts of interest.

## Acknowledgments

The authors thank Andreza Souza for technical and logistics support. They thank Dr. Fábio Formiga for their helpful discussions and Dr. Adriana Rangel and Dr. Claudio Figueira for their technical assistance with the electron microscopy. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (Process no. 309988/2014-4 to Valéria M. Borges), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Process no. 2013/50496-2 to Andresa A. Berretta), and Financiadora de Estudos e Projetos, FINEP (Process no. 03.12.0056.00 to Andresa A. Berretta). Valéria M. Borges, Andresa A. Berretta, and Camila I. de Oliveira are senior investigators from CNPq. Jéssica Rebouças-Silva and Fabiana S. Celes have fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Hernane S. Barud has fellowship from CNPq.

## References

- [1] M. A. Chávez-Fumagalli, T. G. Ribeiro, R. O. Castilho, S. Odília, A. Fernandes, V. N. Cardoso et al., "Review article new delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 48, no. 3, pp. 235–242, 2015.
- [2] R. Kumar and C. Engwerda, "Vaccines to prevent leishmaniasis," *Clin Transl Immunol Nature Publishing Group*, vol. 3, no. 3, article e13, 2014, <http://www.readcube.com/articles/10.1038/cti.2014.4>.
- [3] D. Pace, "Leishmaniasis," *The Journal of Infection*, vol. 69, supplement 1, pp. S10–S18, 2014.
- [4] World Health Organization, "Leishmaniasis: worldwide epidemiology and drug access update," [http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis\\_worldwide\\_epidemiological\\_and\\_drug\\_access\\_update.pdf](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_worldwide_epidemiological_and_drug_access_update.pdf), 2012.
- [5] J. Alvar, I. D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano et al., "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 5, article e35671, 2012.
- [6] Ministério da Saúde, "Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. serie A," *Normas e Manuais Técnicos*, p. 180, 2007.
- [7] V. R. Salgado, A. T. L. de Queiroz, S. S. Sanabani, C. I. de Oliveira, E. M. Carvalho, J. M. L. Costa et al., "The microbiological signature of human cutaneous leishmaniasis lesions exhibits restricted bacterial diversity compared to healthy skin," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 111, no. 4, pp. 241–251, 2016.
- [8] P. Layegh, K. Ghazvini, T. Moghiman, F. Hadian, N. Zabolinejad, and F. Pezeshkpour, "Bacterial contamination in cutaneous leishmaniasis: its effect on the lesions' healing course," *Indian Journal of Dermatology*, vol. 60, no. 2, p. 211, 2015.
- [9] G. Chouhan, M. Islamuddin, D. Sahal, and F. Afrin, "Exploring the role of medicinal plant-based immunomodulators for effective therapy of leishmaniasis," *Frontiers in Immunology*, vol. 5, no. 5, 1993.
- [10] A. Llanos-Cuentas, G. Tulliano, R. Araujo-Castillo, C. Miranda-Verastegui, G. Santamaria-Castrellon, L. Ramirez et al., "Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 46, no. 2, pp. 223–231, 2008.
- [11] P. Machado, C. Araújo, A. T. da Silva, R. P. Almeida, A. D'Oliveira Jr., A. Bittencourt et al., "Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 34, no. 12, pp. e69–e73, 2002, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032913>.
- [12] P. A. de Smet, "The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare," *Drugs*, vol. 54, no. 6, pp. 801–840, 1998.
- [13] D. M. Santos, A. L. O. A. Petersen, F. S. Celes, V. M. Borges, P. S. T. Veras, and C. I. de Oliveira, "Chemotherapeutic potential of 17-AAG against cutaneous leishmaniasis caused by leishmania (*Viannia*) *braziliensis*," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 8, no. 10, p. e3275, 2014.
- [14] J. M. Oda, T. C. Fujita, A. D. Faveri Pitz, M. K. Amarante, I. Felipe, H. O. Saridakis et al., "Ação do extrato de própolis nas leishmaniose," *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, vol. 32, no. 1, pp. 111–121, 2011.
- [15] V. S. Bankova, S. L. de Castro, and M. C. Marcucci, "Propolis: recent advances in chemistry and plant origin," *Apidologie*, vol. 31, no. 1, pp. 3–15, 2000.
- [16] J. L. Machado, A. K. M. Assunção, M. C. P. Da Silva, A. S. D. Reis, G. C. Costa, D. D. S. Arruda et al., "Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, Article ID 157652, p. 10, 2012.
- [17] D. P. S. Leitão, A. A. D. S. Filho, A. C. M. Polizello, J. K. Bastos, and A. C. C. Spadaro, "Comparative evaluation

- of *in-vitro* effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*,” *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 27, no. 11, pp. 1834–1839, 2004.
- [18] M. K. Amarante, M. A. E. Watanabe, I. Conchon-Costa et al., “The effect of propolis on CCL5 and IFN- $\gamma$  expression by peripheral blood mononuclear cells from leishmaniasis patients,” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 64, no. 1, pp. 154–160, 2012.
- [19] S. S. da Silva, G. D. S. Thomé, A. H. D. Cataneo et al., “Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 673058, 7 pages, 2013.
- [20] B. A. S. Machado, R. P. D. Silva, G. D. A. Barreto et al., “Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil,” *PLoS ONE*, vol. 11, no. 1, Article ID e0145954, 2016.
- [21] H. D. S. Barud, A. M. de Araújo Júnior, S. Saska et al., “Antimicrobial Brazilian propolis (EPP-AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 703024, 10 pages, 2013.
- [22] P. A. de Castro, M. Savoldi, D. Bonatto et al., “Molecular characterization of propolis-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Eukaryotic Cell*, vol. 10, no. 3, pp. 398–411, 2011.
- [23] P. A. de Castro, V. L. P. Bom, N. A. Brown et al., “Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in *Candida albicans*,” *Fungal Genetics and Biology*, vol. 60, pp. 74–86, 2013.
- [24] A. A. Berretta, A. P. Nascimento, P. C. P. Bueno, M. M. D. O. L. Leite Vaz, and J. M. Marchetti, “Propolis standardized extract (EPP-AF<sup>®</sup>), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds,” *International Journal of Biological Sciences*, vol. 8, no. 4, pp. 512–521, 2012.
- [25] J. I. Hori, D. S. Zamboni, D. B. Carrão, G. H. Goldman, and A. A. Berretta, “The inhibition of inflammasome by Brazilian propolis (EPP-AF),” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 418508, 11 pages, 2013.
- [26] Miranda, Suelen Santos Silva M. M., I. N. Costa et al., “Leishmanicidal activity of brazilian propolis hydroalcoholic extract in *Leishmania*,” vol. 36, no. 2, pp. 25–34, 2015.
- [27] F. M. Ferreira, R. A. O. Castro, M. A. Batista et al., “Association of water extract of green propolis and liposomal meglumine antimoniate in the treatment of experimental visceral leishmaniasis,” *Parasitology Research*, vol. 113, no. 2, pp. 533–543, 2014.
- [28] M. Marcucci, “Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity,” *Apidologie*, vol. 26, no. 2, pp. 83–99, 1995.
- [29] P. Walker and E. Crane, “Constituents of propolis,” *Apidologie*, vol. 18, no. 4, pp. 327–334, 1987.
- [30] K. Salomão, P. R. S. Pereira, L. C. Campos et al., “Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 5, no. 3, pp. 317–324, 2008.
- [31] J. P. B. de Sousa, P. C. P. Bueno, L. E. Gregório et al., “A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography,” *Journal of Separation Science*, vol. 30, no. 16, pp. 2656–2665, 2007.
- [32] C. A. S. Andrade, M. D. L. Oliveira, N. S. Santos-Magalhães, M. T. S. Correia, and C. P. de Melo, “Comparison of the interfacial properties of *Eugenia uniflora* and *Triticum vulgare* lectins,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 68, no. 1, pp. 7–12, 2009.
- [33] R. G. Woisky and A. Salatino, “Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control,” *Journal of Apicultural Research*, vol. 37, no. 2, pp. 99–105, 1998.
- [34] K. Liu, P. C. Liu, R. Liu, and X. Wu, “Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry,” *Medical Science Monitor Basic Research*, no. 21, pp. 15–20, 2015.
- [35] D. Ribble, N. B. Goldstein, D. A. Norris, and Y. G. Shellman, “A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates,” *BMC Biotechnology*, vol. 5, article 12, 2005.
- [36] A. L. D. O. A. Petersen, C. E. S. Guedes, C. L. Versoza et al., “17-AAG kills intracellular *Leishmania amazonensis* while reducing inflammatory responses in infected macrophages,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 11, Article ID e49496, 2012.
- [37] E. F. Elstner and A. Heupel, “Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase,” *Analytical Biochemistry*, vol. 70, no. 2, pp. 616–620, 1976.
- [38] K. W. Washio, Y. S. Himamoto, and H. K. Itamura, “Brazilian propolis extract increases leptin expression in mouse adipocytes,” *Biomedical Research*, vol. 36, no. 5, pp. 343–346, 2015.
- [39] W. Siheri, T. Zhang, G. U. Ebiloma et al., “Chemical and antimicrobial profiling of propolis from different regions within Libya,” *PLoS ONE*, vol. 11, no. 5, Article ID e0155355, 2016.
- [40] D. C. Ayres, M. C. Marcucci, and S. Giorgio, “Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*,” *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 102, no. 2, pp. 215–220, 2007.
- [41] K. Pontin, A. A. da Silva Filho, F. F. Santos et al., “In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract,” *Parasitology Research*, vol. 103, no. 3, pp. 487–492, 2008.
- [42] N. S. Silva and V. D. Muniz, “Epidemiology of American tegumentary leishmaniasis in the State of Acre, Brazilian Amazon,” *Cad saude publica/Minist da Saude, Fund Oswaldo Cruz, Esc Nac Saude Publica*, vol. 25, no. 6, pp. 1325–1336, 2009.
- [43] M. M. Miranda, C. Panis, A. H. D. Cataneo et al., “Nitric oxide and Brazilian propolis combined accelerates tissue repair by modulating cell migration, cytokine production and collagen deposition in experimental leishmaniasis,” *PLoS ONE*, vol. 10, no. 5, Article ID e0125101, pp. 1–19, 2015.
- [44] J. Wu, C. Omene, J. Karkoszka et al., “Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer,” *Cancer Letters*, vol. 308, no. 1, pp. 43–53, 2011.
- [45] T. Hata, S. Tazawa, S. Ohta, M.-R. Rhyu, T. Misaka, and K. Ichihara, “Artepillin C, a major ingredient of brazilian propolis, induces a pungent taste by activating TRPA1 channels,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 11, Article ID e48072, pp. 1–9, 2012.
- [46] J. P. B. Sousa, N. A. J. C. Furtado, R. Jorge, A. E. E. Soares, and J. K. Bastos, “Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil,” *Brazilian J Pharmacogn*, vol. 17, no. 1, pp. 85–93, 2007.
- [47] M. C. Marcucci, F. Ferreres, C. García-Viguera et al., “Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological

- activities," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 74, no. 2, pp. 105–112, 2001.
- [48] E. Szliszka, A. Mertas, Z. P. Czuba, and W. Król, "Inhibition of inflammatory response by artemisinin in activated RAW264.7 macrophages," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 735176, 11 pages, 2013.
- [49] N. Paulino, S. R. L. Abreu, Y. Uto et al., "Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artemisinin C, in Brazilian propolis," *European Journal of Pharmacology*, vol. 587, no. 1–3, pp. 296–301, 2008.
- [50] A. Larki-Harchegani, A. A. Hemmati, A. Arzi, M. Ghafurian-Borojerdnia, S. Shabib, M. R. Zadkarami et al., "Evaluation of the effects of caffeic acid phenethyl ester on prostaglandin E2 and two key cytokines involved in bleomycin-induced pulmonary fibrosis," *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 16, no. 7, pp. 850–857, 2013.
- [51] N. Orsolic, S. Terzic, Z. Mihaljevic, L. Sver, and I. Basic, "Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 28, no. 10, pp. 1928–1933, 2005.
- [52] A. A. D. S. Filho, D. O. Resende, M. J. Fukui et al., "In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae)," *Fitoterapia*, vol. 80, no. 8, pp. 478–482, 2009.
- [53] E. S. Dezaki, H. Mahmoudvand, F. Sharififar, S. Fallahi, L. Monzote, and F. Ezatkah, "Chemical composition along with anti-leishmanial and cytotoxic activity of *Zataria multiflora*," *Pharmaceutical Biology*, vol. 54, no. 5, pp. 752–758, 2015.
- [54] G. Sen, S. Mukhopadhyay, M. Ray, and T. Biswas, "Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 61, no. 5, pp. 1066–1075, 2008.
- [55] W. Krol, S. Scheller, J. Shani, and G. C. Z. Pietsz, "Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*," *Arzneimittelforschung*, vol. 43, no. 5, pp. 607–609, 1993.
- [56] M. A. Vannier-Santos and S. L. de castro, "Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill," *Current Drug Targets*, vol. 10, no. 3, pp. 246–260, 2009.
- [57] F. A. Marinho, K. C. S. Gonçalves, S. S. C. Oliveira et al., "The calpain inhibitor MDL28170 induces the expression of apoptotic markers in leishmania amazonensis promastigotes," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, Article ID e87659, 2014.
- [58] D. C. Ayres, T. A. Fedele, M. C. Marcucci, and S. Giorgio, "Potential utility of hyperbaric oxygen therapy and propolis in enhancing the leishmanicidal activity of glucantime," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, vol. 53, no. 6, pp. 329–334, 2011.
- [59] A. Barral, M. Teixeira, P. Reis, V. Vinhas, J. Costa, H. Lessa et al., "Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis," *The American Journal of Pathology*, vol. 147, no. 4, pp. 947–954, 1995.
- [60] C. I. de Oliveira and C. I. Brodskyn, "The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection," *Frontiers in Immunology*, vol. 3, article 145, pp. 1–9, 2012.
- [61] M. Barral-Netto, A. Barral, C. E. Brownell et al., "Transforming growth factor- $\beta$  in leishmanial infection: A parasite escape mechanism," *Science*, vol. 257, no. 5069, pp. 545–548, 1992.
- [62] A. Barral, M. Barral-Netto, E. C. Yong, C. E. Brownell, D. R. Twardzik, and S. G. Reed, "Transforming growth factor  $\beta$  as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 8, pp. 3442–3446, 1993.
- [63] A. P. F. dos Santos Thomazelli, F. Tomiotto-Pellissier, S. S. da Silva, C. Panis, T. M. Orsini, A. H. D. Cataneo et al., "Brazilian propolis promotes immunomodulation on human cells from American Tegumentar leishmaniasis patients and healthy donors infected with *L. braziliensis*," *Cellular Immunology*, pp. 10–15, 2016.
- [64] F. O. Novais, R. C. Santiago, A. Báfica et al., "Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection," *Journal of Immunology*, vol. 183, no. 12, pp. 8088–8098, 2009.
- [65] R. A. de Sá, F. A. V. de Castro, E. C. A. Eleutherio, R. M. de Souza, J. F. M. da Silva, and M. D. Pereira, "Brazilian propolis protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress," *Brazilian journal of microbiology: publication of the Brazilian Society for Microbiology*, vol. 44, no. 3, pp. 993–1000, 2013.
- [66] D. Ferreira, H. C. Rocha, L. C. Kreutz et al., "Bee products prevent agrichemical-induced oxidative damage in fish," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 10, Article ID e74499, 2013.
- [67] T. D. Kwon, M. W. Lee, and K. H. Kim, "The effect of exercise training and water extract from propolis intake on the antioxidant enzymes activity of skeletal muscle and liver in rat," *Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry*, vol. 18, no. 1, pp. 9–17, 2014.
- [68] A. F. Wali, B. Avula, Z. Ali et al., "Antioxidant, hepatoprotective potential and chemical profiling of propolis ethanolic extract from kashmir himalaya region using UHPLC-DAD-QToF-MS," *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 393462, 10 pages, 2015.
- [69] T. G. do Nascimento, P. F. da Silva, L. F. Azevedo et al., "Polymeric Nanoparticles of Brazilian red propolis extract: preparation, characterization, antioxidant and leishmanicidal activity," *Nanoscale Research Letters*, vol. 11, no. 1, article 301, 2016.
- [70] R. Khouri, A. Báfica, M. D. P. Silva et al., "IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis," *Journal of Immunology*, vol. 182, no. 4, pp. 2525–2531, 2009.