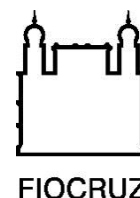




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE
MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA
CONTENDO DIETILDITIOCARBAMATO (DETC) NA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *L. BRAZILIENSIS***

FABIANA SANTANA CELES

Salvador-Bahia

2015

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE
MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA
CONTENDO DIETILDITIOCARBAMATO (DETC) NA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *L. BRAZILIENSIS***

FABIANA SANTANA CELES

Orientadora: Dra. Camila Indiani de Oliveira

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós Graduação em Patologia
para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador-Bahia
2015**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C392a Celes, Fabiana Santana
Avaliação do potencial terapêutico de membranas de celulose bacteriana contendo dietilditiocarbamato (DETC) na infecção experimental por *L. braziliensis* / Fabiana Santana Celes. - 2015.
57 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dra. Camila Indiani de Oliveira, Laboratório de Imunoparasitologia.

Dissertação (Mestrado de Patologia) –Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2015.

1. Leishmaniose cutânea. 2. Dietilditiocarbamato. 3. Celulose bacteriana. I. Título.

CDU 616.993.161

“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA CONTENDO DIETILDITIOCARBAMATO (DETC) NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR L. BRAZILIENSIS”

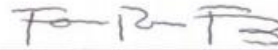
FABIANA SANTANA CELES

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Paulo Roberto Lima Machado
Pesquisador Associado
UFBA



Dr. Fabio Rocha Formiga
Professor Adjunto
UPE



Dra. Camila Indiani de Oliveira
Pesquisadora Titular
CPqGM/FIOCRUZ

À Deus pelo sustento e presença durante toda a minha vida.

Aos meus pais Mauro Celes e Rita Celes por todo amor, carinho e esforços dedicados a mim.

À minha irmã Rafaela Celes pelo incentivo e afeto.

Aos meus familiares, especialmente meus avós, pelo amor, compreensão e por sempre torcerem pelo meu sucesso, mesmo com a minha ausência em muitos momentos.

Aos meus amigos pelos risos, auxílio, compreensão e apoio.

Amo a todos vocês!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Camila Indiani de Oliveira pela confiança, paciência, orientação, compreensão, dedicação, incentivo e investimento.

À Dra. Valéria de Matos Borges, Dr. Johan Van Weyenbergh e Dr. Ricardo Khouri pela dedicação e apoio nas discussões.

A Dr. Hernane Barud, Dra. Eliane Trovatti e Dr. Sidney Ribeiro, do Instituto de Química da UNESP, pela acolhida no laboratório e colaboração no desenvolvimento das membranas de biocelulose.

Ao Dr. Diego M. Santos pela amizade, paciência constante, dedicação em ensinar tudo o que sabe e pelo auxílio na minha caminhada no laboratório e aos meus companheiros Rebecca Curvelo e Lucas Moura pela imensa ajuda nos ensaios *in vivo*. Não sei o que seria de mim sem vocês!

Aos companheiros do grupo “Camilux”: Sarah Falcão, Rômulo Santiago, Kiyoshi Fukutani, Sayonara Melo e Heloise Costa pelo apoio, boa convivência, paciência e ensinamentos.

Aos amigos do LIP: Juqueline Cristal, Vinícius Costa, Petter Entringer, Regis Gomes, Paulo Matos, Vanessa Riesz, Diva Trindade, Katrine Bezerra e Larissa Costa pelo apoio, amizade e convivência agradável.

Ao Dr. Jorge Clarêncio e a Me. Daniela Andrade pelo auxílio com os ensaios de Citometria de Fluxo.

À Andrezza e Elze, secretárias do LIP-LIMI, por todo apoio e dedicação.

À Elaine, por todo o apoio durante a caminhada e por ter se tornado uma grande amiga.

A todos os pesquisadores e colegas do LIP e LIMI pelas discussões enriquecedoras e excelente convívio.

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.

CELES, Fabiana Santana. Avaliação do potencial terapêutico de membranas de celulose bacteriana contendo dietilditiocarbamato (DETC) na infecção experimental por *L. braziliensis*. 61 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

A leishmaniose continua sendo um problema de saúde pública mundial. As opções terapêuticas limitadas, a toxicidade dos fármacos disponíveis e os relatos de resistência reforçam a necessidade do desenvolvimento de novas opções terapêuticas. Neste contexto, nós demonstramos previamente que o dietilditiocarbamato (DETC), um inibidor da enzima superóxido dismutase1 (SOD1), pode diminuir a infecção por *L. braziliensis*, *in vivo*. Neste trabalho, nós testamos o DETC numa formulação tópica empregando membranas de celulose bacteriana (BC-DETC). O tratamento de macrófagos murinos infectados por *Leishmania* com BC-DETC resultou na morte dos parasitas intracelulares de forma direta e dose-dependente, sem evidência de efeito tóxico para as células hospedeiras. A morte parasitária, *in vitro*, foi associada com a diminuição da atividade da SOD1, em paralelo com o aumento da produção de superóxido e de citocinas pró-inflamatórias. A eficácia de BC-DETC, *in vivo*, foi demonstrada em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. A aplicação tópica de BC-DETC à lesão cutânea diminuiu significativamente a úlcera na orelha e a carga parasitária no sítio de infecção. Adicionalmente, a resposta inflamatória, avaliada pela expressão de IFN- γ e TNF- α , foi suprimida *in situ*, bem como na resposta de memória (*recall*) usando células do linfonodo drenante. Finalmente, BC-DETC foi capaz de reduzir a carga parasitária em macrófagos humanos, um efeito que foi revertido na presença de antioxidante. Conjuntamente, estes resultados apontam para a viabilidade do uso de BC-DETC como uma nova formulação para a quimioterapia da leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*.

Palavras – chave: Leishmaniose cutânea, Dietilditiocarbamato, Celulose bacteriana

CELES, Fabiana Santana. Therapeutic potential of topical bacterial cellulose containing DETC in cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis*. 61 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Leishmaniasis remains a worldwide public health problem. The limited therapeutic options, drug toxicity and reports of resistance reinforce the need for the development of new treatment options. Among these options, we previously showed that diethyldithiocarbamate (DETC), a superoxide dismutase 1 inhibitor (SOD1), can decrease *L. braziliensis* infection, *in vivo*. Herein, we tested DETC in a topical formulation employing bacterial cellulose membranes (BC-DETC). Treatment of leishmania-infected murine macrophages with BC-DETC resulted in a direct and dose-dependent killing of intracellular parasites, without pronounced toxic effects to host cells. *In vitro* parasite killing was associated with decreased SOD1 activity paralleled by increased superoxide and pro inflammatory cytokine production. *In vivo* efficacy of BC-DETC was then demonstrated in *L. braziliensis*-infected BALB/c mice. Topical application of BC-DETC to dermal lesions significantly decreased ear thickness and parasite load at the infection site. Additionally, the inflammatory response, namely expression of IFN- γ and TNF- α , was down modulated *in situ* as well as in recall responses employing draining lymph node cells. Finally, BC-DETC was also capable of decreasing parasite load within human macrophages, an effect that was reversed in the presence of anti-oxidants. Collectively, these results point to the feasibility of using BC-DETC as a new topical formulation for the chemoprophylaxis of cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis*.

Key words: Cutaneous leishmaniasis, Ditiocarb, Bacterial cellulose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da membrana de celulose bacteriana e suas potenciais aplicações.	22
Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de membranas de celulose bacteriana (BC) e BC contendo DETC (BC-DETC).....	34
Figura 3. Espectro de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) obtido de membranas de celulose bacteriana (BC) e membranas de celulose bacteriana contendo DETC (BC-DETC).	36
Figura 4. Efeito de membranas de celulose bacteriana contendo DETC (BC-DETC) na viabilidade celular.	37
Figura 5. Efeito dose-dependente de BC-DETC em macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i>	38
Figura 6. Tratamento com BC-DETC reduz a atividade da SOD e modula a resposta imune em macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i>	39
Figura 7. Desenvolvimento da LC em camundongos infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com BC-DETC.....	40
Figura 8. O tratamento tópico com BC-DETC modula a LC causada por <i>L. braziliensis</i>	42
Figura 9. Expressão <i>in situ</i> de citocinas em camundongos infectados e tratados com BC-DETC.....	44
Figura 10. Perfil de citocinas secretadas por células do linfonodo de camundongos tratados com BC-DETC.....	45
Figura 11. Efeito leishmanicida de BC-DETC em macrófagos humanos infectados com <i>L. braziliensis</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS

17-AAG	Alilamino-17-demetoxigeldanamicina
AIDS	do inglês <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
CBA	do inglês <i>Cytometric Bead Array</i>
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
GAPDH	do inglês <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GTP	Guanina Trifosfato
HIV	do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSP 90	do inglês Heat shock protein 90
IFN- β	Interferon β
IFN-γ	Interferon γ
IL-10	Interleucina 10
IL-12p70	Interleucina 12p70
IL-17	Interleucina 17
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
KMP-11	do inglês <i>kinetoplastid membrane protein11</i>
iNOS	do inglês <i>inducible nitric oxide synthase</i>
MCP-1	do inglês <i>Monocyte chemoattractant protein1</i>
MMP 2	Metaloproteinase de matriz 2
MMP 9	Metaloproteinase de matriz 9
NAC	N-acetil-cisteína
PE	Ficoeritrina
Sb+3	Antimonial Trivalente
TGF-β	do inglês <i>Transforming growth factor β</i>
TNF-α	do inglês <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
VEGF	do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE.....	14
1.2 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE.....	15
1.3 SOD1 COMO ALVO TERAPÊUTICO NA LEISHMANIOSE	18
1.4 CELULOSE BACTERIANA COMO SUPORTE DE <i>DELIVERY</i> DE FÁRMACOS .	21
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 ANIMAIS.....	26
4.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BC-DETC.....	26
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DE MEMBRANAS DE BC-DETC	27
4.4 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA	27
4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR AZUL DE TRYPAN.....	28
4.6 CULTURA DE PARASITAS	28
4.7 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS COM <i>L. BRAZILIENSIS</i> E O TRATAMENTO COM BC-DETC	28
4.8 QUANTIFICAÇÃO DE SUPERÓXIDO E ATIVIDADE DA SOD.....	29
4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS	29
4.10 INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C E TRATAMENTO COM BC-DETC..	30
4.11 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM BC- DETC.....	30
4.12 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	31
4.13 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS, INFECÇÃO E TRATAMENTO COM BC-DETC.....	32

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE BC-DETC POR MEV E FTIR	34
5.2 MEMBRANAS DE BC-DETC INDUZEM A MORTE DOSE-DEPENDENTE DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> EM MACRÓFAGOS INFECTADOS	36
5.3 TRATAMENTO COM BC-DETC REDUZ A ATIVIDADE DA SOD 1 E AUMENTA A LIBERAÇÃO DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS COM <i>L. BRAZILIENSIS</i>	38
5.4 TRATAMENTO COM BC-DETC REDUZ A LESÃO E A CARGA PARASITÁRIA NA ORELHA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>L. BRAZILIENSIS</i>	40
5.5 TRATAMENTO COM BC-DETC MODULA O PERFIL DE CITOCINAS EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>L. BRAZILIENSIS</i>	43
5.6 MEMBRANAS DE BC-DETC TEM AÇÃO LEISHMANICIDA EM MACRÓFAGOS HUMANOS INFECTADOS COM <i>L. BRAZILIENSIS</i>	46
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por diferentes espécies de parasitas do gênero *Leishmania*. Sua transmissão ocorre através da picada de insetos vetores dos gêneros *Lutzomyia spp* e *Phlebotomus spp* infectados pelo parasita. O ciclo de transmissão inicia-se quando fêmeas dos insetos vetores, colonizadas por parasitas em seu intestino, injetam as formas promastigotas de *Leishmania* junto com sua saliva, na derme do hospedeiro vertebrado. No lago sanguíneo formado na derme, as promastigotas são fagocitadas por neutrófilos e macrófagos e, no fagolisossomo, transformam-se em amastigotas, replicam e dão continuidade à infecção, parasitando novas células. O ciclo completa-se, quando num novo repasto sanguíneo, fêmeas de insetos vetores alimentam-se com o sangue do hospedeiro vertebrado contendo macrófagos infectados por *Leishmania*. No intestino do inseto vetor, estas amastigotas sofrem metaciclogênese até chegarem à forma infectante denominada promastigota metacíclica.

A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada, pois é endêmica em 98 países, sendo 72 países em desenvolvimento, incluindo as 13 nações menos desenvolvidos do mundo (WHO, 2013; CECILIO et al., 2014). Atualmente, está estimado em 12 milhões o número de pessoas infectadas em todo o mundo, com aproximadamente 310 milhões de indivíduos vivendo em áreas de risco, como grande parte da América do Sul e Central, África, Ásia e Mediterrâneo (WHO, 2013). Dentre as formas clínicas da leishmaniose encontram-se a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT), entretanto a forma e a gravidade da doença dependem da espécie de *Leishmania* e do estado imunológico do hospedeiro (CUNNINGHAM, 2002).

Nas Américas, a LT é causada por diferentes espécies do parasita, sendo as principais: *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* (LAINSON e SHAW, 1978). A LT apresenta diversas manifestações clínicas, e uma das principais é a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL). No Brasil,

essa forma da doença é ocasionada principalmente pelas espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (LESSA et al., 2007). A LCL é caracterizada por úlceras restritas à derme das partes expostas do corpo, tais como, face, pernas e braços, que se transformam em cicatrizes permanentes. O desenvolvimento da LCL deve-se a um produto da interação da multiplicação do parasita, das degenerações causadas por esta multiplicação e da resposta imune do paciente (ZAJTCHUK et al., 1989). A doença surge após um período de incubação variável, de poucas semanas a meses. A lesão se origina no ponto da picada do flebótomo, podendo ser única ou múltipla, evoluindo de pequena pápula eritematosa para pápulo-vesiculosa, pápulo-pustulosa e então para lesões úlcero-crostosas. Observa-se pequena ulceração com bordas elevadas e fundo recoberto por exsudato seroso ou seropurulento, que sangra facilmente com trauma (MARSDEN e NONATA, 1975).

O número de casos novos anuais de LCL está em torno de 1 a 1,5 milhões. Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, a leishmaniose cutânea (LC) já foi registrada em todos os estados brasileiros, com média anual de 28.568 casos no período de 1985 a 2005 (BRASIL, 2013). A região nordeste apresentou 5.234 casos de 1999 a 2011, sendo a segunda região brasileira com maior incidência. No mesmo período, o coeficiente de detecção nesta região foi de 14,9/100 mil habitantes. Na Bahia, a LC vem ampliando seu potencial de urbanização, demonstrado pela ocorrência de casos em cidades importantes do estado. Segundo dados de 2014, a doença já foi detectada em 231 (55,39%) municípios baianos e no período de 2012 a 2014, a média anual de casos notificados foi de 3.281,7, indicando um coeficiente de detecção médio de 19,5 casos/100.000 habitantes (BAHIA, 2015).

1.2 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

Para o tratamento da LT, as drogas de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), com duas apresentações comerciais: antimoniato-N-metilglucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam®). Na forma cutânea, a dose recomendada pela OMS para o uso de Glucantime® varia entre 10 a 20 mg de Sb^{+5} /Kg/dia durante 20 dias. Se não houver cicatrização completa até três meses do término do tratamento, o esquema deve ser repetido. Persistindo o

insucesso, administra-se uma das drogas de segunda escolha, Anfotericina B (AmB) ou Pentamidina (BRASIL, 2013). A AmB é administrada na concentração de 1mg/kg/dia diariamente ou em dias alternados com dose máxima de 50mg por aplicação. Para a Pentamidina a dose recomendada é 4mg/kg/dia, por via intramuscular profunda, de dois em dois dias, recomendando-se não ultrapassar a dose total de 2g.

Os Sb^{+5} são drogas consideradas leishmanicidas, pois interferem no metabolismo oxidativo das formas amastigotas de *Leishmania*, ocorrendo uma inibição tanto na glicólise, quanto na oxidação de ácidos graxos, processos primariamente localizados nos glicossomos. Essa inibição é acompanhada de uma redução na produção de ATP e GTP. Além destes, outros mecanismos podem estar envolvidos, como a ligação inespecífica do antimônio aos grupos sulfidrílicos das proteínas das amastigotas (MARSDEN, 1986; CHULAY et al., 1988; BERMAN, 1997). No entanto, o tratamento com os Sb^{+5} está associado a uma toxicidade significativa, com diversos efeitos colaterais tais como: artralgias, mialgias, febre, sintomas gastrointestinais, fraquezas, alterações eletrocardiográficas e insuficiência renal aguda. Além disto, seu uso é limitado em gestantes, indivíduos com idade superior a 50 anos e portadores de doenças renais, cardíacas ou hepáticas (BRASIL, 2013).

Além das limitações relacionadas à toxicidade, o registro crescente de casos de resistência à droga tem sido reportado (ALMEIDA et al., 2005; AMATO et al., 2007; MODABBER et al., 2007; Tuon et al., 2008; LLANOS-CUENTAS et al., 2008; KAUR e RAJPUT, 2014). Esta resistência está associada a alguns mecanismos tais como (a) inibição intra ou extracelular da conversão do Sb^{+5} em Sb^{+3} ativo; (b) redução da expressão de aquagliceroporina1 na superfície celular levando a menor entrada de Sb^{+5} na célula; e (c) aumento dos níveis citoplasmáticos de tióis (como poliaminas, cisteínas, etc), permitindo a conjugação destas moléculas com o Sb^{+5} , removendo-o da célula (KAUR e RAJPUT, 2014).

Em áreas de resistência ao Sb^{+5} , a AmB é utilizada com eficiência. AmB é um antifúngico que também apresenta ação leishmanicida direta. Ele age ligando-se aos esteróis da membrana celular, alterando a permeabilidade de membrana e levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático. Sob a forma de desoxicolato de AmB seu uso está associado a efeitos colaterais como febre, calafrios, tremores, vômitos,

cefaleia e hipotensão, entretanto a nefrotoxicidade é o efeito adverso mais importante (BRASIL, 2013; KAUR e RAJPUT, 2014). Deste modo, o esquema terapêutico com AmB requer internação hospitalar devido à necessidade de monitoramento da função renal do paciente em tratamento. A formulação lipossomal da AmB (L-AmB), nesse sentido, é um marco no tratamento da leishmaniose visceral. Sua toxicidade é muito baixa e a dose elevada da medicação pode ser aplicada via endovenosa em uma semana. No entanto, o custo do tratamento ainda é proibitivo em países endêmicos e sua eficácia no tratamento da LT não é satisfatória (SINGH e SUNDAR, 2014).

A Pentamidina é uma amina aromática com efeito hipoglicemiante e capaz de comprometer o metabolismo de protozoários. Sua ação antiparasitária deve-se ao comprometimento da síntese de DNA e modificação na morfologia do cinetoplasto (NEVES et al., 2011). Dentre os efeitos colaterais apresentados pelo seu uso estão: dor, náusea, vômito, mialgia, hipertensão, cefaleia, hipoglicemia ou hiperglicemia transitória. Além dos Sb^{+5} , da AmB e da Pentamidina, existem, para o tratamento da leishmaniose, a Miltefosina (MIL) e a Paromomicina (PM). Entretanto, estes fármacos também apresentam grandes limitações, tais como toxicidade, custo e/ou duração do tratamento (MISHRA et al., 2007).

A MIL é muito ativa em casos de leishmaniose visceral resistentes ao Sb^{+5} e apresenta a vantagem de ser um tratamento oral. Devido à sua longa permanência no tecido, a MIL deve ser aplicada sob acompanhamento, para evitar o surgimento de resistência. A MIL é bem tolerada, mas possíveis efeitos teratogênicos não podem ser excluídos. Chrusciak-Talhari e colaboradores (2011) compararam a eficácia terapêutica da MIL em relação ao Sb^{+5} em uma área endêmica para LCL causada por *L. guyanensis* em Manaus, Brasil. O ensaio clínico randomizado demonstrou que a MIL foi mais eficaz que o Sb^{+5} no tratamento da LC, apresentando taxa de cura de 71,4% versus 53,6%, respectivamente ($p=0,05$). Resultados semelhantes foram encontrados num estudo realizado com 90 pacientes de uma área endêmica para LC causada por *L. braziliensis* na Bahia, Brasil. A taxa de cura definitiva, seis meses após o tratamento, foi de 53,3% no grupo tratado com Sb^{+5} enquanto no grupo tratado com MIL foi de 75% ($p=0,04$) (MACHADO et al., 2010). Estes dados suportam a ideia de que a MIL pode ser uma alternativa terapêutica eficaz e segura em regiões endêmicas para LC no Brasil.

A PM é eficaz, segura e acessível. No entanto, são necessárias 21 injeções pela via intramuscular. Por fim, outros compostos tais como o Allopurinol ainda não alcançaram os padrões de eficácia ou segurança necessários (MISHRA et al, 2007; CASTILLO et al., 2010; VAN GRIENSVEN et al., 2010). Velez e colaboradores (1997) demonstraram que a monoterapia com Allopurinol não foi eficaz no tratamento de pacientes infectados por *L. panamensis* (taxa de cura de 33% no grupo tratado com Allopurinol comparado a 93% no grupo tratado com Glucantime® - $p < 0,001$). Na Bahia (Brasil), o tratamento de pacientes com LC causada por *L. braziliensis* com Allopurinol apresentou 100% de falha terapêutica (D'OLIVEIRA JR, MACHADO e CARVALHO, 1997).

Diante do número limitado de fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose, do crescente número de casos de resistência, da falha terapêutica e dos efeitos adversos associados aos tratamentos, faz-se necessário o desenvolvimento de novos compostos anti-leishmania. Comparados aos disponíveis atualmente, eles devem ser seguros, acessíveis e facilmente administráveis (por via não parenteral, por exemplo) (SANTOS et al., 2008). Dentre as estratégias que podem ser aplicadas para a melhoria do tratamento da leishmaniose estão: (a) melhoria do uso dos tratamentos disponíveis, estendendo a cobertura, e proporcionando novas combinações terapêuticas; (b) desenvolvimento de novas drogas por meio de novas formulações ou por meio de mudanças nos esquemas terapêuticos dos tratamentos existentes; e (c) desenvolvimento de novos compostos com ação leishmanicida.

1.3 SOD1 COMO ALVO TERAPÊUTICO NA LEISHMANIOSE

Um dos caminhos para a descoberta de novos compostos anti-leishmania é o estudo da interação parasita-hospedeiro e dos aspectos imunopatológicos envolvidos nesta interação. Em 1986, Passwell e colaboradores demonstraram que o IFN- β aumenta a carga parasitária em macrófagos humanos infectados por *L. major*, porém o papel desta molécula no contexto da infecção por *L. braziliensis* ainda não havia sido bem estudado. De fato, o IFN- β aumenta a carga parasitária em macrófagos humanos infectados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* e este efeito é independente de óxido nítrico, uma vez que se mantém quando macrófagos infectados são tratados

com IFN- β e com um inibidor da iNOS. Entretanto, observou-se redução significativa de superóxido quando os macrófagos humanos infectados por *L. braziliensis* e *L. amazonensis* foram tratados com IFN- β . Estes dados suportam a ideia de que a inibição da atividade leishmanicida dos macrófagos induzida pelo IFN- β está correlacionada com a via de produção de superóxido, mais precisamente com a enzima Superóxido Dismutase1 (SOD1). A SOD1 é responsável pela dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Investigando-se então a expressão desta enzima em macrófagos infectados, demonstrou-se que na presença do IFN- β a expressão da SOD1 está aumentada e isto leva à redução dos níveis de superóxido e, conseqüentemente, ao aumento da carga parasitária nos macrófagos. Deste modo, demonstrou-se que a SOD1 exerce um papel importante no controle da sobrevivência da *Leishmania in vitro* (KHOURI et al., 2009).

Por outro lado, o efeito do IFN- β sobre macrófagos humanos infectados com leishmania pode ser antagonizado pela adição de dietilditiocarbamato (DETC), um composto quelante de cobre que inibe a SOD1 (KHOURI et al., 2009). De fato, o DETC é capaz de destruir a leishmania, em ensaios *in vitro* e *in vivo*. O DETC não é tóxico para macrófagos ou para células mononucleares do sangue periférico, em concentrações capazes de induzir atividade leishmanicida. Mostrou-se, ainda, que essa atividade é dependente de superóxido, pois a presença do antioxidante NAC reverte o efeito leishmanicida do DETC. A análise das células infectadas por leishmania e tratadas com DETC mostrou uma destruição seletiva das amastigotas no interior do macrófago, sem qualquer alteração na célula hospedeira, incluindo a mitocôndria (KHOURI et al., 2010).

A partir dos dados obtidos *in vitro*, o passo seguinte foi testar o DETC em um modelo experimental de LCL. O modelo de infecção com *L. braziliensis* desenvolvido em nosso laboratório (DE MOURA et al., 2005) leva em conta aspectos da transmissão natural do parasita, como a inoculação da *Leishmania* na derme da orelha. Após a inoculação, a expansão parasitária é acompanhada pelo desenvolvimento de uma lesão cutânea similar à observada em pacientes com LCL, com a presença de uma lesão nodular e ulcerada no centro. Após cerca de 10 semanas, ocorre a regressão espontânea da lesão e substituição por tecido de cicatrização. Empregando esse modelo, camundongos BALB/c foram infectados na

derme da orelha com *L. braziliensis* e a partir da segunda semana de infecção foram tratados diariamente com injeções intraperitoneais de DETC (50mg/kg por dia). Este tratamento foi capaz de controlar o desenvolvimento da lesão e de reduzir a carga parasitária (>100x) no local de infecção, confirmando o potencial terapêutico do DETC (KHOURI et al., 2010).

Em 2014, o papel da SOD1 como um possível biomarcador foi investigado em doadores saudáveis, em pacientes com LCL causada por *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* e em pacientes com Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) causada por *L. amazonensis*. Neste estudo demonstrou-se que os níveis plasmáticos de SOD1 encontram-se três vezes mais elevados em indivíduos com LCL em comparação com os doadores saudáveis e este aumento foi ainda maior em indivíduos com LCD (>4 vezes). Além disto, indivíduos com LCL que necessitaram de 3 a 6 ciclos de tratamento para atingirem a cura apresentaram maiores níveis plasmáticos de SOD1 que aqueles curados com apenas um ciclo de tratamento. Assim, foi demonstrado que o nível de SOD1 no plasma de pacientes é um fator de predição de falha terapêutica em pacientes com LCL (KHOURI et al., 2014).

Coletivamente, estes trabalhos demonstram que o DETC, *in vitro*, eleva a quantidade de íons superóxido, promovendo a morte dos parasitas. Assim, a indução da produção de superóxido, por meio da inibição da SOD1, pode ser uma importante alternativa no tratamento da LCL. O DETC já foi empregado *in vivo* como um adjuvante para o sistema imune (Imuthiol ou Dithiocarb) em pacientes infectados pelo HIV (REISINGER et al., 1990). Neste caso, houve um retardo significativo para a progressão para a AIDS e uma diminuição nas infecções oportunistas. Além disso, foi demonstrado que monócitos obtidos de voluntários saudáveis injetados com DETC apresentaram elevada capacidade microbicida contra *M. Tuberculosis* (HÜBNER et al., 1991). O papel microbicida do DETC também foi demonstrada para *Trypanosoma rhodesiense* (WYSOR et al, 1982), *Saphylococcus aureus* (PHILLIPS et al., 1991), *Trichomonas vaginalis* (BOUMA et al, 1998), *Giardia lamblia* (NASH e RICE, 1998) e *Aspergillus* (KHAN et al., 2007).

1.4 CELULOSE BACTERIANA COMO SUPORTE DE *DELIVERY* DE FÁRMACOS

Um dos desafios no tratamento da leishmaniose é a falta de autonomia dos pacientes para a administração dos fármacos, uma vez que as drogas de primeira e segunda escolha são administradas por via endovenosa ou intramuscular, necessitando de um profissional capacitado para tais intervenções. Neste sentido, o desenvolvimento de formulações com administração tópica ou oral traria maior conforto aos pacientes e poderia reduzir os níveis de interrupções no tratamento. Alguns estudos tem sido desenvolvidos neste sentido e desde 2002, dezoito ensaios clínicos foram e estão sendo conduzidos utilizando formulações tópicas para o tratamento da LC (*clinicaltrial.gov*). Dentre os 18 estudos realizados neste período, dez utilizam a formulação WR 279.396, que é creme de uso tópico contendo paromomicina e gentamicina. Um ensaio clínico de fase II com esta formulação demonstrou taxa de cura de 81% após seis meses de seguimento, sendo bem tolerado e apresentando poucos efeitos adversos associados (BEN SALAH et al., 2013). Ensaio clínicos em outras coortes também tem demonstrado a eficácia da formulação (BEN SALAH et al., 1995; SOTO et al., 1995; SOTO et al., 1998; ARANA et al., 2001; SOTO et al., 2002; BEN SALAH et al., 2009; SOSA et al., 2013).

Além das pomadas, as membranas de celulose bacteriana ou biocelulose (BC) também podem ser uma alternativa no *delivery* de compostos para aplicação tópica. A BC é um nanomaterial produzido por bactérias Gram negativas, aeróbias e não fotossintetizantes de várias espécies dos gêneros *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligene*, *Aerobacter* e *Azotobacter* (KLEMM et al., 2005). Estruturalmente, a BC é formada por uma rede de fibras de celulose compostas por microfibrilas, idênticas à celulose de origem vegetal, exceto pela presença de resíduos de proteínas. Entretanto, a BC apresenta alta pureza, elevado grau de polimerização, alta cristalinidade (de 70 a 80%), alto teor de água (aproximadamente 99%) e excelente propriedade mecânica (KLEMM et al., 2011), características relevantes para a sua aplicação prática. Como um biocurativo, a BC apresenta biocompatibilidade, ausência de toxicidade e favorece a cicatrização (CZAJA et al., 2007). Assim, o biocurativo de BC é indicado para o tratamento de pequenos traumas, áreas doadoras de enxerto, queimaduras de II e III graus, dentre outras (CZAJA et al.,

2007;LENSELINK e ANDRIESSEN, 2011). Por fim, a estrutura do biocurativo de BC permite a adsorção de compostos à sua superfície (Figura 1).

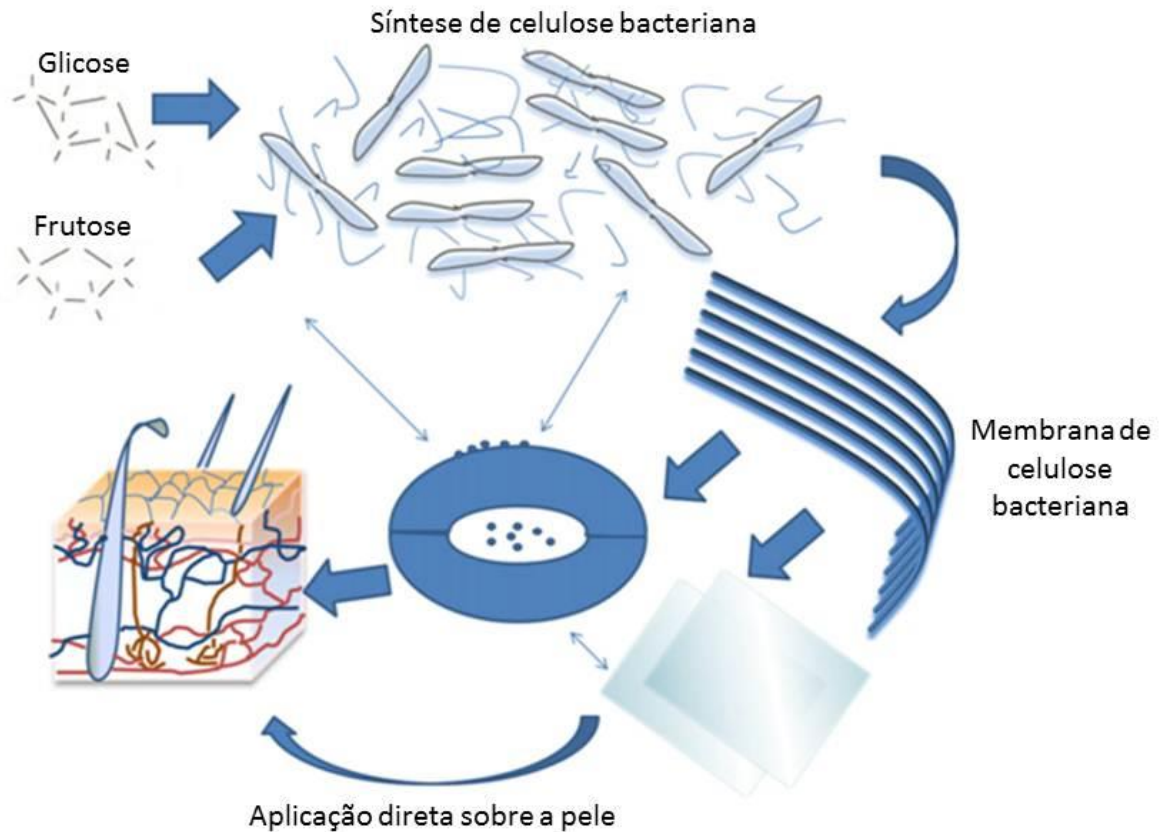


Figura 1. Representação da membrana de celulose bacteriana e suas potenciais aplicações. A molécula de glicose e frutose representam as fontes de carbono necessárias à produção das fibras de celulose. Após serem purificadas, estas membranas de celulose bacteriana, podem ser usadas diretamente na superfície da pele ou ser utilizadas como carreadora de compostos para aplicação tópica. Adaptado de Abeer e colaboradores (2014).

As membranas de biocelulose apresentam propriedades requeridas para o uso biomédico, como biocompatibilidade, elevada capacidade de retenção de água, resistência mecânica e estabilidade térmica (KLEMM et al., 2005; CHAWLA et al., 2009;SHI et al., 2012;SILVESTRE et al., 2014). Além disto, a BC apresenta propriedades mecânicas como, elasticidade e resistência à tensão, similares à da pele humana, permitindo o crescimento, espriamento e migração de queratinócitos humanos (SANCHAVANAKIT et al., 2006). Devido a suas propriedades, BC tem sido estudada como substituto de pequenos vasos sanguíneos (SCHERNER et al., 2014), como implante para substituição e regeneração tecidual (MARTINEZ AVILA et

al.,2014;SOUZA et al., 2014), como suporte para imobilização celular (WU e LIA, 2008), como auxiliar no tratamento de queimaduras e feridas e como veículo para liberação de drogas (Trovatti et al., 2011;TROVATTI et al., 2012; SILVA et al., 2014a, SILVA et al., 2014b).

Diante do efeito leishmanicida pronunciado do DETC e das propriedades da BC como um biocurativo, **a hipótese deste trabalho é que membranas de celulose bacteriana contendo DETC (BC-DETC) podem atuar como um biocurativo para o tratamento da LC causada por *L. braziliensis*.**

2 OBJETIVOS

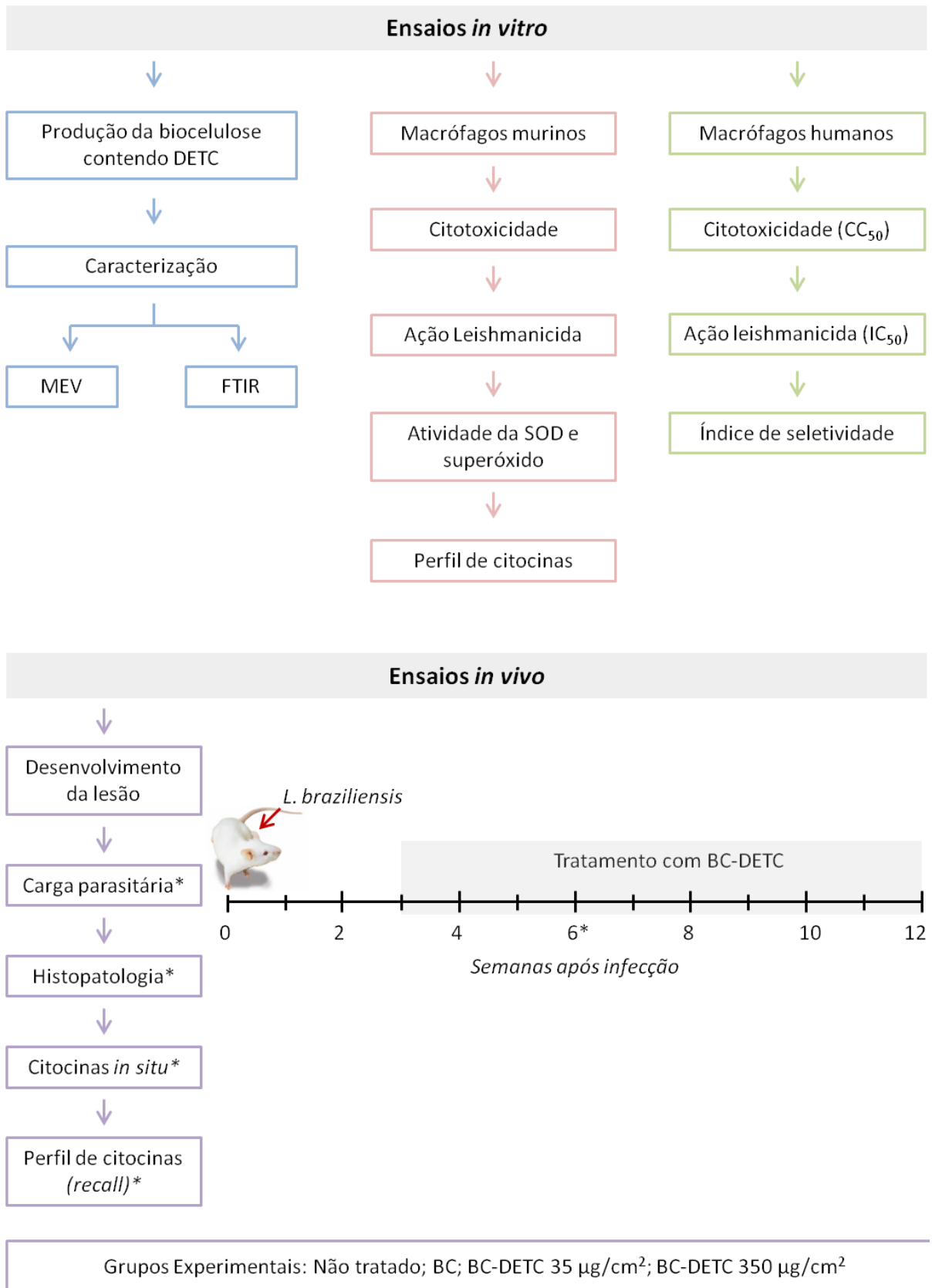
2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial do DETC adsorvido a membrana de celulose bacteriana como nova forma de tratamento para a LCL, utilizando modelo experimental de infecção por *L. braziliensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade de macrófagos tratados com diferentes concentrações de BC-DETC;
- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* de BC-DETC em macrófagos murinos;
- Avaliar a atividade da enzima SOD1 e a produção de superóxido em macrófagos murinos infectados por *L. braziliensis* e tratados com BC-DETC;
- Verificar o perfil de citocinas produzidas por macrófagos murinos infectados por *L. braziliensis* após tratamento com BC-DETC;
- Avaliar o potencial terapêutico do uso tópico de BC-DETC em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*;
- Avaliar o perfil de citocinas em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados com BC-DETC;
- Verificar a ação anti-*leishmania* de BC-DETC em macrófagos humanos infectados por *L. braziliensis in vitro*.

3 DESENHO EXPERIMENTAL



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Camundongos BALB/c fêmeas de 6-8 semanas foram obtidos do biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz (CPqGM/FIOCRUZ) e mantidos em condições livre de patógenos. Todos os protocolos de experimentação utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal do CPqGM/FIOCRUZ – protocolo L-001/2012.

4.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BC-DETC

Membranas de BC altamente hidratadas foram obtidas após cultivo de *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 23769) em meio de cultura composto por glicose (50 g/L⁻¹), extrato de levedura (4 g/L⁻¹), fosfato de sódio anidro (2 g/L⁻¹), sulfato de magnésio heptahidratado (0,8 g/L⁻¹) e etanol (20 g/L⁻¹). As culturas foram incubadas por 96 horas a 28°C em recipientes de 30x50 cm. Após incubação, as membranas foram lavadas em 1% de NaOH (p/v) a 70°C para remoção das bactérias e seus resíduos. Posteriormente, foram lavas extensivamente com água bidestilada até atingirem o pH neutro (pH=7,0) (BARUD et al., 2013). BC de 25 cm² foram utilizadas para a preparação das BC-DETC. Para isto foram preparadas soluções de DETC (número de catálogo 228680 - SIGMA) de diferentes concentrações (87,5 µg/mL; 875 µg/mL e 8.759 µg/mL). As membranas foram pesadas e tiveram 50% de sua massa de água removida por pressão. Posteriormente 1 mL de cada solução de DETC preparada foi adicionado às membranas. Após 2 horas de incubação a temperatura ambiente, as membranas contendo DETC secaram a 37°C por 24 a 48 horas. Para o uso, as membranas foram cortadas em círculos de 4 mm de diâmetro e esterilizadas por luz ultravioleta por 15 minutos. As concentrações finais obtidas foram 3,5; 35 e 350 µg/cm². Membranas preparadas apenas com água foram utilizadas como controle.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DE MEMBRANAS DE BC-DETC

As membranas de BC-DETC foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). As micrografias das membranas de BC e BC-DETC foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (MEVEC, JEOL JSM-7500F). Para isto, as amostras foram colocadas em suporte de cobre e recobertas por uma fina camada de carbono. Para análise de FTIR as amostras foram trituradas em brometo de potássio (KBr) na proporção de 1:1 (v/v) e submetidas a pressão elevada para compactação. Os espectros de FTIR foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer equipado com uma célula horizontal (Golden Gate ATR). Foram adquiridos sessenta e quatro escaneamentos num intervalo de 400-4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . Para análises de MEV e FTIR foram analisadas quatro amostras de cada membrana.

4.4 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA

Macrófagos murinos foram obtidos a partir da diferenciação de células da medula óssea de camundongos BALB/c. Para isto, o fêmur e tibia dos camundongos foram dissecados e macerados em DMEM suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal inativado (SBFi) (todos da Invitrogen). Após centrifugação a 1.600 x g, 4°C, 10 minutos, as células foram ressuspensas em tampão de lise ACK (GIBCO) para rompimento das hemácias e em seguida lavadas com soro fisiológico. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em meio DMEM suplementado, contendo 30% de sobrenadante de fibroblastos (L929) e incubadas por 6-7 dias em placas de Petri para diferenciação em macrófagos (WEISCHENFELDT e PORSE, 2008). Os macrófagos diferenciados da medula óssea (MDMO) foram removidos das placas de Petri adicionando-se 1mL de Tripsina-EDTA 0,25% (Invitrogen) e distribuídas em placas de cultivo conforme o experimento realizado.

4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR AZUL DE TRYPAN

MDMO foram obtidos conforme descrito anteriormente e distribuídos em placas de 24 poços, na densidade de 3×10^5 células por poço em 1 mL de meio DMEM suplementado. Discos de BC-DETC (3,5; 35 e $350 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) foram adicionados aos poços contendo as células. Como controle utilizou-se meio DMEM ou BC sozinha. Após 48h de incubação a 37°C , 5% CO_2 , as placas foram centrifugadas $1.600 \times g$, 4°C por 10 minutos para remoção do sobrenadante. O número total de células viáveis foi estimado por ensaio de exclusão de Azul de Trypan, considerando 200 células por poço, em pelo menos cinco campos randômicos observados em microscópio óptico invertido.

4.6 CULTURA DE PARASITAS

Promastigotas de *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/01/BA788) (DE MOURA et al., 2005) foram cultivadas em meio *Schneider Insect* (Sigma-Aldrich) suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 10% de SBFi (todos da Invitrogen) a 26°C . Em todos os experimentos foram utilizadas promastigotas em fase estacionária.

4.7 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS COM *L. BRAZILIENSIS* E TRATAMENTO COM BC-DETC

MDMO foram obtidos conforme descrito anteriormente. As células foram ressuspensas em meio DMEM suplementado e distribuídas em placas de 24 poços, à densidade de 3×10^5 células por poço. Após adesão por 2 horas, 3×10^6 *L. braziliensis* (promastigotas em fase estacionária) foram adicionadas às monocamadas de células. Após 24 horas de infecção (2 horas a temperatura ambiente e 22 horas a 37°), os macrófagos foram lavados para remoção dos parasitas não internalizados. Adicionaram-se os discos de BC-DETC (3,5 e $35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) aos poços de cultura e as células foram incubadas por 48 horas, a 37°C , 5% CO_2 . Culturas controle foram incubadas com discos de BC sem DETC. Após tratamento, as células foram lavadas,

fixadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). O número de células infectadas e o de amastigotas intracelulares foram estimados por microscopia óptica em 200 macrófagos. As culturas foram feitas em quintuplicata. Alternativamente, os macrófagos infectados e tratados foram lavados e o meio DMEM foi substituído por 0,5 mL de meio *Schneider Insect* suplementado (SIGMA). As células foram cultivadas por sete dias a 26°C, quando o número de promastigotas viáveis foi determinado utilizando câmaras de Neubauer.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE SUPERÓXIDO E ATIVIDADE DA SOD

MDMO foram plaqueados a densidade de 1×10^6 células por poço, em placas de 24 poços. As células foram infectadas como descrito previamente e então tratadas com discos de BC-DETC (3,5 e 35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em presença de 0,5 mM de hidrócloro de hidroxilamina (AcrosOrganics) (ELSTNER e HEUPEL, 1976). O superóxido foi quantificado no sobrenadante das culturas utilizando a reação de Griess (MIRANDA et al., 2001). Para avaliar a atividade da SOD1 intracelular, macrófagos infectados foram tratados com membranas de BC-DETC como descrito previamente e após 48h, as células foram homogeneizadas em tampão de lise gelado (20 mM HEPES (pH 7,2) contendo 1 mM EGTA, 210 mM manitol e 70 mM sucrose). O lisado foi centrifugado a 1500 x g por 5 minutos a 4°C e os níveis de SOD1 foram medidos no sobrenadante usando *Superoxide Dismutase Assay Kit II* (Calbiochem), de acordo com as instruções do fabricante.

4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

MDMO foram plaqueados a densidade de 1×10^6 células por poço, em placas de 24 poços. As células foram infectadas como descrito previamente e então tratadas com discos de BC-DETC (3,5 e 35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Como controle as células foram tratadas com meio DMEM suplementado ou BC pura. As citocinas foram quantificadas no sobrenadante das culturas utilizando *Mouse Inflammatory CBA* (BD Biosciences). Nesta técnica, quatro populações de microesferas marcadas com intensidades de fluorescência distintas de PE e recobertas com anticorpos de captura específicos para

IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α foram incubadas com os sobrenadantes e os padrões por três horas. Em seguida, as amostras e os padrões foram centrifugados a 405 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspensas no tampão de lavagem (BD Biosciences). Os dados foram adquiridos utilizando citômetro de fluxo FACSsort (Becton Dickinson) e as análises foram feitas no Software FlowJo versão 7.6.4.

4.10 INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C E TRATAMENTO COM BC-DETC

Camundongos BALB/c foram infectados na orelha, por via intradérmica, com promastigotas estacionárias de *L. braziliensis* (10^5 parasitas em 10 μ L de salina) utilizando agulha de insulina (30G) (BD Ultra-fina™) (DE MOURA et al., 2005). Três semanas após a infecção, membranas de BC-DETC (35 e 350 μ g/cm²) foram colocadas sobre as lesões dos camundongos infectados (n=12) e fixadas com filme Tegaderm (1624W 3M Health Care). As membranas foram trocadas três vezes por semana durante três semanas consecutivas. O tamanho da lesão foi avaliado semanalmente utilizando paquímetro digital (Thomas Scientific). Camundongos controle (n=12) receberam discos de BC pura ou não foram tratados. Seis semanas após a infecção, a carga parasitária foi determinada através do ensaio quantitativo de diluição limitante (BELKAID et al., 1998). Para isto, as orelhas infectadas e os linfonodos retromaxilares (LN) foram removidos assepticamente e homogeneizados em meio Schneider (SIGMA). As células obtidas foram diluídas seriadamente em meio Schneider suplementado (diluições 1:10) e distribuídas em triplicatas em placas de 96 poços. O número de parasitas viáveis foi estimado através da máxima diluição na qual promastigotas de *Leishmania* foram observadas após uma semana de incubação a 26°C.

4.11 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM BC-DETC

Seis semanas após a infecção com *L. braziliensis*, os camundongos tratados com BC-DETC (n=6) e os camundongos controle (n=6) foram eutanaziados e os LN

foram assepticamente removidos e homogeneizados em meio DMEM. As células ($10^6/\text{mL}$) foram estimuladas na presença de promastigotas de *L. braziliensis* (5 parasitas: 1 célula) por 24 ou 48 horas. Culturas controle foram cultivadas sem estímulo. As citocinas (IFN- γ , IL-4, IL-10 e TNF- α) foram avaliadas nos sobrenadantes das culturas por ELISA (eBiosciences) de acordo com as instruções do fabricante. Para expressão de citocinas *in situ*, as orelhas dos animais tratados com BC-DETC (n=6) e dos animais controle (n=6) foram maceradas e o RNA total foi extraído em Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi eluído em 30 μL de água e o cDNA foi sintetizado utilizando sistema de transcriptase reversa ImProm II™ (Promega) com 150 ng de RNA. O PCR em tempo real foi realizada em termociclador ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). As condições térmicas de cada ciclo de amplificação consistiram em 2 minutos de incubação inicial a 50°C, seguido de 10 minutos de desnaturação a 95°C, 50 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Cada amostra e o controle negativo foram analisados em triplicata para cada corrida. O método comparativo foi utilizado para analisar a expressão gênica. Os valores do ciclo limiar (C_t) de cada citocina foram normalizados em relação à expressão do gene endógeno GAPDH através da equação $\Delta C_t = C_t(\text{citocina}) - C_t(\text{GAPDH})$. O *foldchange* foi determinado por $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{experimental}) - \Delta C_t(\text{naive})$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os *primers* utilizados foram: GAPDH (*Forward*: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCT-3'; *Reverse*: 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTGA-3'); IFN- γ (*Forward*: 5'-CTACACACTGCATCTTGGCTTTG-3'; *Reverse*: 5'-TGACTGCGTGCCAGTA-3'); TNF- α (*Forward*: 5'-GGTCCCCAAAGGGATGAGAA-3'; *Reverse*: 5'-TGAGGGTCT GGGCCATAGAA-3'); TGF- β (*Forward*: 5'-ATCGACATGGAGCTGGTGAAA-3'; *Reverse*: 5'-GAGCCTTAGTTTGGACAGGATTCTG-3') e IL-10 (*Forward*: 5'-CAGCCGGGAAGACAATAACTG-3'; *Reverse*: 5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3'). Os *primers* foram desenhados utilizando o Software Primer Express (Applied Biosystems).

4.12 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Seis semanas após a infecção com *L. braziliensis*, os camundongos tratados com BC-DETC (n=2) e os camundongos controle (n=2) foram eutanaziados e as

orelhas infectadas foram removidas e fixadas em formaldeído 10% (v/v). Após 24 horas de fixação, os tecidos foram processados e embebidos em parafina. Secções de 5µm de espessura foram cortadas e coradas com H&E. As secções foram analisadas por microscopia óptica em objetiva de 20x.

4.13 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS, INFECÇÃO E TRATAMENTO COM BC-DETC

Monócitos humanos foram isolados do sangue periférico de seis doadores saudáveis por centrifugação em gradiente de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). As células obtidas foram distribuídas em placas de 24 poços (3×10^6 células por poço) e incubadas por 30 minutos para aderência. Posteriormente, os poços foram lavados com salina estéril e as células aderentes foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 5% de soro AB humano (todos da Invitrogen). Após sete dias de diferenciação, as células aderentes (aproximadamente 3×10^5 por poço) foram infectadas com *L. braziliensis* (10 parasitas: 1 célula) por 24 horas. Os macrófagos infectados foram lavados para remoção dos parasitas não internalizados e tratados com membranas de BC-DETC por 48 horas a 37°C, 5% CO₂. Para calcular a concentração citotóxica em 50% das células (CC₅₀) foram utilizadas membranas de BC-DETC nas concentrações de 350, 700, 1.400, 3.500, 7.000, 14.000 e 21.000 µg/cm². Para calcular a concentração inibitória em 50% das amastigotas (IC₅₀) foram utilizadas membranas de BC-DETC nas concentrações de 35, 70, 350, 700 e 1.400 µg/cm². Culturas controle foram incubadas com BC pura. Em alguns experimentos, as culturas foram realizadas em presença de apocinina 20 µM (ABCAM) e como controle as células foram incubadas com meio RPMI suplementado ou BC pura. Após 48h as células foram lavadas, fixadas e coradas com H&E. O número de células infectadas e de amastigotas intracelulares foi contado por microscopia óptica em 200 macrófagos.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de significância estatística foi calculada utilizando teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn's, para comparações entre três ou mais grupos. As comparações entre dois grupos foram feitas pelo teste Mann-Whitney (teste T não paramétrico). Os dados são apresentados como mediana + intervalo interquartil, exceto os gráficos de desenvolvimento de lesão, que são expressos em média \pm desvio padrão. Para análise do desenvolvimento da doença, a espessura das orelhas infectadas foi avaliada semanalmente em cada animal. O curso da doença no grupo BC-DETC e controle foi tabulado individualmente e a área sob a curva (AUC) obtida de cada animal foi analisada pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. O cálculo da IC₅₀ em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e da CC₅₀ em macrófagos humanos foi determinada por regressão sigmoidal das curvas de dose-resposta. O índice de seletividade de BC-DETC foi calculado através da razão entre CC₅₀ em macrófagos humanos e IC₅₀ em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. Todas as análises foram feitas utilizando o software GraphPad (Prism) versão 5.0 e um $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE BC-DETC POR MEV E FTIR

A fim de caracterizarmos as membranas de biocelulose contendo DETC (BC-DETC), a superfície das membranas foi inicialmente avaliada por MEV (Figura 2). As micrografias mostram uma rede fibrilar tridimensional, característica da biocelulose. Após adição do DETC ($3,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), observamos os filamentos de biocelulose e o recobrimento com DETC, sem a presença de agregados. Isso indica uma dispersão homogênea, sem precipitação, durante a adsorção do DETC à matriz de celulose. Além disso, observa-se um aumento da densidade de DETC nas membranas quando concentrações mais elevadas foram utilizadas (35 e $350 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

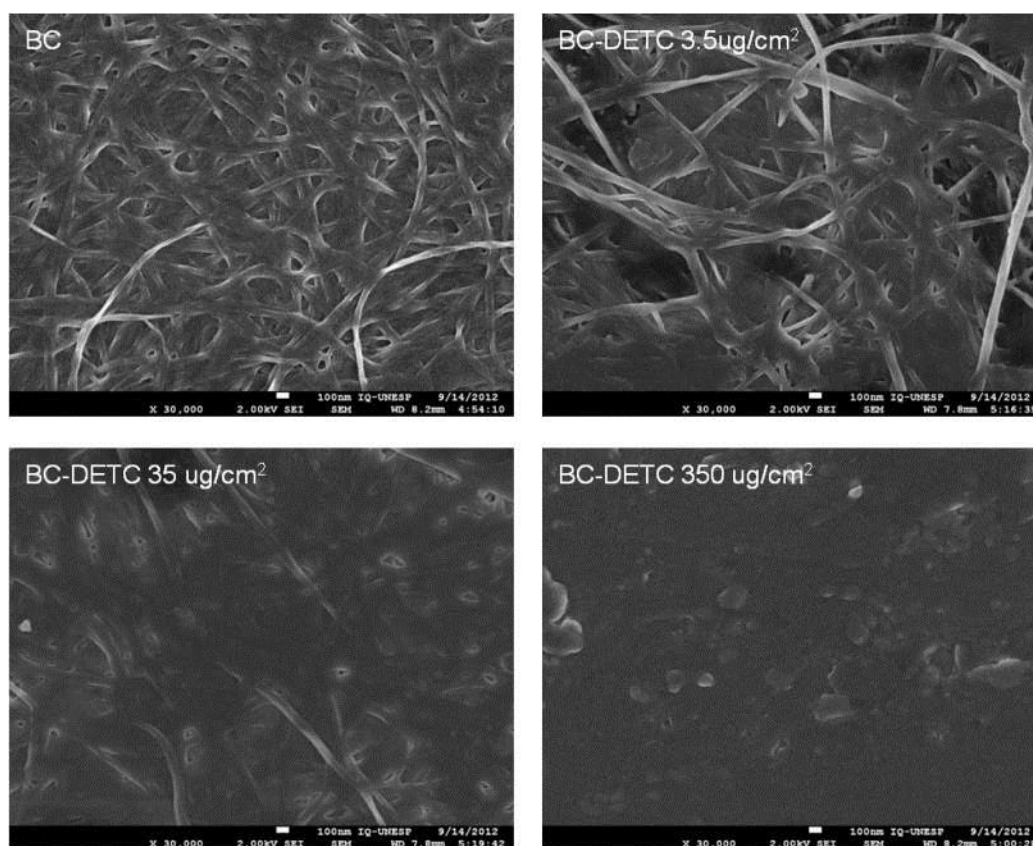


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de membranas de celulose bacteriana (BC) e BC contendo DETC (BC-DETC). Membranas de BC e BC-DETC em diferentes concentrações ($3,5$; 35 e $350 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) foram recobertas com uma fina camada carbono e analisadas em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo. Todas as imagens foram obtidas com amplificação de 30.000 vezes.

Posteriormente, analisamos as membranas por FTIR para avaliarmos as principais características estruturais da BC contendo DETC em diferentes concentrações (3,5; 35 e 350 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). O espectro de FTIR das membranas vazias demonstrou a presença de bandas atribuídas à interação OH no intervalo de 400-700 cm^{-1} , ligações β -glicosídicas entre unidades de glicose a 896 cm^{-1} , estiramento simétrico de álcool primário (C-O) e alongamento anti-simétrico de pontes de C-O-C nas regiões de 1040 e 1168 cm^{-1} , respectivamente (Figura 3). A deformação C-H (CH_3 ou S-H no plano de flexão) é considerado em 1340 cm^{-1} e a banda presente em 1400 cm^{-1} está relacionada com a curvatura de CH_2 e OH. Outras bandas estão relacionadas com a flexão H-O-H referente à água adsorvida à estrutura (1650 cm^{-1}). Extensão dos grupos CH, CH_2 e CH_3 a 2900 cm^{-1} e extensão OH representada pela banda larga a 3500 cm^{-1} também foram detectadas. O espectro do DETC mostra vibrações de tioamina primária (N-C=S) em torno de 3150-3380 cm^{-1} , estiramento de vibrações de tiocianato assimétrico (N=C=S) a 2078 cm^{-1} , estiramento C-S a 990 cm^{-1} , vibrações assimetricamente estiradas de =C-S e S-C-S na região de 900 cm^{-1} e diversas bandas atribuídas a alterações de frequência de C-S de 850-1550 cm^{-1} (RAO e VENKATARAGHAVAN, 1962). O espectro de BC-DETC, obtido em diferentes concentrações de DETC demonstrou sobreposição dos espectros de BC e DETC. Além disso, observamos o deslocamento de dois picos de DETC, de 1673 a 1739 cm^{-1} , e de 1616 a 1630 cm^{-1} . Esta mudança sugere a existência de interações químicas não covalentes, que podem ocorrer entre o oxigênio dos grupos hidroxila da BC com o enxofre do DETC, por exemplo.

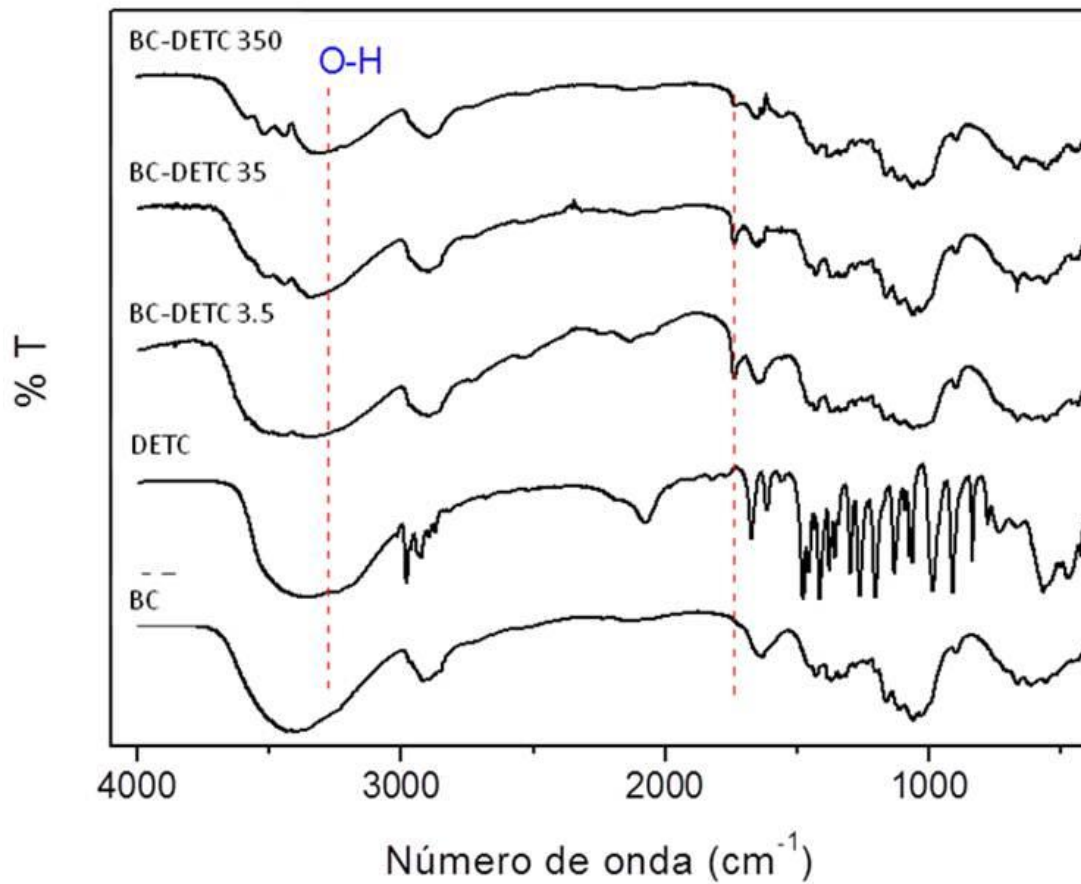


Figura 3. Espectro de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) obtido de membranas de celulose bacteriana (BC) e membranas de celulose bacteriana contendo DETC (BC-DETC). DETC puro e membranas de BC e BC-DETC em diferentes concentrações (3,5; 35 e 350 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) foram triturados em Kbr e compactados para análise em espectrômetro Perkin Elmer. Foram adquiridos sessenta e quatro escaneamentos num intervalo de 400-4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

5.2 MEMBRANAS DE BC-DETC INDUZEM A MORTE DOSE-DEPENDENTE DE *L. BRAZILENSIS* EM MACRÓFAGOS INFECTADOS

Uma vez caracterizadas as membranas de BC contendo DETC, passamos aos ensaios de avaliação do efeito da BC-DETC sobre células murinas. O tratamento de macrófagos murinos com BC-DETC a 3,5 ou 35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ não alterou sua viabilidade (Figura 4), indicando ausência de toxicidade nestas concentrações. Entretanto, o tratamento com membrana de BC-DETC a 350 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ reduziu a viabilidade celular em aproximadamente 40% e por isto foi excluída das análises *in vitro*, utilizando MDMO.

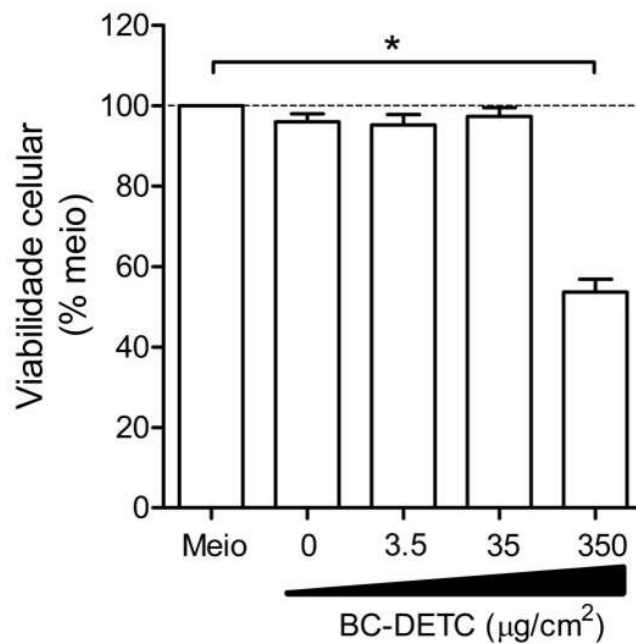


Figura 4. Efeito de membranas de celulose bacteriana contendo DETC (BC-DETC) na viabilidade celular. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c foram tratados com membranas de celulose bacteriana (BC) ou BC-DETC (3,5; 35 ou 350 µg/cm²). A viabilidade celular foi avaliada por exclusão do Azul de Trypan após 48 horas de tratamento. Os dados são apresentados como mediana ± intervalo interquartil e expressos como percentual em relação ao grupo meio (100%). Este gráfico é representativo de 3 ensaios independentes realizados em quadruplicatas. Kruskal-Wallis seguido de Dunn's Multiple Comparison Test *p<0,05.

Em seguida, avaliou-se o potencial leishmanicida das membranas de BC-DETC em MDMO infectados com *L. braziliensis*. O tratamento com BC-DETC reduziu significativamente o número de macrófagos infectados (Figura 5A) e o número de amastigotas por 100 células (Figura 5B), quando comparado com os controles não tratados. Este efeito leishmanicida foi dose dependente em ambos os parâmetros avaliados (Kruskal-Wallis, p<0,001, seguido de pós-teste *linear trend*, p<0,001). A fim de confirmar que o DETC realmente comprometeu a viabilidade celular, os macrófagos infectados com *L. braziliensis* foram cultivados em meio Schneider permitindo a transformação e proliferação das amastigotas em promastigotas móveis extracelulares (KHOURI et al, 2009). Deste modo, pôde-se quantificar a sobrevivência dos parasitas intracelulares. Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento *in vitro* de MDMO com BC-DETC reduziu significativamente a proliferação de promastigotas de *L. braziliensis* comparado aos controles (Figura 5C) e este efeito também foi dose-dependente (Kruskal-Wallis, p<0,001, seguido de pós-teste *linear trend*, p<0,001).

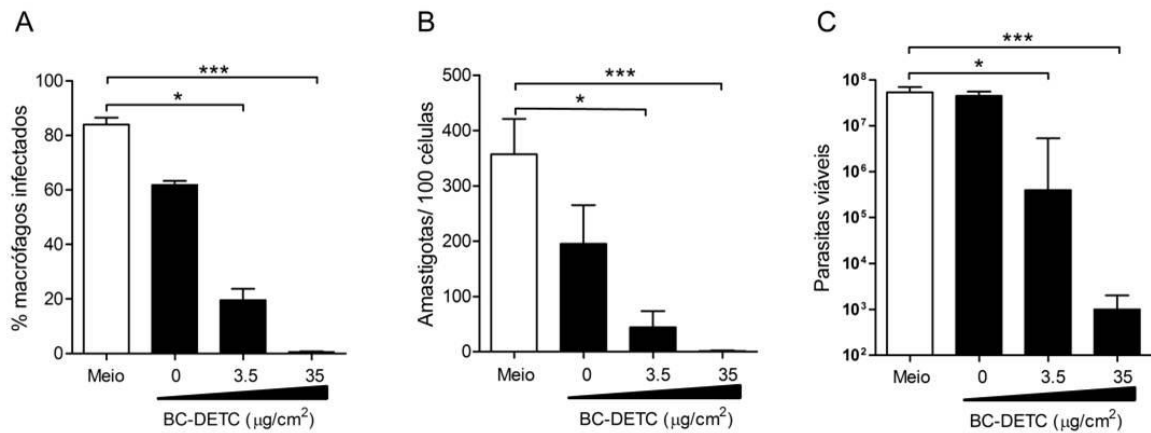


Figura 5. Efeito dose-dependente de BC-DETC em macrófagos infectados com *L. braziliensis*. Macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) de camundongos BALB/c foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com membranas de celulose bacteriana (BC) ou BC-DETC (3,5 ou 35 µg/cm²). Após 48 h, as células foram coradas com H&E e avaliadas, por microscopia óptica, quanto a porcentagem de macrófagos infectados (A) e número de amastigotas por 100 células (B). O número de parasitas viáveis (C) foi avaliado após cultivo das células infectadas em meio Schneider por 7 dias. As barras representam mediana ± intervalo interquartil de um ensaio representativo (de três ensaios) realizado em quintuplicata. Kruskal-Wallis seguido de Dunn's Multiple Comparison Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.3 TRATAMENTO COM BC-DETC REDUZ A ATIVIDADE DA SOD 1 E AUMENTA A LIBERAÇÃO DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS COM *L. BRAZILIENSIS*

A enzima SOD1 cataliza a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. O DETC, por sua vez, é um quelante de cobre capaz de inibir a SOD1, aumentando os níveis de superóxido. Diante disto, nós avaliamos a atividade da SOD1 e a produção de superóxido por macrófagos murinos infectados com *L. braziliensis* e tratados com BC-DETC. A atividade da SOD1 foi significativamente reduzida após o tratamento com BC-DETC (Figura 6A) e, conseqüentemente, os níveis de superóxido aumentaram significativamente após o tratamento (Figura 6B).

Por último, nós investigamos se o DETC também poderia modular a secreção de citocinas inflamatórias e regulatórias. Os resultados demonstraram que na presença de BC-DETC os níveis de TNF- α , IL-6, MCP-1 e IL-10 foram modulados positivamente (Figura 6C-F), paralelamente ao efeito leishmanicida exercido pelo

superóxido e esta modulação foi dose-dependente (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$, seguido de pós-teste *linear trend*, $p < 0,001$).

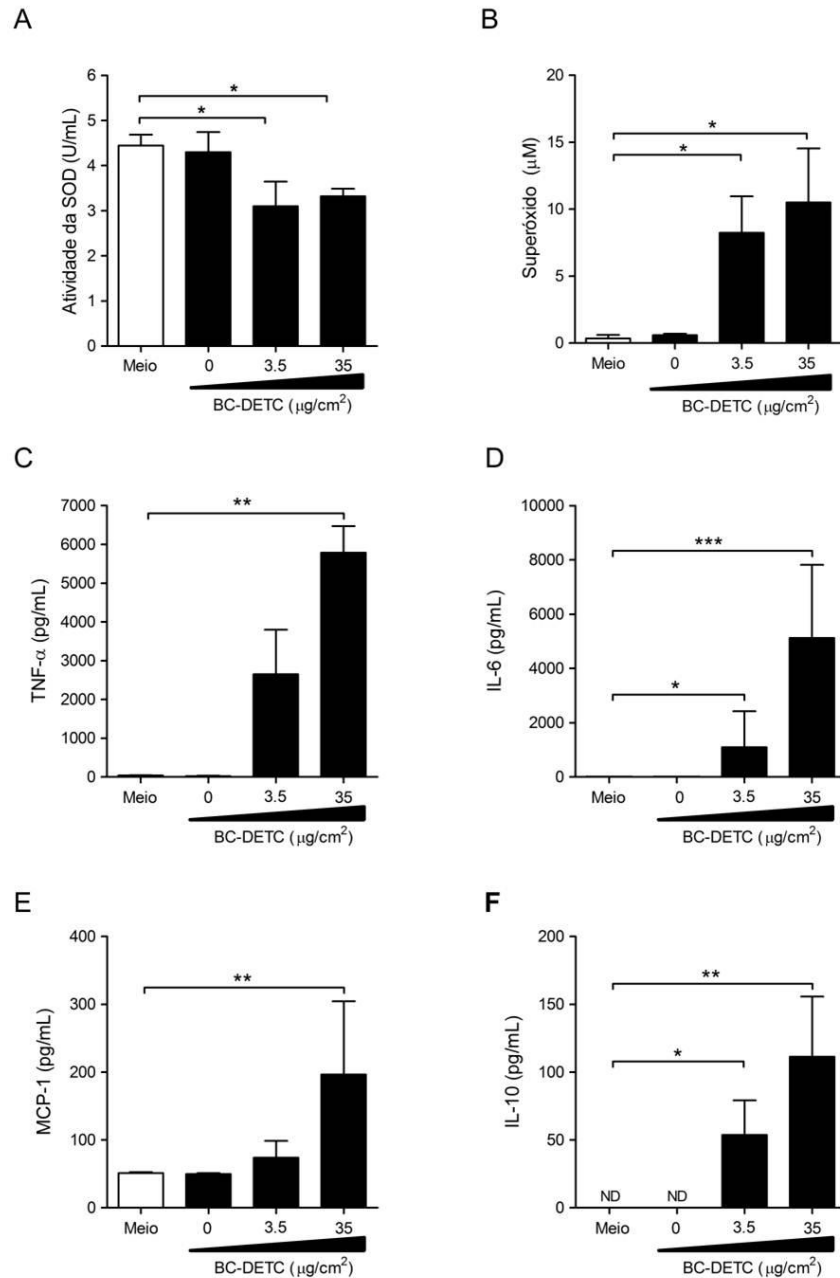


Figura 6. Tratamento com BC-DETC reduz a atividade da SOD e modula a resposta imune em macrófagos infectados com *L. braziliensis*. Macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) de camundongos BALB/c foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com membranas de celulose bacteriana (BC) ou BC-DETC (3,5 ou 35 µg/cm²). A atividade da SOD (A), níveis de superóxido (B) e produção de TNF-α (C), IL-6 (D), MCP-1 (E) e IL-10 (F) foram mensurados após 48 horas por CBA. As barras representam mediana ± intervalo interquartil de um ensaio representativo (de três ensaios) realizado em quintuplicata. Kruskal-Wallis seguido de Dunn's Multiple Comparison Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.4 TRATAMENTO COM BC-DETC REDUZ A LESÃO E A CARGA PARASITÁRIA NA ORELHA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *L. BRAZILIENSIS*

Diante do efeito leishmanicida evidenciado nos ensaios *in vitro*, nós então avaliamos o efeito de BC-DETC contra *L. braziliensis*, *in vivo*. Para isso, camundongos foram inoculados com *L. braziliensis* na derme da orelha e três semanas depois membranas de BC-DETC foram aplicadas nas lesões e trocadas três vezes por semana. Observamos que a BC sozinha não modulou o desenvolvimento da LCL e que o tratamento com BC-DETC a 35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ também não modificou o desenvolvimento da lesão de maneira significativa quando comparado com o controle, não tratado. Entretanto, o tratamento com BC-DETC a 350 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ modulou significativamente o desenvolvimento da lesão (Figura 7).

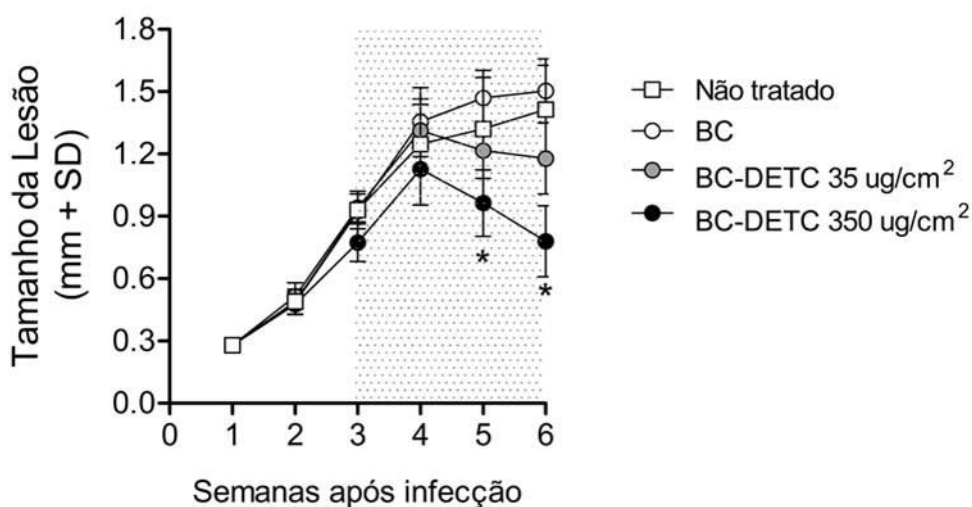


Figura 7. Desenvolvimento da LC em camundongos infectados com *L. braziliensis* e tratados com BC-DETC. Camundongos BALB/c ($n=6$ por grupo) foram infectados com 10^5 promastigotas de *L. braziliensis* e três semanas após a infecção membranas de BC-DETC (35 e 350 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) foram colocadas sobre as lesões por três semanas consecutivas (área hachurada). Animais controle receberam BC pura ou não foram tratados. O desenvolvimento da lesão (A) foi avaliado semanalmente através da medida da espessura da orelha infectada utilizando paquímetro digital. Os dados são mostrados como média \pm desvio padrão e são um *pool* de dois experimentos independentes, cada um realizado com seis animais por grupo. Mann Whitney test; * $p < 0,05$.

Uma vez que o tratamento com BC-DETC a 350 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ resultou na inibição do desenvolvimento da LCL, realizamos um novo ensaio, mais prolongado, empregando essa concentração. Nesse novo ensaio, o controle consistiu de animais tratados com

BC sozinha, pois não observamos diferença no tamanho da lesão de animais não tratados comparados aos animais que receberam BC pura. Nesse novo ensaio, as membranas foram trocadas três vezes por semana durante nove semanas consecutivas, conforme descrito em Materiais e Métodos.

A aplicação tópica de BC-DETC diminuiu significativamente a lesão dos animais (Figura 8A) e esta diferença foi evidente da quarta até a sétima semana após infecção. Após a sétima semana, as lesões progrediram espontaneamente a cura em ambos os grupos (BC-DETC e BC pura). A análise geral de progressão da doença, demonstrada pela AUC também foi significativamente diferente nos grupos avaliados ($p < 0,05$) (Figura 8B). Conjuntamente estes dados demonstram a habilidade de BC-DETC, aplicada de forma tópica, em controlar o desenvolvimento da lesão causada pela infecção por *L. braziliensis*. A aplicação tópica de BC-DETC também reduziu significativamente a carga parasitária na orelha (Figura 8C), mensurada três semanas após o início do tratamento (seis semanas após a inoculação do parasita). Em contrapartida, neste mesmo ponto a carga parasitária no linfonodo permaneceu inalterada nos dois grupos (Figura 8D). Estes dados demonstram que BC-DETC controla o desenvolvimento da lesão e a replicação parasitária de maneira sustentada no local de infecção.

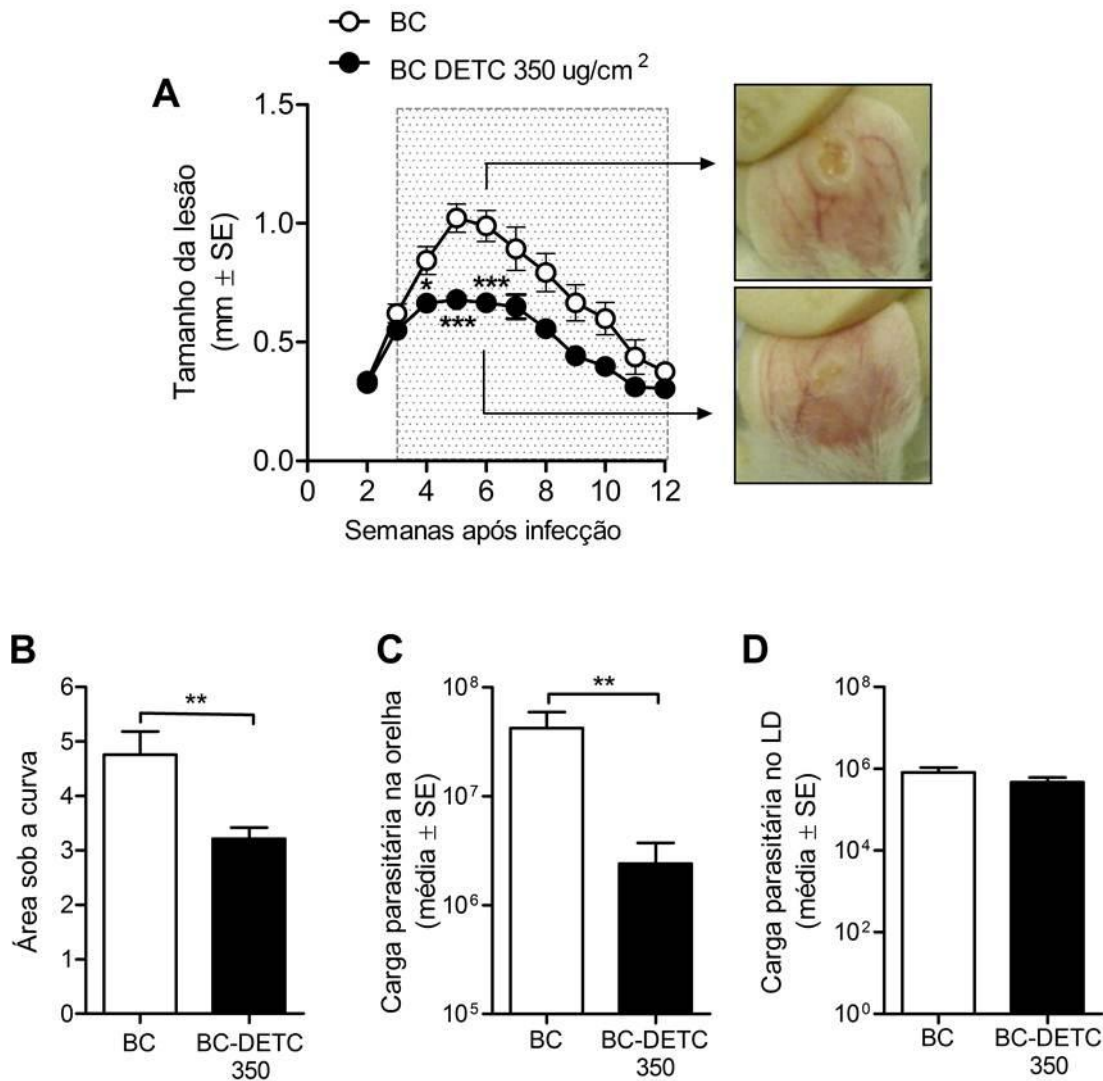
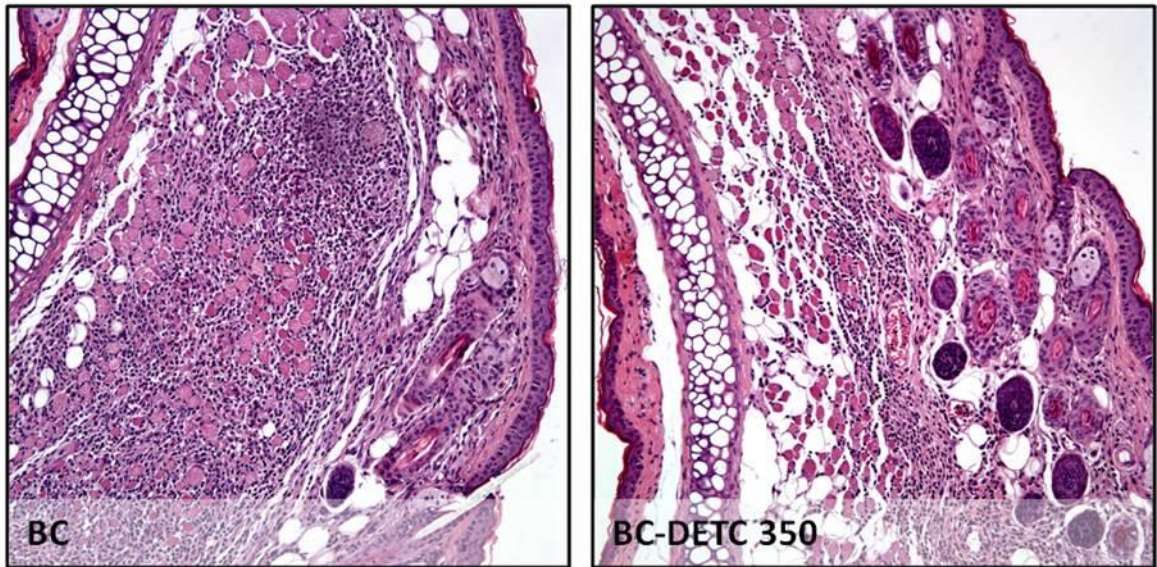


Figura 8. O tratamento tópico com BC-DETC modula a LC causada por *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c foram infectados com 10^5 promastigotas de *L. braziliensis* e três semanas após a infecção, membranas de BC-DETC 350 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ foram colocadas sobre as lesões por nove semanas consecutivas (área hachurada). Animais controle receberam BC pura. O desenvolvimento da lesão (A) foi avaliado semanalmente através da medida da espessura da orelha infectada utilizando paquímetro digital e da análise da área sob a curva (AUC) (B) demonstrada em (A). Seis semanas após a infecção, a carga parasitária foi determinada no sítio de infecção (C) e no linfonodo drenante (LD) (D) por ensaio de diluição limitante. Os dados são mostrados como média \pm desvio padrão e são um *pool* de dois experimentos independentes cada um realizado com seis a 12 animais por grupo. Mann Whitney test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.5 TRATAMENTO COM BC-DETC MODULA O PERFIL DE CITOCINAS EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *L. BRAZILIENSIS*

As úlceras de LCL são caracterizadas por intensa reação inflamatória (WU & LIA, 2008; TROVATTI et al, 2011). Neste trabalho, nós observamos que as secções histológicas obtidas dos animais controle (tratados com BC pura) apresentaram um intenso infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares, acompanhado de hiperplasia epidérmica e áreas ulceradas (Figura 9A). Em contraste, as secções de tecido obtidas dos animais tratados com BC-DETC demonstraram um infiltrado inflamatório menos abundante, resultando em menor hiperplasia epidérmica (Figura 9A). Estes dados demonstram que membranas de BC-DETC aplicadas de forma tópica são capazes de modular a reação inflamatória tecidual. Diante destas observações, nós investigamos o perfil de citocinas no sítio de infecção. Para isto, camundongos infectados com *L. braziliensis* foram tratados com BC-DETC e as orelhas foram obtidas para análise por PCR em tempo real. Seis semanas após a infecção, a expressão de IFN- γ e TNF- α foram reduzidas nos animais tratados com BC-DETC (Figura 9B). A expressão de TGF- β , citocina associada com o reparo tecidual (SANTIBANEZ et al, 2011) e de IL-10, uma citocina regulatória (NOVOA et al, 2011), não foram moduladas (Figura 9B).

A



B

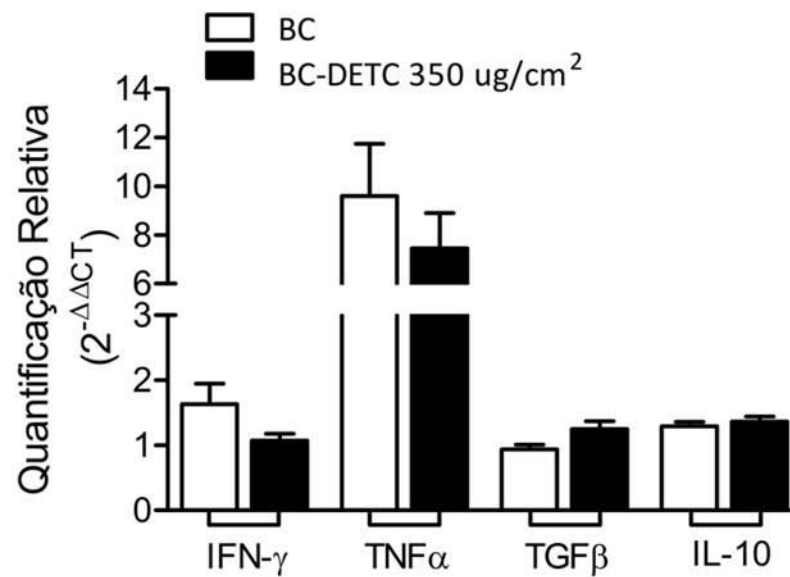


Figura 9. Expressão *in situ* de citocinas em camundongos infectados e tratados com BC-DETC. Camundongos BALB/c foram infectados com 10^5 promastigotas de *L. braziliensis* e três semanas após a infecção, membranas de BC-DETC $350 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ foram colocadas sobre as lesões por três semanas consecutivas. Animais controle receberam BC pura. Secções da orelha (A) foram obtidas seis semanas após a infecção e coradas com H&E. Os cortes histológicos foram avaliados por microscopia óptica em objetiva de 20 vezes. Seis semanas após a infecção, a expressão relativa (B) de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β foi avaliada por PCR em tempo real. A expressão gênica é representada através da diferença de expressão em relação a camundongos *naïve*. Os dados demonstrados são um pool de três experimentos independentes realizados com quatro a seis animais, cada.

Nós também avaliamos a produção de citocinas após reestimulação de células do LN, obtidas de camundongos após três semanas de tratamento. Novamente, os

níveis de IFN- γ (Figura 10A) e TNF- α (Figura 10B, $p < 0.05$) foram reduzidos após aplicação tópica de BC-DETC. Os níveis de IL-4 também foram diminuídos (Figura 10C), enquanto os níveis de IL-10 permaneceram inalterados (Figura 10D). Esses resultados confirmam nossos achados *in situ* (Figura 9) e indicam que o controle do desenvolvimento da lesão (Figura 8A) é acompanhado de uma modulação negativa da resposta inflamatória.

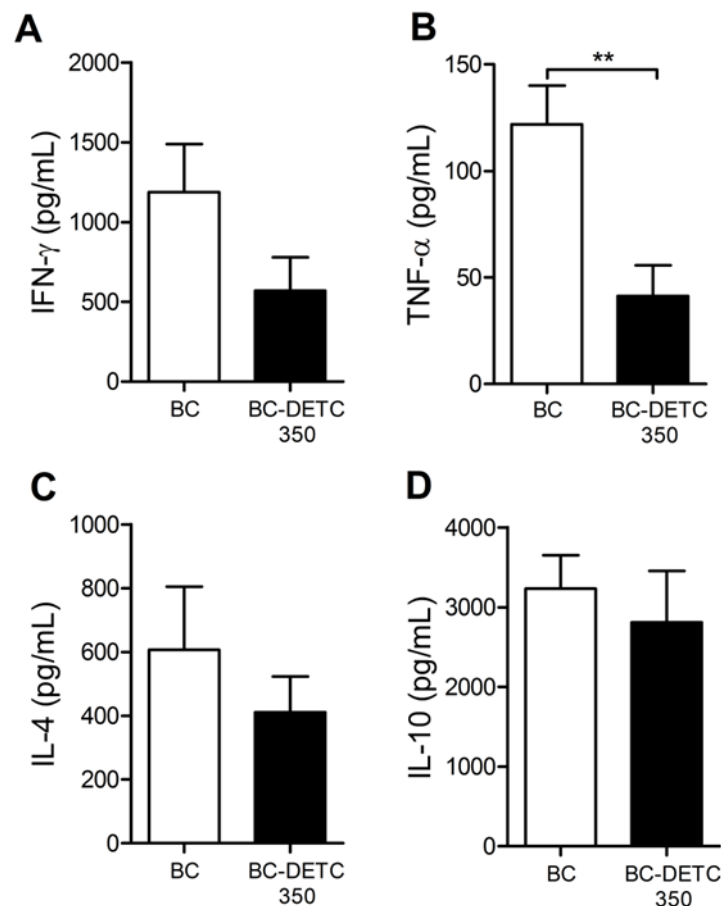


Figura 10. Perfil de citocinas secretadas por células do linfonodo de camundongos tratados com BC-DETC. Camundongos BALB/c foram infectados com 10^5 promastigotas de *L. braziliensis* e três semanas após a infecção, membranas de BC-DETC $350 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ foram colocadas sobre as lesões por três semanas consecutivas. Seis semanas após a infecção, os linfonodos drenantes foram coletados e as células reestimuladas com promastigotas de *L. braziliensis*. A presença de (A) IFN- γ , (B) TNF- α , (C) IL-4 e (D) IL-10 foi determinada nos sobrenadantes das culturas por ELISA. Os dados são mostrados como mediana \pm intervalo interquartil e são um *pool* de três experimentos independentes cada um realizado com quatro a seis animais por grupo. Mann Whitney test; ** $p < 0,01$.

5.6 MEMBRANAS DE BC-DETC TEM AÇÃO LEISHMANICIDA EM MACRÓFAGOS HUMANOS INFECTADOS COM *L. BRAZILIENSIS*

A fim de estender nossos achados para células humanas, nós investigamos o efeito de BC-DETC em macrófagos humanos experimentalmente infectados com *L. braziliensis*. O IC₅₀ de BC-DETC em macrófagos humanos, após 48 horas de tratamento, foi calculado em 284,9 µg/cm². Empregando o IC₅₀ calculado, nós observamos que há redução de 50% na porcentagem de células infectadas (Figura 11A, p<0,05) e uma redução significativa no número de amastigotas por 100 células (Figura 11B, p<0,05). Culturas realizadas na presença de Apocinina, um antioxidante, tiveram este efeito leishmanicida revertido, confirmando a ação microbicida de BC-DETC em macrófagos humanos. Fotografias representativas confirmam a o número reduzido de parasitas nas culturas com BC-DETC e o elevado número de amastigotas na presença de apocinina (Figura 11C). Finalmente, a citotoxicidade de BC-DETC em macrófagos humanos foi determinada após o tratamento de macrófagos não infectados com BC-DETC. A CC₅₀ calculada foi de 2.312 µg/cm². O índice de seletividade de BC-DETC nestas células foi 8,11.

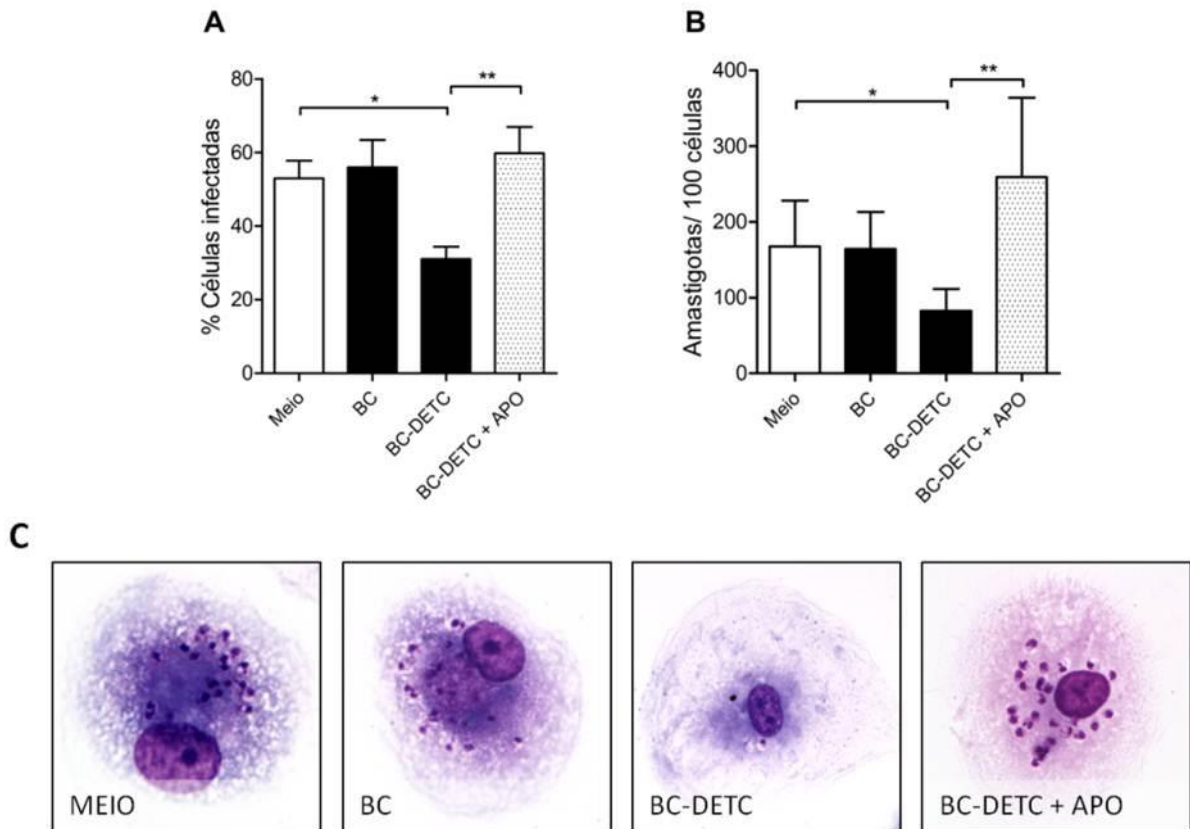


Figura 11. Efeito leishmanicida de BC-DETC em macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis*. Macrófagos de seis doadores saudáveis foram infectados com promastigotas de *L. braziliensis* (1:10). As células foram tratadas com BC-DETC (249,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) na presença ou não de apocinina (APO). Após 48 h, As lamínulas foram coradas com H&E e avaliou-se por microscopia óptica a porcentagem de células infectadas (A) e o número de amastigotas por 100 células (B). Fotografias representativas das culturas (C). Os dados são apresentados como mediana+intervalo interquartil. Kruskal-Wallis seguidode Dunn's Multiple Comparison Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

6 DISCUSSÃO

Atualmente, a principal estratégia de controle da leishmaniose consiste no tratamento com drogas leishmanicidas como antimoniais pentavalentes e AmB (GOTO e LINDOSO, 2010; ROATT et al., 2014). Apesar do seu uso há muitos anos, todas as drogas de primeira escolha apresentam problemas como alto custo, toxicidade, efeitos adversos, eficácia terapêutica variável e aumento no número de casos de resistência (CROFT et al., 2006; MISHRA et al., 2007; GOTO e LINDOSO, 2010; SINGH e SUNDAR, 2014). Nosso grupo demonstrou previamente que o DETC pode ser uma alternativa terapêutica para a quimioterapia na LCL (KHOURI et al., 2009; KHOURI et al., 2010) e no presente trabalho nós expandimos nossos achados avaliando uma formulação tópica empregando membranas de biocelulose contendo DETC (BC-DETC).

A fim de caracterizarmos as formulações de BC-DETC, realizamos análises de MEV. As mesmas demonstraram a penetração e dispersão do DETC na superfície da BC, resultando em membranas com elevada flexibilidade e distribuição homogênea. Resultados semelhantes foram encontrados em preparações de BC contendo lidocaína (TROVATTI et al., 2011; TROVATTI et al., 2012), ibuprofeno (TROVATTI et al., 2012), diclofenaco (SILVA et al., 2014b) e cafeína (SILVA et al., 2014a). As formulações também foram avaliadas por FTIR e os espectros obtidos demonstraram ausência de formação de novos picos durante a preparação das membranas. Entretanto, alguns picos sofreram deslocamento, o que pode indicar a presença de interações moleculares, como as interações não covalentes de enxofre, presente no DETC, com o átomo de oxigênio das hidroxilas presentes na estrutura da celulose. Tais interações químicas sugerem a formação de um sistema de liberação controlada, no qual moléculas livres são rapidamente liberadas por difusão através da membrana, enquanto aquelas moléculas de interação com a membrana são lentamente liberadas. Nós também avaliamos a citotoxicidade das membranas de BC-DETC: nós não observamos morte celular após a exposição a BC-DETC nas concentrações de 3,5 e 35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, empregando ensaios de exclusão de azul de Trypan. Estes resultados concordam com os dados da literatura, que demonstraram ausência de citotoxicidade em diversos modelos de exposição à BC tais como (a) osteoblastos

humanos e fibroblastos L929 (CHEN et al., 2009), (b) células endoteliais da veia umbilical (JEONG et al., 2010) e (c) após a administração intraperitoneal em camundongos BALB/c (KIM et al., 2013). Coletivamente, esses achados reforçam a idéia de que a BC é biocompatível.

Uma vez que as formulações de BC-DETC não apresentaram citotoxicidade e indicativos de um sistema de liberação controlada, avaliamos a ação leishmanicida das membranas de BC-DETC *in vitro*. Macrófagos murinos infectados com *L. braziliensis* e expostos à BC-DETC, em diferentes concentrações, apresentaram uma redução significativa da taxa de infecção e este efeito foi associado à inibição da atividade da SOD1 e ao aumento nos níveis de superóxido. Estes resultados confirmam nossos resultados prévios de que a ativação da SOD1 contribui para a sobrevivência da leishmania, pela modulação nos níveis de superóxido, e que a inibição desta enzima pelo DETC promove a morte parasitária de modo superóxido-dependente (KHOURI et al., 2009, KHOURI et al., 2010).

Adicionalmente, macrófagos infectados com *L. braziliensis* expostos à BC-DETC apresentaram um aumento significativo na liberação de TNF- α , IL-6, IL-10 e MCP-1 (CCL2). O TNF- α é uma citocina importante para a ativação da enzima iNOS, levando à produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos previamente estimulados por IFN- γ (LIEW et al., 1990). Através da regulação de quimiocinas, o TNF- α também auxilia no recrutamento de linfócitos, monócitos e neutrófilos até o sítio inflamatório. Uma molécula importante para a o recrutamento de células inflamatórias e é a MCP-1 (CCL2): em macrófagos murinos infectados por *L. donovani*, a presença de MCP-1 aumenta a produção de NO, controlando a proliferação intracelular da leishmania (BHATTACHARYYA et al., 2002). Assim, a menor carga parasitária observada nas culturas de macrófagos infectados tratados com BC-DETC pode estar associada à maior produção de TNF- α e MCP-1, além dos maiores níveis de superóxido.

Em seguida, nós avaliamos o potencial terapêutico de BC-DETC *in vivo*. Membranas de BC-DETC aplicadas topicamente sobre as lesões desenvolvidas por camundongos infectados por *L. braziliensis*, reduziram de maneira significativa a espessura da orelha infectada e da carga parasitária no sítio de inoculação do parasita (orelha). Resultados similares foram obtidos quando camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* foram tratados intraperitonealmente com DETC (KHOURI et al.,

2010). O dissulfiram é um derivado de carbamato cujo principal composto ativo é o DETC; o tratamento de camundongos com Dissulfiram (160mg/kg por dia) durante 21 dias levou à redução de 50% na lesão da pata de camundongos infectados com *L. major* (SHARLOW, 2009). Esses achados corroboram o que encontramos, a respeito da inibição da SOD1 por DETC como alternativa terapêutica para a leishmaniose. Mais recentemente, uma análise de redes metabólicas cruzou informações de drogas aprovadas pelo FDA versus 560 genes importantes para a sobrevivência da *L. major* (CHAVALI et al., 2012). Nesse trabalho, os autores buscavam potenciais candidatos terapêuticos para a leishmaniose e os resultados apontaram o Dissulfiram como uma droga promissora. Buscando validar estes achados, o Dissulfiram foi testado sozinho ou em associação com outros compostos e observaram-se efeitos sinérgicos positivos quando o Dissulfiram foi utilizado em combinação com canamicina, clozapina, amoxicilina, contra promastigotas de *L. major*. Novamente, estes dados corroboram a ideia de que o DETC é uma molécula promissora para o tratamento da LC.

Embora o tratamento com BC-DETC tenha controlado o desenvolvimento da lesão dos animais infectados e também a carga parasitária no sítio de infecção, a carga parasitária no LN permaneceu inalterada nos animais tratados com BC ou com BC-DETC. Similarmente, nós mostramos que o tratamento com 17-AAG, um inibidor específico da proteína HSP 90, também não foi capaz de inibir a carga parasitária no LN, apesar de ter demonstrado clara ação leishmanicida no sítio de infecção (SANTOS et al., 2014). A vacinação de camundongos BALB/c com KMP-11 reduziu significativamente a carga parasitária no sítio de desafio com *L. braziliensis*, entretanto não reduziu significativamente a carga parasitária no LN (SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2013). Camundongos imunizados com histonas nucleossomais de *L. chagasi* apresentaram redução significativa da carga parasitária no LN, entretanto também não observou-se “esterilização” neste sítio (CARNEIRO et al., 2012). Neste modelo de infecção por *L. braziliensis*, o parasita persiste dentro do LN e este fenômeno está associado a presença de células T reguladoras (FALCAO et al., 2012). Em contrapartida, a persistência parasitária pode ter um efeito importante na manutenção da imunidade à leishmania (BELKAID, 2003) e/ou progressão para leishmaniose mucocutânea, merecendo mais investigação. Assim, observamos que o tratamento tópico com BC-DETC reduziu a carga parasitária no sítio de infecção, mas

não teve efeito em outros sítios como o linfonodo de drenagem, diferentemente do tratamento com DETC por via intraperitoneal (KHOURI et al., 2010).

Após a constatação de que BC-DETC controlou o desenvolvimento da LCL *in vivo*, nós verificamos se a resposta imune celular estava relacionada com a redução da carga parasitária. A aplicação tópica de BC-DETC reduziu a expressão *in situ* de IFN- γ e TNF- α , comparado com o grupo controle. As células obtidas do LN de camundongos tratados com BC-DETC também demonstraram redução significativa na produção de IFN- γ e TNF- α . Estes dados estão de acordo com a resposta inflamatória mais moderada observada *in situ*, comparativamente aos animais controle. De acordo, o Dissulfiram, um precursor do DETC, inibe a liberação de TNF- α , MMP 2, MMP 9 e VEGF (MARIKOVSKY et al., 2003). Embora IFN- γ e TNF- α sejam moléculas chave para ativação de macrófagos e morte parasitária, as mesmas em excesso estão associadas com inflamação excessiva e dano tecidual (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998; AMEEN, 2010; NYLEN e EIDSMO, 2012) além de desenvolvimento das formas clínicas mais graves da leishmaniose (BACELLAR et al., 2000; BACELLAR et al., 2002). Por outro lado, a IL-10, secretada por diferentes tipos celulares atua como uma molécula reguladora da resposta imune (SIEWE et al., 2006). No contexto da LV, IL-10 desempenha um papel importante da regulação da resposta Th1, reduzindo a proliferação dos linfócitos e a produção de IFN- γ (CARVALHO et al., 1994; NYLEN e SACKS, 2007). Na leishmaniose, o balanço entre os níveis de IFN- γ e IL-10 é importante na indução de uma resposta imune efetiva contra o parasita, sem que haja dano tecidual (BACELLAR et al., 2002; NOVOA et al., 2011). Deste modo, sugerimos que o DETC liberado pela BC leva à morte parasitária no sítio de infecção e esta redução no número de parasitas pode, por sua vez, modular a resposta celular, diminuindo a reação inflamatória e, conseqüentemente, o desenvolvimento da lesão. Estes dados são corroborados pelos achados no LN, segundo os quais a reestimulação das células com *L. braziliensis* levou à menor produção de TNF- α e de IFN- γ , no grupo tratado com BC-DETC em relação ao grupo controle.

Por último, nós investigamos o potencial terapêutico de BC-DETC em macrófagos humanos. A exposição de macrófagos infectados com *L. braziliensis* a BC-DETC reduziu a carga parasitária intracelular de maneira significativa. Na

presença de apocinina, este efeito é revertido, sugerindo, mais uma vez, a morte parasitária dependente de superóxido, assim como mostramos no modelo murino.

Dados de Novais e colaboradores (NOVAIS et al., 2014) mostraram que, ROS, e não NO, está associado com a morte de *L. braziliensis* em monócitos humanos. Assim, as vias metabólicas envolvidas na produção de ROS constituem alvos relevantes para a terapia da leishmaniose. Utilizando macrófagos humanos, o IC₅₀ foi calculado em 284,9 µg/cm² e o CC₅₀ em 2.312 µg/cm². O índice de seletividade calculado foi de 8,11, indicando que o efeito de BC-DETC é 8 vezes mais seletivo para a amastigota que para o macrófago humano. Índices de seletividade > 10 são requeridos durante o desenvolvimento de uma nova droga, pois eles indicam menor chance de efeitos citotóxicos durante o tratamento (WENIGER et al., 2001). Deste modo, o índice de seletividade das membranas de BC-DETC está próximo dos valores de referência desejados.

Considerando que as opções terapêuticas para a LT são limitadas e que nos últimos anos o número de casos refratários ao tratamento tem aumentado (STAUCH et al., 2012), a aplicação tópica de BC-DETC pode ser uma alternativa para o tratamento combinado. Até o presente momento, diversos ensaios clínicos empregando formulações tópicas tem demonstrado eficácia contra LC causada por *L. major* (BEN SALAH et al., 1995; BEN SALAH et al., 2009; BEN SALAH et al., 2013) e *L. panamensis* (SOTO et al, 2002; SOSA et al, 2013). Ensaios clínicos similares ainda foram realizados em áreas endêmicas de LC causada por *L. braziliensis*. Estes dados reforçam a ideia de que o tratamento tópico é necessário e factível no contexto da LCL e que o tratamento combinado de BC-DETC e Sb⁺⁵, por exemplo pode ser uma estratégia importante para acelerar a cura em pacientes com LC causada por *L. braziliensis*

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho, demonstramos que biocurativos baseados em BC contendo DETC levam à morte da *L. braziliensis* em macrófagos murinos e humanos *in vitro*. Este efeito é mediado pela inibição da enzima SOD1 e aumento dos níveis de superóxido resultando numa ação imunomoduladora. A aplicação tópica de membranas de BC-DETC controlou a carga parasitária, bem como o desenvolvimento da lesão em modelo murino de LC, confirmando a propriedade desta formulação em modular a resposta inflamatória. Deste modo, nós sugerimos que membranas de BC-DETC devem ser mais investigadas como uma alternativa tópica de tratamento da LC.

REFERÊNCIAS

ABEER, M.M.; MOHD AMIN, M.C.; MARTIN, C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: their biochemistry, current approaches and future prospects. **J. Pharm. Pharmacol.**,v.66, p. 1047-1061,2014.

ALMEIDA, R.P. et al. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, p. 79-81, 2005.

AMATO, V.S. et al. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, p. 266-274,2007.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin. Exp. Dermatol.**,v. 35, p. 699-705, 2010.

ARANA, B.A. et al. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.65, p. 466-470, 2001.

BACELLAR, O. et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**,v. 12, p. 1228-1231, 2000.

BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 6734-6740, 2002.

BAHIA. Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. **Situação da Leishmaniose tegumentar americana (LTA)**. Bahia. v. 3. n1. Maio de 2015. Disponível em: http://www.suvisa.ba.gov.br/vigilancia_epidemiologica/consulta_boletim_epidemiologico/2986. Acesso em: 13 jul 2015.

BARUD, HDA. S. et al .Antimicrobial Brazilian Propolis (EPP-AF) Containing Biocellulose Membranes as Promising Biomaterial for Skin Wound Healing. **Evid. Based. Complement . Alternat. Med.**, 703024.2013.

BELKAID, Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in Leishmania infection. **Expert. Opin. Biol. Ther.**, v. 3, p. 875-885, 2003.

BELKAID, Y. et al. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of Leishmania major infection in the mouse ear dermis. **J. Exp. Med.**, v.188, p. 1941-1953, 1998.

- BEN SALAH, A. et al. R.A randomized, placebo-controlled trial in Tunisia treating cutaneous leishmaniasis with paromomycin ointment. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 53, p. 162-166,1995.
- BEN SALAH, A. et al. WR279,396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. **PLoS. Negl. Trop. Dis.** v. 3, 2009.
- BEN SALAH, A. e al. Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.** v. 368, p. 524-532, 2013.
- BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect. Dis.** v. 24, p. 684-703, 1997.
- BHATTACHARYYA, S. et al. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. **J. Infect. Dis.** v. 185, p. 1704-1708, 2002.
- BOUMA, M.J. et al. Activity of disulfiram (bis(diethylthiocarbamoyl)disulphide) and ditiocarb (diethyldithiocarbamate) against metronidazole-sensitive and-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 42, n. 6, p. 817-820,1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- CARNEIRO, M.W. et al. Vaccination with *L. infantum* chagasi nucleosomal histones confers protection against new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Plos. One.** v. 7, n. 12, p. 1-9, 2012.
- CARVALHO E. M. et al. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.** v. 152, p. 5949–5956, 1994.
- CASTILLO, E. et al. The kinetoplastid chemotherapy revisited: current drugs, recent advances and future perspectives. **Curr. Med. Chem.** v. 17, p. 4027-4051, 2010.
- CECILIO, P. et al. Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. **Front. Immunol.** v. 5, 2014.
- CHAVALI, A. et al. Metabolic network analysis predicts efficacy of FDA-approved drugs targeting the causative agent of a neglected tropical disease. **BMC. Syst. Biol.** v. 6, 2012.

- CHAWLA, P.R. et al. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Food. Technol. Biotechnol.** v. 47, p. 107–124, 2009.
- CHEN, Y.M. et al. In vitro cytotoxicity of bacterial cellulose scaffolds used for tissue-engineered bone. **J. Bioactive Compact. Polymers**, v. 24, p. 137-145, 2009.
- CHULAY, J.D; FLECKENSTEIN, L; SMITH, D.H. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p. 69-72, 1988.
- CROFT, S.L; SEIFERT, K; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, p. 399-410, 2006.
- CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 72, p. 132-141, 2002.
- CZAJA, W.K. et al. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1-12, 2007.
- DE MOURA, T.R. et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect Immun.**, v. 73, p. 5827-5834, 2005.
- ELSTNER, E. F e HEUPEL, A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase. **Anal. Biochem.**, v. 70, p. 616-620, 1976.
- FALCAO, S.C. et al. The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. **Int. J. Parasitol.**, v. 42, p. 771-780, 2012.
- GOTO, H e LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 8, p. 419-433, 2010.
- HÜBNER, L. et al. Enhancement of monocyte antimycobacterial activity by diethyldithiocarbamate (DTC). **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 13, n. 8, p. 1067-1072, 1991.
- JEONG, S. et al. Toxicologic evaluation of bacterial synthesized cellulose in endothelial cells and animals. **Mol. & Cell. Toxicol.**, v. 6, p. 370-377, 2010.

KAUR, G e RAJPUT, B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in leishmania. **J. Parasitol. Res.**, v. 2014, 2014.

KHAN, S. et al. Antifungal potential of disulfiram. **Nihon. Ishinkin. Gakkai. Zasshi.** v. 48, n. 3, p. 109-113, 2007.

KHOURI, R. et al. SOD1 Plasma Level as a Biomarker for Therapeutic Failure in Cutaneous Leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 210, n. 2, p. 306-310, 2014.

KHOURI, R. et al. DETC induces Leishmania parasite killing in human in vitro and murine in vivo models: a promising therapeutic alternative in Leishmaniasis. **PLoS. One**, v. 5, 2010.

KHOURI, R. et al. IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 182, p. 2525-2531, 2009.

KIM, G. D. et al. Evaluation of immunoreactivity of in vitro and in vivo models against bacterial synthesized cellulose to be used as a prosthetic biomaterial. **BioChip J.**, v. 7, p. 201-209, 2013.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angewandte Chem. Int.**, v. 44, p. 3358-3393, 2005.

KLEMM, D. et al. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 50, p. 5438-5466, 2011.

LAINSON, R e SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 273, p. 595-600, 1978.

LENSELINK, E. e ANDRIESSEN, A. A cohort study on the efficacy of a polyhexanide-containing biocellulose dressing in the treatment of biofilms in wounds. **Journal of Wound Care**, v. 20, p. 536-539, 2011.

LESSA, M. M et al. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 73, p. 843-847, 2007.

LIEW, F.Y. et al. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J. Immunol.**, v. 144, p. 4794-4797, 1990.

- LLANOS-CUENTAS, A. et al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, p. 223-231, 2008.
- LIVAK, K.J. e SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- MARIKOVSKY, M. et al. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. **J. Immunol.**, v. 170, p. 2993-3001, 2003.
- MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis *apud* ESCOMEL, 1911. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 859-876, 1986.
- MARSDEN, P.D. e NONATA, R.R. Mucocutaneous leishmaniasis. A review of clinical aspects. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, p. 309-326, 1975.
- MARTINEZ AVILA, H et al. Biocompatibility evaluation of densified bacterial nanocellulose hydrogel as an implant material for auricular cartilage regeneration. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 98, p. 7423-7435, 2014.
- MIRANDA, K.M; ESPEY, M.G; WINK, D.A. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, p. 62-71, 2001.
- MISHRA, J; SAXENA, A; SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Curr. Med. Chem.**, v. 14, p. 1153-1169, 2007.
- MODABBER, F. et al. Consultative meeting to develop a strategy for treatment of cutaneous leishmaniasis. Institute Pasteur, Paris. 13-15 June, 2006. **Kinetoplastid Biol. Dis.**, v. 6, p. 3, 2007.
- NASH, T. e RICE, W.G. Efficacies of zinc-finger-active drugs against *Giardia lamblia*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 42, n. 6, p. 1488-92, 1998.
- NEVES, L.O. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, p. 1092-1101, 2011.
- NOVAIS, F.O. et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. **J. Infect. Dis.**, v. 209, p. 1288-1296, 2014.

NOVOA, R. et al. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. **Parasite Immunol.**, v. 33, p. 132-136, 2011.

NYLEN, S. e EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.** ,v. 34, p. 551-561, 2012.

NYLEN, S. e SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends Immunol.**, v. 28, p. 378–384, 2007.

PASSWELL, J.H; SHOR, R; SHOHAM, J. The enhancing effect of interferon-beta and gamma on the killing of *Leishmania tropica* major in human mononuclear phagocytes in vitro. **J. Immunol.**, v. 136, p. 3062–3066, 1986.

PHILLIPS, M. et al. Disulfiram inhibits the in vitro growth of methicillin-resistant staphylococcus aureus. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 35, n. 4, p. 785-787, 1991.

RAO, C.N.R. e VENKATARAGHAVAN, R. The C=S stretching frequency and the “-N-C=S bands” in the infrared. **Spectrochimica Acta**, v. 18, p. 541-547, 1962.

REISINGER, E.C. et al. Inhibition of HIV progression by dithiocarb. **Lancet**, v. 24. p. 679-682, 1990.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 1, p.143-148, 1998.

ROATT, B.M. et al. Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. **Front. Immunol.**, v. 5, 2014.

SANCHAVANAKIT, N. et al. Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. **Biotechnology**, v. 22, p. 1994-1999, 2006.

SANTIBANEZ, J.F; QUINTANILLA, M; BERNABEU, C. TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clin. Sci.**, v. 121, p. 233-251, 2011.

SANTOS, D.M. et al. Chemotherapeutic Potential of 17-AAG against Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 8, 2014.

SANTOS, D.M. et al. Towards development of novel immunization strategies against leishmaniasis using PLGA nanoparticles loaded with kinetoplastid membrane protein-11. **Int. J. Nanomedicine.**, v. 7, p. 2115-2127, 2012.

SANTOS, D.M. et al. PLGA nanoparticles loaded with KMP-11 stimulate innate immunity and induce the killing of Leishmania. **Nanomedicine**, v. 9, p. 985-995, 2013.

SANTOS, D.O. et al. Leishmaniasis treatment- a challenge that remains: a review. **Parasitol. Res.**, v. 103, p. 1-10, 2008.

SCHERNER, M. et al. In vivo application of tissue-engineered blood vessels of bacterial cellulose as small arterial substitutes: proof of concept? **J. Surg. Res.**, v. 189, p. 340-347, 2014.

SHARLOW, E. R. et al. Identification of Potent Chemotypes Targeting Leishmania major Using a High -Throughput, Low-Stringency, Computationally Enhanced, Small Molecule Screen. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3. 2009

SHI, Z. et al. In situ nano-assembly of bacterial cellulose-polyaniline composites. **RSC Advances**, v. 2, p. 1040-1046, 2012.

SIEWE, L. et al. Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. **Eur. J. Immunol.**, v. 36, p. 3248-3255, 2006.

SILVA, N.C.S. et al. Topical caffeine delivery using biocellulose membranes: a potential innovative system for cellulite treatment. **Cellulose**, v. 21, p. 665-674. 2014a.

SILVA, N.H.C.S. et al. Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: In vitro dissolution and permeation studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 264-269, 2014b.

SILVESTRE, A.J; FREIRE, C.S; NETO, C.P. Do bacterial cellulose membranes have potential in drug-delivery systems? **Expert. Opin. Drug. Deliv.**, v. 11, p. 1113-1124, 2014.

SINGH, O.P. e SUNDAR, S. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. **Front. Immunol.**, v. 5, 2014.

SOSA, N. et al.. Randomized, double-blinded, phase 2 trial of WR 279,396 (paromomycin and gentamicin) for cutaneous leishmaniasis in Panama. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, p. 557-563, 2013.

SOTO, J. et al. Topical paromomycin/methylbenzethonium chloride plus parenteral meglumine antimonate as treatment for American cutaneous leishmaniasis: controlled study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 56-58, 1998.

SOTO, J. et al.. Successful treatment of New World cutaneous leishmaniasis with a combination of topical paromomycin/methylbenzethonium chloride and injectable meglumine antimonate. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. 47-51, 1995.

SOTO, J.M. et al.. Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drug (WR279396): phase 2 pilot study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, p.147-151, 2002.

SOUZA, C.M.C.O. et al. Regeneration of Skin Tissue Promoted by Mesenchymal Stem Cells Seeded in Nanostructured Membrane. **Transplant. Procee.**, v. 46, p. 1882-1886, 2014.

STAUCH, A. et al. Treatment of visceral leishmaniasis: model-based analyses on the spread of antimony-resistant *L. donovani* in Bihar, India. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, p. 20, 2012.

TROVATTI, E. et al. Biocellulose Membranes as Supports for Dermal Release of Lidocaine. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 4162-4168, 2011.

TROVATTI, E. et al. Bacterial cellulose membranes applied in topical and transdermal delivery of lidocaine hydrochloride and ibuprofen: In vitro diffusion studies. **Int. J. Pharm.**, p. 83-87, 2012.

TUON, F.F. et al. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis-a systematic review with a meta-analysis. **Int. J. Dermatol.**, v.47. p.109-124, 2008.

VAN GRIENSVEN, J. et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.**, v. 10, p.184-194, 2010.

WEISCHENFELDT, J. e PORSE, B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. **Cold Spring Harbor Protocols**: pdb.prot5080-pdb.prot5080. 2008.

WENIGER, B. et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **J. Ethnopharmacology**, v. 78, p. 193-200, 2001.

WHO. 2013. Control of the Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization. Disponível em: www.who.int/leishmaniasis/en/. Acesso em: 02 dez 2014.

WYSOR, M. S. et al. Cure of mice infected with *Trypanosoma rhodesiense* by cis-diamminedichloroplatinum (II) and disulfiram rescue. **Science**, v. 217, n. 4558, p. 454-456, 1982

WU, S. C. e LIA, Y. K. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. **J. Mol. Catalysis B: Enzymatic**. v. 54, p. 103-108, 2008.

ZAJTCHUK, J.T. et al.. Mucosal leishmaniasis in Brazil. **Laryngoscope**, v. 99, p. 925-939, 1989.