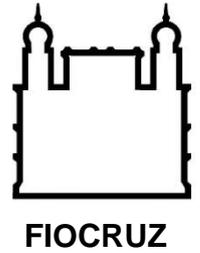




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

**DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO CONTENDO O FÁRMACO 17-DMAG
IMPREGNADO EM MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA PARA COMPOR
ESQUEMA TERAPÊUTICO CONTRA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

MARINA FAILLACE DE AMORIM

Salvador - Bahia

2021

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

**DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO CONTENDO O FÁRMACO 17-DMAG
IMPREGNADO EM MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA PARA COMPOR
ESQUEMA TERAPÊUTICO CONTRA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

MARINA FAILLACE DE AMORIM

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Patologia Humana para a obtenção
do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Veras

Salvador- Bahia

2021

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

A524d Amorim, Marina Faillace de

Desenvolvimento da formulação contendo o fármaco 17-dmag impregnado em membrana de celulose bacteriana para compor esquema terapêutico contra leishmaniose cutânea / Marina Faillace de Amorim. _ Salvador, 2021.

63 f.: il.: 30 cm

Orientador: Profa. Dra. Patricia Veras

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

1. Leishmaniose. 2. Tratamento tópico. 3. 17-DMAG. 4. HSP90. 5. Membrana de celulose bacteriana I. Título.

CDU 616.928.5

**DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO CONTENDO O FÁRMACO 17-DMAG
IMPREGNADO EM MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA PARA COMPOR
ESQUEMA TERAPÊUTICO CONTRA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

MARINA FAILLACE DE AMORIM

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 16 de dezembro de 2021.

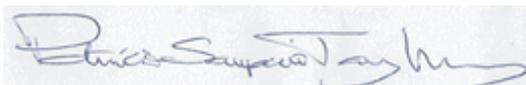
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio
Professora
UNIRIO



Dr. Fábio Rocha Formiga
Pesquisador
IAM/FIOCRUZ



Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001 – e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB.

Dedico este trabalho de dissertação ao meu preto velho, meu avozinho, que sempre foi minha bússola de ética e de moral. Que me ensinou a ser honesta, forte, estudiosa e nunca desistir! Que me levava para a escola quando pequena, me acordava de manhã cedo com vitamina pronta para eu ir para o colégio e depois ao cursinho. Que sempre teve orgulho de mim independentemente de qualquer coisa, que falava para todos que a neta dele ia ser doutora, não por fazer medicina, mas porque iria fazer doutorado!

Obrigada por sempre acreditar em mim, no meu potencial, mesmo quando eu mesma não acreditava! Sei que de onde estiver está olhando por mim, cuidando de mim e sendo meu anjo da guarda como já era em vida!

Te amo pra sempre!



Arquivo pessoal - Humberto Barbosa Faillace (*in memoriam*) e Marina Faillace de Amorim

AGRADECIMENTOS

À Dra. Patrícia S. T. Veras, minha querida orientadora, por acreditar na minha capacidade profissional, fornecendo oportunidade de trabalhar em uma das mais importantes instituições de pesquisa do Brasil, onde sempre tive o sonho de estar. Por incentivar e contribuir com meu desenvolvimento científico durante esta trajetória.

À Ma. Kercia P. Cruz, minha amiga e orientadora não oficial, que contribuiu durante toda a minha iniciação científica e mestrado, discutindo resultados, pensando em soluções, virando noite e emendando semanas, sendo incentivo para perseverar nos meus estudos, mesmo quando eu pensava “e se?”

Ao Dr. Hernane Barud que forneceu as membranas de celulose bacteriana, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Me. Vinícius Pires e ao estudante de Iniciação Científica Alan Gualberto, que ajudaram a realizar os cálculos da impregnação da membrana.

Ao Dr. Diogo Moreira, pelas discussões e contribuições que me fizeram acreditar e aceitar os meus resultados.

À minha mãe, que é meu alicerce, que sonha junto comigo e incentiva nas conquistas dos meus sonhos, sempre acreditando que sou capaz.

À minha família, principalmente minha vó, minha dinda, meu tio, meu irmão, que são a minha base, sem eles eu não chegaria até aqui.

À minha amiga Taynan que foi coach de dissertação, me obrigando a sentar na cadeira e escrever, dando suporte com as atividades domésticas para eu não precisar parar.

À Manuela Campos, terapeuta, que fez eu enfrentar os medos e inseguranças e acreditar que sou capaz.

Ao meu noivo Rafael que sonha os meus sonhos comigo, topa minhas ideias, segura minha mãe e anda junto sempre incentivando e apoiando.

A todos os meus colegas e amigos do LaIPHE que ajudaram com discussões ou simplesmente com a amizade e as conversas reconfortantes na hora da pausa para o cafezinho.

Ao IGM, que foi minha segunda casa durante muitos anos, onde, muitas vezes, passei mais tempo do que na minha própria casa. E a todos que fazem esta casa funcionar e transformam o ambiente em um lugar mais amigável e acolhedor.

AMORIM, Marina Faillace de. Desenvolvimento da formulação contendo o fármaco 17-dmag impregnado em membrana de celulose bacteriana para compor esquema terapêutico contra leishmaniose cutânea. 2021. 63 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada, endêmica em mais de 90 países e, no Brasil, está presente em todas as regiões, sendo considerada um problema de saúde pública. As manifestações clínicas variam entre formas cutâneas, e a visceral que pode ser fatal. A transmissão ocorre por meio da picada de flebotomíneos fêmeas que, durante o repasto sanguíneo, inoculam promastigotas de *Leishmania* presentes em sua saliva. As promastigotas, então, infectam as células hospedeiras e se diferenciam na forma amastigota. Os tratamentos atuais mais utilizados são os antimoniais pentavalentes, porém, limitações levam o abandono do tratamento e, conseqüentemente, falha terapêutica. Esses dados mostram a necessidade do desenvolvimento de novos compostos leishmanicidas. Neste cenário, a Hsp90 é uma chaperona envolvida no processo de estabilização e ativação de diversas proteínas cliente importantes para a manutenção da homeostase celular. Em estudos anteriores, demonstramos que inibidores da Hsp90 são eficazes no controle de infecções causadas por *Leishmania* spp. em modelos *in vitro* e *in vivo*. No entanto, o uso prolongado *in vivo*, causou toxicidade. Desta forma, decidimos desenvolver uma formulação tópica, que, por ser menos invasiva, pode diminuir os efeitos tóxicos, além de ser de fácil aplicação e apresentar redução de custos. Assim, desenvolvemos formulações contendo 17-DMAG impregnado em membranas de celulose bacteriana (MCB), um biopolímero com propriedades curativas. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial quimioterápico do 17-DMAG impregnado em MCB no tratamento da leishmaniose cutânea (LC) em modelos *in vivo* e *in vitro* de infecção por *L. braziliensis*. A impregnação das MCB seguiu as seguintes etapas: primeiramente as membranas foram cortadas com diâmetro de 3,5 cm, impregnadas com diferentes concentrações de 17-DMAG diluído em solução de trealose 5% e secas em liofilizador. Para utilização nos ensaios, as MCB foram cortadas com *punch* de biópsia de 3 mm para *in vitro* e de 8 mm para *in vivo*. Avaliamos a toxicidade das MCB sobre BMMΦ (CC₅₀) e sua eficácia *in vitro* contra promastigotas axênicas de *L. braziliensis* (IC₅₀). Após 72 horas de tratamento, foi obtido um valor de CC₅₀ de 30,76 ± 1,29 nM, e IC₅₀ de 159,9 ± 49,6 nM. Devido ao valor do IC₅₀ ser menor do que o do CC₅₀, não conseguimos calcular o índice de seletividade. Nos ensaios *in vivo* as concentrações de 311 e 155 µg/cm² apresentaram toxicidade local com duas semanas de tratamento, mas não apresentaram toxicidade sistêmica. Concentrações menores, entre 1.000 e 125 ng/cm² não apresentaram toxicidade local, sendo viáveis para ensaios de toxicidade *in vivo*. Estes dados, somados aos resultados anteriores com o fármaco livre, demonstram que, após ajustes de doses, 17-DMAG terá potencial para compor esquema terapêutico contra LC.

Palavras chave: Leishmaniose. Tratamento tópico. 17-DMAG. HSP90. Membrana de celulose bacteriana.

AMORIM, Marina Faillace de. Development of a formulation containing the drug 17-DMAG impregnated in bacterial cellulose membrane to compose a therapeutic regimen against cutaneous leishmaniasis. 2021. 63 f. Dissertation (Master in Pathology) – Federal University of Bahia. Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2021.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease, endemic in more than 90 countries and, in Brazil, it is present in all regions, being considered a public health problem. Clinical manifestations vary between cutaneous and visceral forms, which can be fatal. Transmission occurs through the bite of female sandflies that, during the blood meal, inoculate *Leishmania* promastigotes present in their saliva. The promastigotes then infect the host cells and differentiate into the amastigote form. The most used current treatments are pentavalent antimonials, however, limitations lead to treatment abandonment and, consequently, therapeutic failure. These data show the need for the development of new leishmanicidal compounds. In this scenario, Hsp90 is a chaperone involved in the stabilization and activation process of several important client proteins for the maintenance of cellular homeostasis. In previous studies, we demonstrated that Hsp90 inhibitors are effective in controlling infections caused by *Leishmania* spp. in *in vitro* and *in vivo* models. However, prolonged use *in vivo* caused toxicity. In this way, we decided to develop a topical formulation, which, being less invasive, can reduce toxic effects, in addition to being easy to apply and reducing costs. Thus, we developed formulations containing 17-DMAG impregnated in bacterial cellulose membranes (MCB), a biopolymer with healing properties. The aim of this study was to evaluate the chemotherapeutic potential of MCB-impregnated 17-DMAG in the treatment of cutaneous leishmaniasis (CL) in *in vivo* and *in vitro* models of *L. braziliensis* infection. The impregnation of the MCB followed the following steps: first, the membranes were cut to a diameter of 3.5 cm, impregnated with different concentrations of 17-DMAG diluted in a 5% trehalose solution and dried in a lyophilizer. For use in the assays, the MCBs were cut with a biopsy punch of 3 mm for *in vitro* and 8 mm for *in vivo*. We evaluated the toxicity of MCB on BMM Φ (CC50) and *in vitro* efficacy against axenic promastigotes of *L. braziliensis* (IC50). After 72 hours of treatment, a CC50 value of 30.76 ± 1.29 nM, and IC50 of 159.9 ± 49.6 nM were obtained. Due to the IC50 value being lower than the CC50, we were unable to calculate the selectivity index. In *in vivo* assays, concentrations of 311 and 155 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ showed local toxicity with two weeks of treatment, but no systemic toxicity. Lower concentrations, between 1,000 and 125 ng/cm^2 , did not present local toxicity, being viable for *in vivo* toxicity assays. These data, added to the previous results with the free drug, demonstrate that, after dose adjustments, 17-DMAG will have the potential to compose a therapeutic regimen against CL.

Keys word: Leishmaniasis. Topical treatment. 17-DMAG. HSP90. Bacterial cellulose membrane.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo digenético de <i>Leishmania</i> sp	16
Figura 2. Status da endemicidade da LC no mundo	17
Figura 3. Casos de leishmaniose cutânea por Unidade Federativa no ano de 2020.	18
Figura 4. Representação estrutural do homodímero da Hsp90. Adaptado de Jackson 2012	21
Figura 5. Ciclo de ativação de proteínas através da Hsp90	23
Figura 6. Atividade dos inibidores da Hsp90	25
Figura 7. Inibidores da HSP90	26
Figura 8. Representação esquemática das placas de 24 e 96 poços utilizadas nos ensaios <i>in vitro</i>	36
Figura 9. Representação do colar elizabetano para camundongos	38
Figura 10. MCB cortadas no diâmetro de 3,5 cm ²	40
Figura 11. MCB impregnadas com água e secas na estufa a 30 °C overnight	41
Figura 12. Figura 10. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de MCB. impregnadas	42
Fig. 13. Percentual de liberação do 17-DMAG im3pregnado em MCB no tempo de 1 hora	43
Figura 14. Teste de toxicidade do 17-DMAG impregnado em MCB sobre BMMΦ - CC ₅₀	46
Figura 15. Teste de eficácia do 17-DMAG impregnado em MCB sobre culturas axênicas de <i>L. braziliensis</i>	47
Figura 16. Teste de eficácia do 17-DMAG impregnado em MCB sobre amastigotas intracelulares de <i>L. braziliensis</i>	48
Figura 17. Comparação MCB aplicadas em orelha seca ou úmida de camundongos BALB/c	49
Figura 18. Imagem macroscópica da orelha de camundongos BALB/c tratados com MCB impregnada com 17-DMAG nas concentrações de 311, 155, 4 ou 2 µg, ou membrana branca	50
Figura 19. Imagem microscópica da orelha de camundongos BALB/c	51

- Figura 20.** Imagem microscópica do baço, fígado e rim de camundongos BALB/c 52
- Figura 21.** Imagem macroscópica da orelha de camundongos BALB/c tratados com MCB impregnada com 17-DMAG nas concentrações de 1000, 500, 250, 125 ng, ou membrana branca 53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Relação entre a massa de 17-DMAG utilizada na impregnação da MCB e a concentração molar nos ensaios *in vitro* com massa inicial de 32 $\mu\text{g cm}^2$ 44
- Tabela 2.** Relação entre a massa de 17-DMAG utilizada na impregnação da MCB e a concentração molar nos ensaios *in vitro* com massa inicial de 4000 ng/cm^2 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

17-DMAG	17-desmethoxy-17-N, N-dimethylaminoethylamino geldanamycin
17-AAG	17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina
AHA1	Activator of HSP90 ATPase
ATP	Adenosina tri fosfato
BMM ϕ	macrófagos derivados de medula óssea
CTD	Domínio C terminal
DETC	Diethyldithiocarbamate
GA	Geldanamicina
HE	hematoxilina e eosina
HIP	<i>Hsp70-interacting protein</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HOP	<i>HSP70/HSP90-organizing protein</i>
HSP	Heat Shock Protein
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LCD	Leishmaniose cutânea disseminada
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose difusa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose Visceral
MCB	Membrana de celulose bacteriana
MD	Domínio intermediário
NTD	Domínio N terminal
ROS	Radicais de oxigênio
WHO	World Health organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 LEISHMANIOSE.....	15
1.2 TRATAMENTOS	18
1.3 PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 90	20
1.4 INIBIDORES DA HSP90	23
1.5 TRATAMENTO TÓPICO	26
2 JUSTIFICATIVA	28
3 HIPÓTESE	30
4 OBJETIVOS	30
4.1 GERAL.....	30
4.2 ESPECÍFICOS	30
5 METODOLOGIA	31
5.1 IMPREGNAÇÃO DAS MEMBRANAS	31
5.2 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	32
5.3 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DO 17-DMAG A PARTIR DE MCB.....	32
5.4 ANIMAIS	32
5.5 PARASITOS	33
5.6 INFECÇÃO	33
5.7 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA BMMΦ	34
5.8 TESTE DE EFICÁCIA DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB SOBRE CULTURA AXÊNICA de L. BRAZILIENSIS - IC50.....	35
5.9 TESTE DE TOXICIDADE DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB SOBRE BMMΦ - CC50.....	35
5.10. TESTE DE EFICÁCIA DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB CONTRA PARASITOS INTRACELULARES DE <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i> EM BMMΦ <i>IN VITRO</i>	36
5.11 TESTE DE TOXICIDADE DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB EM CAMUNDONGOS BALB/C	36
5.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA	37
5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
6 RESULTADOS	39
6.1 IMPREGNAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA	39

6.2 ENSAIO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	41
6.3 TESTE DE TOXICIDADE DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB SOBRE BMMΦ	42
6.4 TESTE DE EFICÁCIA DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB SOBRE CULTURA AXÊNICA DE <i>L. BRAZILIENSIS</i>	45
6.5 TESTE DE EFICÁCIA DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB CONTRA PARASITOS INTRACELULARES DE <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i> EM BMMΦ <i>IN VITRO</i>	46
6.6 TESTE DE TOXICIDADE DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB EM CAMUNDONGOS BALB/C	47
7 DISCUSSÃO	53
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE

Leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas pela picada de flebotomíneos fêmeas. Existem cerca de 20 espécies patogênicas de *Leishmania* que causam diversas formas clínicas da doença (DESJEUX, 2004). As manifestações clínicas variam entre dois tipos: i) leishmaniose tegumentar, que pode se apresentar na forma mucocutânea ou cutânea, que, por sua vez se apresenta nas formas localizada (LCL), disseminada (LD) e difusa (LCD) ii) e leishmaniose visceral (LV) (VERAS; DE MENEZES, 2016). Neste estudo focamos nas manifestações clínicas cutâneas.

A transmissão ocorre quando fêmeas infectadas de flebotomíneos, durante o repasto sanguíneo inoculam os parasitos na forma de promastigota metacíclica de *Leishmania*, que é caracterizada pelo longo flagelo e corpo alongado, presentes em sua saliva. Uma vez inoculados, os parasitos são fagocitados por células do sistema imune do hospedeiro, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, nas quais vão se diferenciar em formas amastigotas, apresentando corpo arredondado e flagelo curto, apenas com uma ponta bulbosa (SUNTER; GULL, 2017). As amastigotas são capazes de se multiplicar no interior do vacúolo parasitóforo das células infectadas podendo romper essas células e infectar novas. Em um novo repasto sanguíneo, a fêmea de flebotomíneo podem ingerir as formas amastigotas no interior da célula hospedeira. No intestino do flebotomo, os parasitos se transformam na forma promastigota que migra para a parte anterior do trato digestório do vetor sendo novamente liberados junto com a saliva na próxima alimentação (SUNTER, GULL, 2017; VERAS, DE MENEZES, 2016; WHO, 2021), completando assim o seu ciclo (Fig.1).

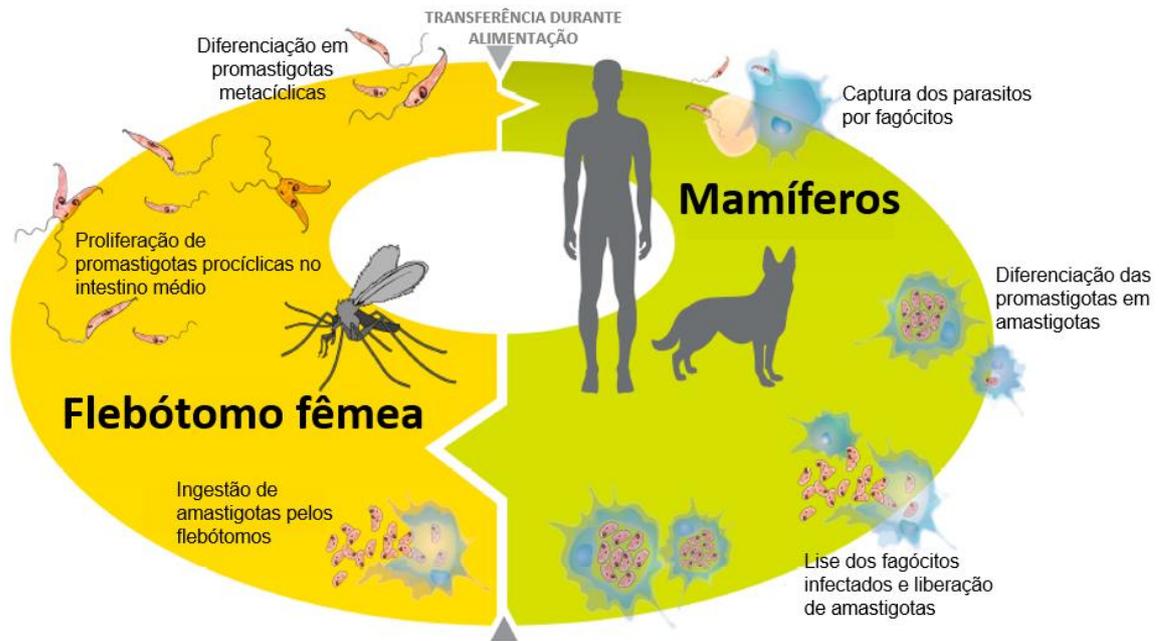


Figura 1 - Ciclo digenético de *Leishmania* sp.

Fonte: Adaptado de Veras & De Menezes, 2016.

Diferentes espécies de *Leishmania* podem causar variadas manifestações clínicas a depender do órgão afetado (BATES, 2007). A LCL é caracterizada pelo aparecimento de eritema no local da picada do flebótomo que, após algumas semanas, se desenvolve em um nódulo ou pápula e, posteriormente, na formação de uma úlcera de borda elevada e fundo necrótico que normalmente regride espontaneamente, podendo reaparecer caso o paciente apresente baixa imunidade (MEIRA; GEDAMU, 2019; SUNTER; GULL, 2017; WHO, 2021). LCL é causada principalmente pela *L. major* no velho mundo e *L. braziliensis* no novo mundo (FRAGA *et al.*, 2010). Em alguns casos as lesões se espalham pelo corpo causando a LCD com lesões nodulares e não cicatrizantes, no novo mundo, esta forma é causada principalmente pela *L. amazonensis* (CARVALHO *et al.*, 1994; MEIRA; GEDAMU, 2019, WHO, 2021). A manifestação da LD é caracterizada por múltiplas lesões acneicas e papulares em mais de duas áreas contíguas do corpo do paciente, tendo a presença de poucos ou nenhum parasito no tecido cutâneo (CARVALHO *et al.*, 1994; TURETZ *et al.*, 2002; UZEDA MACHADO; VENTIN PRATES; LIMA MACHADO, 2019). A LMC é causada principalmente pela *L. major*, mas também foram reportados alguns casos por *L. braziliensis*. Caracterizada por lesões que podem destruir de forma parcial ou total a mucosa do nariz, boca e garganta devido a uma resposta celular exacerbada que, apesar de controlar os parasitos, causa uma grande reação inflamatória e conseqüente destruição do tecido, deixando cicatrizes e causando estigma social (MEIRA; GEDAMU, 2019, WHO, 2021).

A leishmaniose está incluída entre as mais importantes endemias mundiais, sendo a LC consideradas endêmicas em 92 países (Fig. 2) com incidência anual de mais de um milhão de casos e a LV endêmica em 83 países, com incidência anual de 30 mil novos casos, sendo 70 países considerados endêmicos para as duas formas. Além disso, mais de um bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas e com risco de infecção (WHO, 2019).

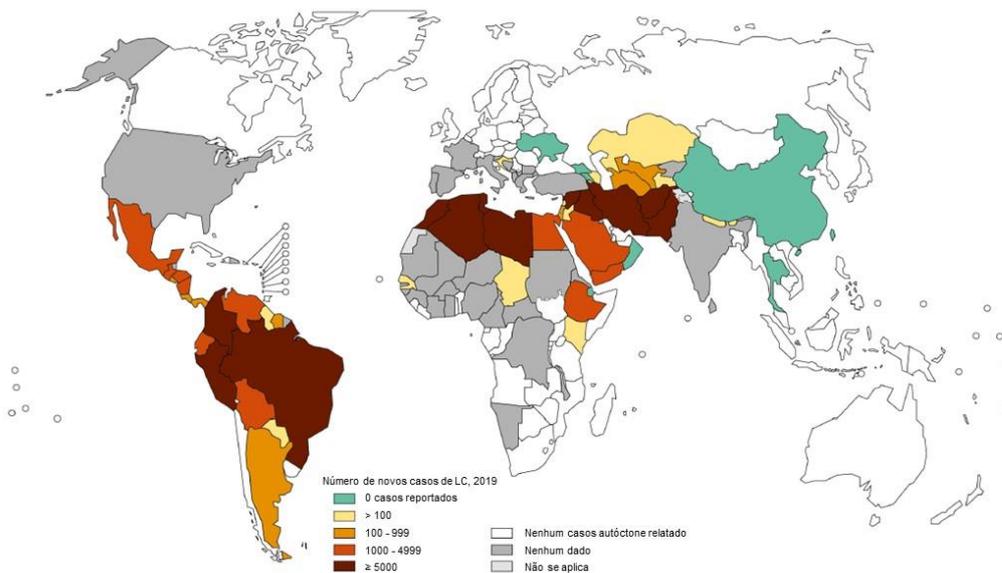


Figura 2 - Status da endemidade da LC no mundo.

Fonte: Adaptado de WHO 2020.

No Brasil, a LC é endêmica e está presente em todas as regiões brasileiras (Fig. 3), com incidência anual de 21 mil novos casos, segundo dados do Ministério da Saúde. O maior coeficiente de incidência é da região Norte, com 46,4 casos por 100.000 habitantes, seguida da região Centro-Oeste com 17,2 casos/100.000 habitantes e Nordeste com 8 casos/100.000 habitantes. Alguns fatores como: tempo de exposição, idade do paciente, condições socioeconômicas (LLANOS-CUENTAS *et al.*, 2008) e coinfeções como, por exemplo, com HIV (LINDOSO *et al.*, 2016), podem aumentar o risco de contágio e o agravamento da doença, sendo então, o tratamento clínico a melhor forma de controle da doença (WHO, 2020).

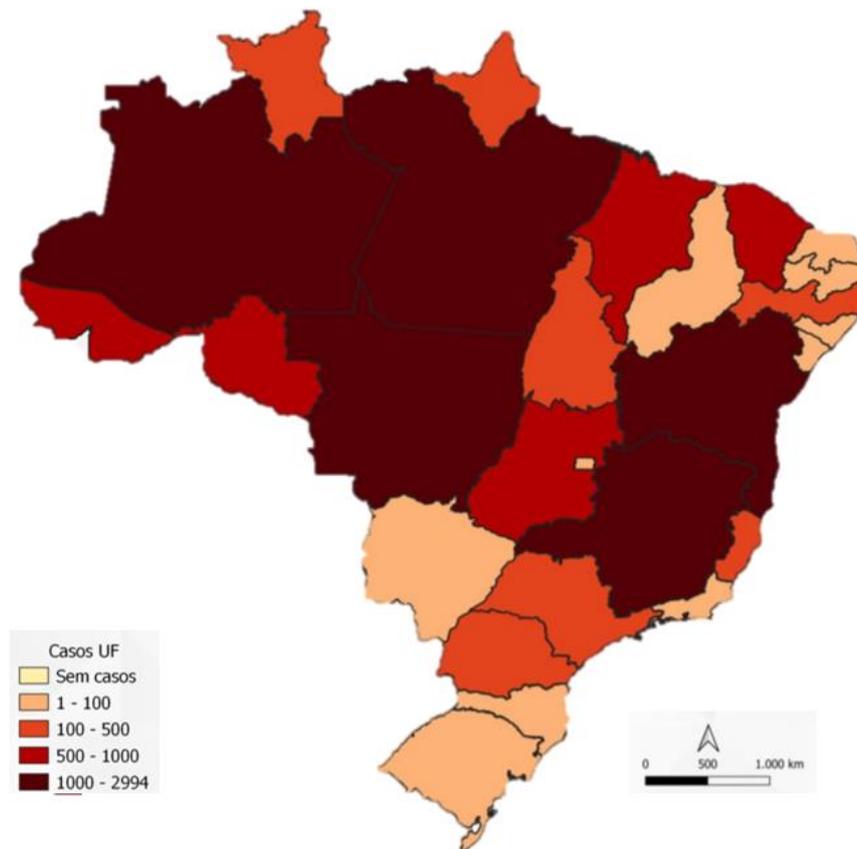


Figura 3 - Casos de leishmaniose cutânea por Unidade Federativa no ano de 2020.

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2020

1.2 TRATAMENTOS

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, como estibogluconato de sódio (Pentostam) e antimoniato de meglumina (Glucantime), se mantendo há mais de 70 anos e que, apesar de usadas há muito tempo, seus mecanismos de ação ainda são desconhecidos, além disso, esses quimioterápicos se mostram ineficientes devido aos longos ciclos de tratamento e também por promoverem graves efeitos colaterais como pancreatite, arritmia cardíaca, falência renal, hepatotoxicidade e dor muscular (LLANOS-CUENTAS *et al.*, 2008; PALUMBO, 2009). A aplicação destes fármacos é por via parenteral, de forma intravenosa ou intramuscular, fazendo com que os pacientes tenham que se deslocar até os centros de saúde para medicação. Além disso, o número de casos de resistência ao tratamento com Pentostam vem aumentando progressivamente. Um estudo de caso-controle no Peru avaliou os fatores de risco de falha terapêutica em pacientes tratados com

este fármaco, através do acompanhamento de 127 pacientes com LC, causada por *L. peruviana*, *L. guyanensis* ou *L. braziliensis*, onde 29 pacientes apresentaram falha terapêutica e tiveram que ser tratados com fármacos de segunda escolha (LLANOS-CUENTAS *et al.*, 2008).

Em estudo realizado no Brasil para avaliar a resposta terapêutica ao Glucantime foi demonstrado que diferentes regiões podem apresentar diferentes respostas ao tratamento, sendo necessária uma adequação na dose utilizada. O acompanhamento dos pacientes foi realizado em duas regiões: na Bahia e no Amazonas, na primeira foram acompanhados 61 pacientes e foi observado um percentual de falha de 49,2%, já na segunda região foram avaliados 57 pacientes e o percentual de falha foi de 73,7% (ROMERO *et al.*, 2001). Além da falha terapêutica dos antimoniais pentavalentes, alguns casos de resistência dos parasitos ao tratamento já foram observados na Índia (SUNDAR *et al.*, 2000).

Outros fármacos podem ser utilizados como de segunda escolha em caso de falha terapêutica dos antimoniais pentavalentes, são eles: pentamidina, paramomicina, miltefosina, e anfotericina B. A pentamidina foi descoberta como antiprotozoário em 1938 e se provou eficaz no tratamento de LV resistente aos antimoniais pentavalente (CRUZ *et al.*, 2009), porém, devido a sua estrutura, causa diversos efeitos colaterais como cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e até o desenvolvimento de diabetes (BLUM *et al.*, 2004; CRUZ *et al.*, 2009; DE MENEZES *et al.*, 2015; PALUMBO, 2009). Recentemente, casos de resistência a esse fármaco também foram descritos (BRAY *et al.*, 2003), além da dificuldade de tratar pacientes imunodeprimidos e co-infectados com HIV, sendo necessário um aumento da dose, do tempo de tratamento e, conseqüentemente, dos efeitos colaterais (SANTOS, D. O. *et al.*, 2008). Paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo que pode ser aplicado em forma de pomada para LC, porém, apesar do seu baixo custo, apresenta efeitos colaterais como nefrotoxicidade, ototoxicidade e, em alguns casos, hepatotoxicidade (CRUZ *et al.*, 2009; DE MENEZES *et al.*, 2015). Miltefosina foi primeiramente utilizada como antitumoral, em ensaios de fase II contra LV na Índia, este fármaco apresentou uma taxa de cura de 95% após quatro semanas de tratamento, sua apresentação é na forma oral, sendo não invasivo e indolor, porém efeitos colaterais gastrointestinais foram observados (SUNDAR; RAI, 2002), além de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e efeito teratogênico, de forma que não é recomendado o uso em gestantes (DE MENEZES *et al.*, 2015).

Anfotericina B é um antibiótico utilizado inicialmente como antifúngico, mas que apresentou excelente ação antileishmanicida e vem sendo utilizado como segunda linha de tratamento desde 1960 (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Sua afinidade por ergosteróis presentes na membrana da *Leishmania* induz a formação de poros na mesma, levando a morte

do parasito (CRUZ *et al.*, 2009; SUNDAR; RAI, 2002). Apesar da sua excelente eficácia, chegando a quase 100% de cura em pacientes infectados com *L. donovani*, a Anfotericina B apresenta diversos efeitos colaterais severos como desenvolvimento de miocardites, nefrotoxicidade, hipocalemia, hipotensão, tromboflebite, anemia, hepatite e outros, sendo necessário internamento e acompanhamento constante dos pacientes em uso desse fármaco, o que aumenta muito seus custos (CRUZ *et al.*, 2009; DE MENEZES *et al.*, 2015; PALUMBO, 2009; SUNDAR; RAI, 2002; SUNDAR; SINGH, 2016). Na tentativa de diminuir os efeitos colaterais da Anfotericina B, foi desenvolvida uma formulação lipossomal, que permite o aumento da concentração do composto no tecido alvo enquanto diminui os efeitos colaterais sistêmicos, além de ser rapidamente removido da circulação, porém seu alto custo e instabilidade em altas temperaturas se torna uma limitação para uso em países em desenvolvimento (CRUZ *et al.*, 2009; DE MENEZES *et al.*, 2015; SANTOS, D. O. *et al.*, 2008; SUNDAR; RAI, 2002; TIUMAN *et al.*, 2011).

Atualmente, todos os fármacos utilizados no mundo e preconizados pelo Ministério da Saúde, no Brasil, possuem limitações como: i) baixa eficácia, não apresentam cura terapêutica, e podem apresentar falha terapêutica e recidiva ii) efeitos colaterais, como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, e outros, iii) aplicação injetável, que faz com que os pacientes tenham que se deslocar até os centros de saúde para realizar o tratamento, além de ser doloroso, iv) alto custo. Além disso, diferentes espécies de *Leishmania* vão apresentar diferentes sensibilidades a esses fármacos. A escassez de novos medicamentos leishmanicidas, juntamente com o aumento do risco de resistência e variedade de manifestações clínicas, demonstra a necessidade do reconhecimento de novos alvos terapêuticos, bem como o desenvolvimento de novos quimioterápicos que sejam de fácil aplicação, com poucos ou nenhum efeito colateral, alta eficácia e baixo custo (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; CRUZ *et al.*, 2009; DE MENEZES *et al.*, 2015; SANTOS, D. O. *et al.*, 2008; SUNDAR; SINGH, 2016).

1.3 PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 90

A Hsp90 é um membro atípico da família das chaperonas, que são proteínas responsáveis pela estabilização e dobramento de diferentes proteínas, chamadas genericamente de proteínas cliente, (ALBERTS *et al.*, 2010; ISAACS *et al.*, 2002). Após estresses celulares, como aumento de temperatura, hipóxia, falta de nutrientes ou outros ocorre o aumento na produção da Hsp90, que é altamente conservada evolutivamente e essencial para o funcionamento celular e manutenção da homeostasia da célula (BOSE *et al.*, 1996). Esta

chaperona reconhece proteínas mal-formadas e promove seu dobramento correto, evitando assim sua destruição via proteassoma. Além disso, esse processo também previne a formação de agregados proteicos que podem ser tóxicos à célula, levando a sua morte e, inclusive, podendo causar doenças (ALBERTS *et al.*, 2010; BOSE *et al.*, 1996).

A Hsp90 se apresenta como um homodímero em que cada monômero apresenta três domínios estruturais: i) domínio N terminal (NTD), onde encontra-se o sítio de ligação com o ATP, ii) o domínio intermediário (MD) que liga-se ao NTD através de um conector, e atua na ligação da Hsp90 com a proteína cliente auxiliando seu dobramento, iii) domínio C terminal (CTD), responsável pela dimerização da proteína e não dependente de ATP (BROWN *et al.*, 2007; JACKSON, 2012; PALMA *et al.*, 2019; PEARL; PRODROMOU, 2006) (Fig. 4).

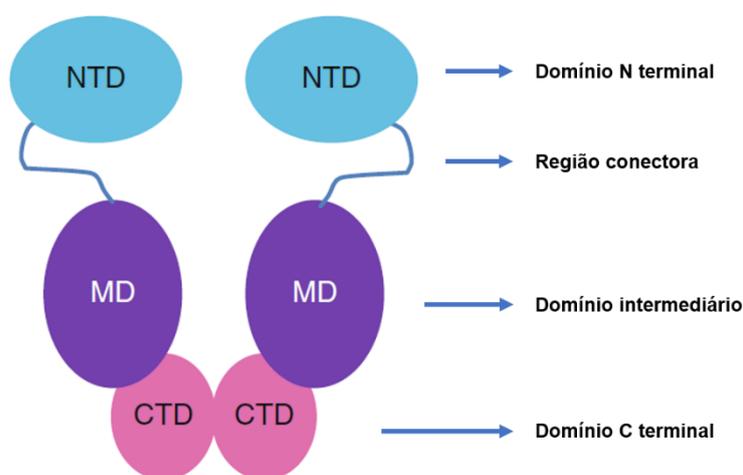


Figura 4 - Representação estrutural do homodímero da Hsp90.

Fonte: Adaptado de Jackson 2012.

A Hsp90 não atua de forma autônoma dentro da célula, mas sim em conjunto com outras chaperonas, chamadas de co-chaperonas, que juntas formam um heterocomplexo de dobramento de proteínas (BROWN *et al.*, 2007; JACKSON, 2012; WIESGIGL; CLOS, 2001). No processo de dobramento da proteína ocorrem os seguintes processos: i) montagem de um complexo formado pela proteína cliente inativa juntamente com a Hsp40 (Fig 5 A) e a Hsp70 (Fig 5 B); ii) estabilização deste complexo com a *Hsp70-interacting protein* (HIP), formando o complexo Hsp40/Hsp70/HIP (Fig 5 C); iii) Ligação da proteína do inglês *HSP70/HSP90-organizing protein* (HOP) no complexo, que promove a interação da proteína cliente com a Hsp90 em sua conformação aberta, formando assim o complexo intermediário (Fig 5 D); iv) uma vez que a proteína cliente é transferida para o interior da Hsp90, onde ocorre a dissociação desta proteína do complexo Hsp40/Hsp70/HIP (Fig 5 E); v) ocorre então a ligação de uma

molécula de ATP ao NTD do dímero da Hsp90 fazendo com que esta assumira sua forma fechada com a união dos monômeros (Fig 5 F); vi) a proteína p23 é então recrutada para o NTD, estabilizando o processo de dimerização da Hsp90 e promovendo a hidrólise do ATP. Ao mesmo tempo, a proteína P55 é recrutada para para o CTD, formando o complexo maduro (Fig 5 G) vii) por fim, ocorre o dobramento e ativação da proteína cliente, processo que pode ser auxiliado pela proteína Aha1, que possui ação ATPásica; viii) uma vez ativada, a proteína cliente é liberada, juntamente com todos os co-fatores e co-chaperonas que participaram do processo, a Hsp90 volta a sua forma aberta e um novo ciclo pode ser iniciado (BROWN *et al.*, 2007; JACKSON, 2012; PEARL; PRODROMOU, 2006; SILVA, K. P.; SERAPHIM; BORGES, 2013).

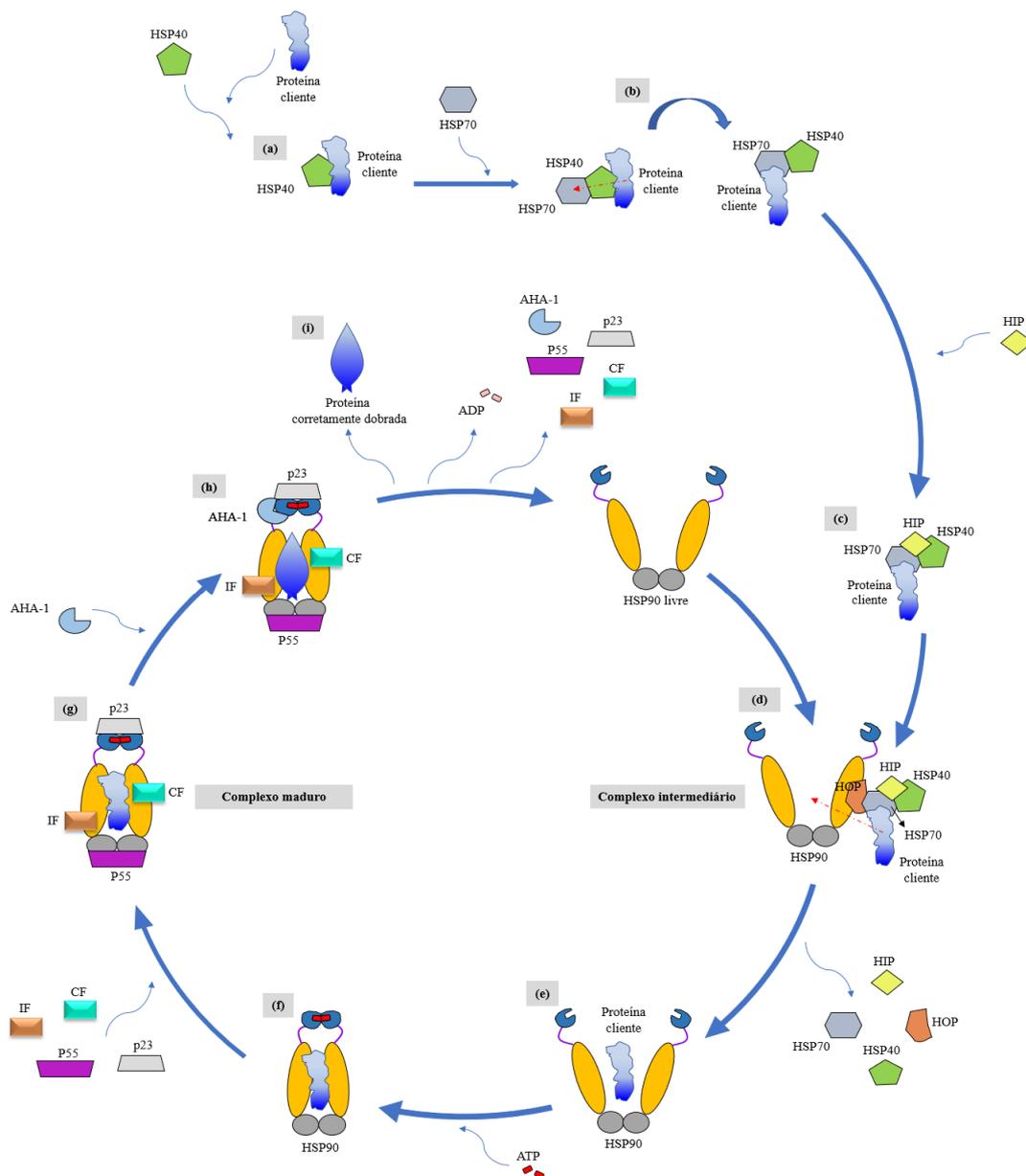


Figura 5 - Ciclo de montagem de proteínas com a participação da Hsp90. A Hsp90 é uma chaperona molecular que promove o dobramento e ativação de proteínas cliente com auxílio de co-chaperonas e co-fatores como

mostrado: (a) ligação entre a proteína cliente e a co-chaperona Hsp40; (b) ligação da Hsp70, formando o complexo proteína/Hsp40/Hsp70; (c) estabilização do complexo com a HIP; (d) ligação do complexo proteína/Hsp40/Hsp70/HIP à Hsp90 através da proteína HOP, formando o complexo intermediário; (e) transferência da proteína cliente para o interior na Hsp90 com sua conformação aberta e liberação das co-chaperonas; (f) ligação do ATP ao NTD da Hsp90 fazendo com que esta assumira sua conformação fechada; (g) ligação das proteínas p23 no NTD e p55 no CTD formando o complexo maduro; (Hsp) ativação da proteína cliente com auxílio da proteína AHA-1; (i) liberação da proteína corretamente dobrada e ativada bem como de todos as proteínas que participaram do processo, além do ADP, retorno da Hsp90 a sua conformação aberta disponível para iniciar um novo ciclo.

Fonte: Imagem produzida por Cruz, Kércia ([s.d.]).

Em protozoários patogênicos, a Hsp90 não está relacionada apenas com dobramento e ativação de proteínas, mas também no desenvolvimento dos seus estágios específicos de vida, visto que condições de temperatura e pH podem alterar quando o parasito encontra-se no vetor ou no hospedeiro (ROY *et al.*, 2012). No *Plasmodium falciparum*, protozoário causador da malária, a Hsp90 é de fundamental importância para a sobrevivência devido a variação de temperatura entre o inseto vetor e o hospedeiro mamífero. Além disso, no homem, o Plasmodium sofre variações de temperatura no causadas por febres, levando à inibição da Hsp90 e, conseqüentemente, interrupção da mudança de estágio do parasito na forma de anel para trofozoíto. A participação da Hsp90 de *Toxoplasma gondii* foi evidenciada no processo de invasão da célula hospedeira e na multiplicação da forma de taquizoíto (SUN *et al.*, 2017). Foi mostrado que a inibição da Hsp90 pode causar a degradação de proteínas fundamentais para a manutenção da homeostasia, causando danos celulares e até culminando na morte dos parasitos.

1.4 INIBIDORES DA HSP90

O primeiro inibidor da Hsp90 descrito foi a Geldanamicina (GA), um antibiótico, da família das ansamicinas benzoquinonas, isolado do fungo *Streptomyces hygroscopicus* (O. ANGEL; MATRAJT; C. ECHEVERRIA, 2013). Seu primeiro uso foi em testes contra diferentes tipos de câncer, devido a identificação de número elevado de proteínas cliente da Hsp90 expressas em células cancerígenas (GRANER, 2016; JHAVERI *et al.*, 2012). Devido ao importante papel desta chaperona nos processos celulares, diversos estudos surgiram buscando novos inibidores com potencial quimioterápico contra diferentes doenças além do câncer, como doenças neurodegenerativas, infecções causadas por fungos, vírus e protozoários (JHAVERI *et al.*, 2012; SOLIT; CHIOSIS, 2008). A GA liga-se com grande afinidade ao sítio de ligação do ATP no NTD, impedindo sua hidrólise (DE MENEZES *et al.*, 2015; STEBBINS *et al.*, 1997), fechamento do dímero da Hsp90 e dobramento da proteína cliente, que, por se manter mal

formada, é ubiquitinada e degradada via proteassoma (Fig 6).

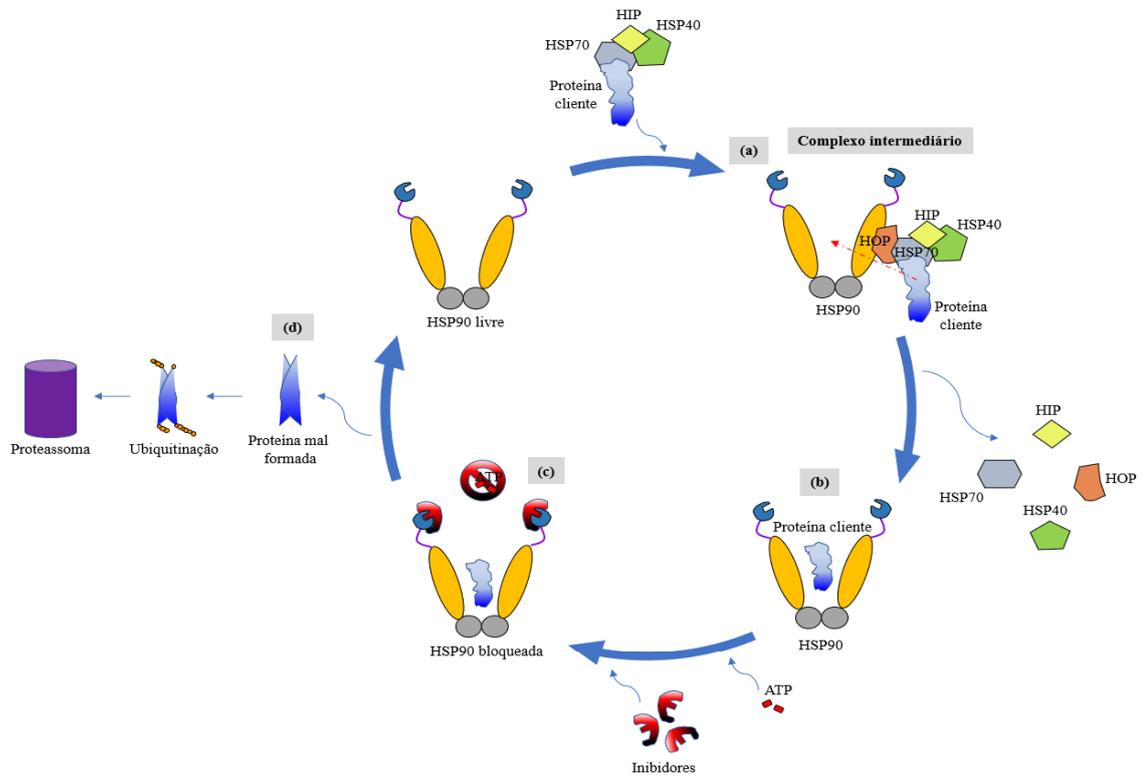


Figura 6 - Atividade dos inibidores da Hsp90. (a) O complexo intermediário é formado pela Hsp90 e as co-chaperonas juntamente com a proteína cliente; (b) a proteína cliente é então transferida para o interior da Hsp90, porém (c) os inibidores da Hsp90 ligam-se ao NTD impedindo a ligação do ATP, (d) a proteína cliente é liberada ainda mal-formada, é ubiquitinada e degradada via proteassoma.

Fonte: Imagem produzida por Cruz, Kércia ([s.d.]).

O tratamento com 90 nM de GA cujo alvo proteico é a Hsp90, leva à inibição em 50% do crescimento de *L. donovani*, devido a uma parada do crescimento celular na fase G2 do ciclo do parasito (WIESGIGL; CLOS, 2001). Um outro estudo utilizando GA demonstrou a indução de apoptose de promastigotas de *L. donovani*, de forma tempo e dose dependentes em culturas axênicas incubadas sob condições que mimetizam o ambiente do vacúolo parasitóforo, 37 °C e pH 5,5 (LI *et al.*, 2009). Esse mesmo trabalho mostrou que, após o tratamento com GA, ocorre um aumento da produção de radicais de oxigênio (ROS) pelas promastigotas, o que pode levar à uma disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, à morte por apoptose destes parasitos (LI *et al.*, 2009). Porém, devido à baixa solubilidade da GA, limitada estabilidade *in vivo* e efeito hepatotóxico, surgiu a necessidade do desenvolvimento de novos inibidores.

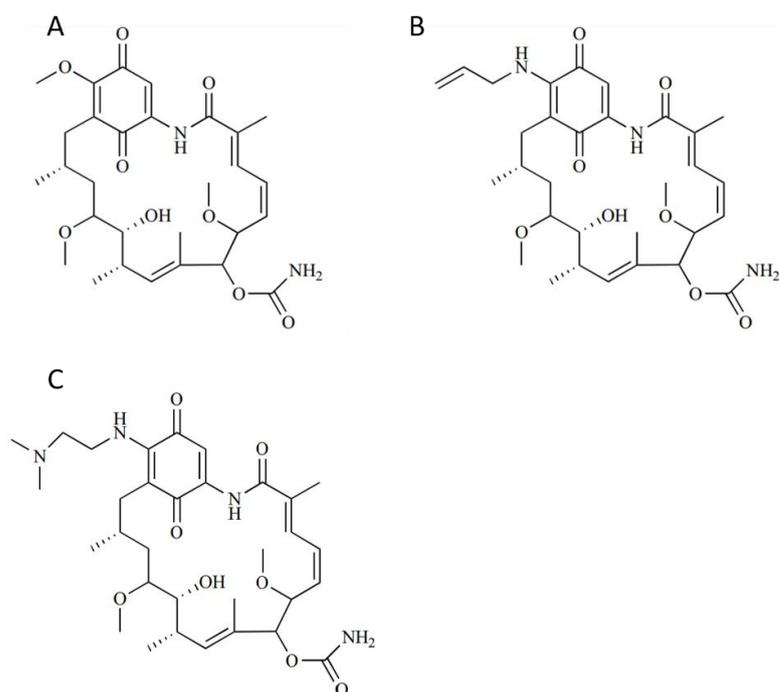


Figura 7- Fórmula química dos inibidores da Hsp90. Dentre os principais inibidores da chaperona HSP90 estão as anzamicinas (A) geldanamicina, (B) 17-AAG e (C) 17-DMAG.

Fonte: Imagem produzida por Cruz, Kércia ([s.d.]).

Dados prévios do nosso laboratório demonstraram que o análogo sintético de GA, o 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG) (Fig. 7B), que se mostrou menos tóxico (SAUSVILLE; TOMASZEWSKI; IVY, 2005), apresenta efeito leishmanicida *in vitro* e *in vivo*. Neste estudo, foi demonstrado que o tratamento de macrófagos infectados com *L. amazonensis* com 17-AAG reduziu drasticamente o percentual de infecção de 93,2% para valores que oscilaram de 66,0 a 3,0%, dependendo da dose e tempo de tratamento (PETERSEN, Antonio Luis de Oliveira Almeida *et al.*, 2012). Em promastigostas, o tratamento com 17-AAG induz autofagia, levando a morte do parasito. (PETERSEN, Antonio Luis de O.A. *et al.*, 2021) No modelo de camundongos BALB/c infectados por via intradérmica por *L. braziliensis*, o tratamento intraperitoneal com 17-AAG demonstrou ser eficiente reduzindo o tamanho da lesão e a carga parasitária no sítio da lesão, no entanto, não foi observada redução da carga parasitária no linfonodo drenante (SANTOS, D. M. *et al.*, 2014). É possível que o tratamento intraperitoneal com 17-AAG não tenha gerado resultados mais pronunciados devido à conhecida baixa propriedade farmacocinética e distribuição tecidual deste agente por não ser hidrossolúvel (EGORIN *et al.*, 1998).

Devido à baixa solubilidade e resultados obtidos com o 17-AAG, resolvemos testar o 17-desmethoxy-17-N,N-dimethylaminoethylamino geldanamycin (17-DMAG) (Fig. 7C), análogo do 17-AAG, que se torna hidrossolúvel devido a adição de um grupo amino ionizável

(JHAVERI *et al.*, 2012), possuindo a mesma capacidade de inibir a Hsp90. Esse composto mostrou eficácia como fármaco anti-protozoários (PALLAVI *et al.*, 2010). Meyer e Shapiro (2013) demonstraram que ratos infectados com *Trypanosoma brucei* apresentaram cura após cinco dias de tratamento com 50 mg/kg/dia de 17-DMAG via oral, em comparação com o grupo controle onde todos os animais vieram a óbito. Em ensaio com *Trypanosoma cruzi*, no modelo com células epiteliais renais extraídas do macaco verde africano (VERO) infectadas, o tratamento com 17-DMAG inibiu o crescimento dos parasitos quando em comparação com o grupo não tratado e com o grupo tratado com o fármaco de referência, benznidazol (MARTINEZ-PEINADO *et al.*, 2021). Guswanto e colaboradores (2018) demonstraram que o tratamento com 17-DMAG, em ensaios *in vitro*, inibe a multiplicação de *Babesia sp* e *Theileria equi*, reduzindo a sobrevivência desses parasitos.

Em estudo não publicado, demonstramos que o tratamento *in vitro* com 17-DMAG em sua forma livre foi capaz de reduzir e até zerar a quantidade de amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* em macrófagos derivados de medula. Em ensaios *in vivo* com camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG livre através de aplicações intraperitoneais foi capaz de inibir o desenvolvimento da lesão, além de reduzir a espessura da orelha infectada, em comparação com a contralateral, a partir de duas semanas de tratamento. Também a partir de duas semanas foi observada a redução da carga parasitária tanto na orelha quanto no linfonodo drenante dos camundongos tratados, em relação aos controles não tratados, chegando a zero a partir de quatro semanas de tratamento. Uma redução das citocinas pró-inflamatórias INF- γ , IL-6 e TNF, mostrando que além do potencial leishmanicida, o 17-DMAG também apresenta efeito anti-inflamatório (dados não publicados). Apesar de ser um composto promissor, a aplicação injetável é invasiva e causa dependência dos pacientes ao sistema de saúde para o qual tem que se deslocar para aplicação do medicamento.

1.5 TRATAMENTO TÓPICO

Formulações tópicas apresentam vantagem em comparação as formulações sistêmicas pois, além de ser um método não invasivo, diminui os efeitos colaterais, é de fácil aplicação, o próprio paciente pode aplicar, é um sistema de entrega de fármaco e apresenta redução de custos (CARNEIRO *et al.*, 2012; GARNIER; CROFT, 2002). Em lesões localizadas de LC, o tratamento tópico se apresenta como uma alternativa vantajosa por não expor o paciente a complicações do tratamento sistêmico, podendo também ser utilizado em associação ao tratamento sistêmico, aumentando sua eficácia e reduzindo os tempos de tratamento e,

consequentemente, sua toxicidade (AZIM *et al.*, 2021; CARNEIRO *et al.*, 2012; CELES *et al.*, 2016). Atualmente, existem diversos estudos de formulações tópicas contra LC em andamento, as principais são a paramomicina, anfotericina B, imiquimode e miltefosina. Apesar dos resultados promissores, estudos com paramomicina ainda apresentam uma variação muito grande devido a sua baixa permeação na pele intactada, fator que é influenciado a depender do veículo utilizado para a aplicação tópica do fármaco (CARNEIRO *et al.*, 2012).

Neste cenário, a membrana de celulose bacteriana (MCB) é um biopolímero e um nanomaterial, devido as suas fibras apresentarem dimensões nanométricas, produzido pela bactéria *Acetobacter xylinum* que produz celulose como parte da sua atividade metabólica (CHENG, *et al.*, 2002; CZAJA, W. K. *et al.*, 2007). Este material vem sendo amplamente utilizado no campo da biotecnologia devido as suas características como i) alta flexibilidade; ii) alta capacidade de retenção de água; iii) compatibilidade com tecidos vivos; iv) permeabilidade a gases e líquidos; v) resistência; vi) atuar como barreira contra infecções (CACICEDO *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA BARUD *et al.*, 2016; SULAEVA *et al.*, 2015). Barud e colaboradores (2013) demonstraram que MCB impregnada com própolis auxilia no tratamento de feridas acelerando a epitalização do tecido danificado. Celes e colaboradores (2016) demonstraram que membranas de CB carregadas com Diethyldithiocarbamate (DETC), reduziram significativamente a taxa de infecção por *L. braziliensis in vitro* e *in vivo*, sendo ainda mais eficaz quando associadas ao tratamento intraperitoneal com antimoniais pentavalentes. Sendo assim, hipotetizamos que o uso de MCB impregnadas com 17-DMAG, para o tratamento da LC, pode aumentar a eficácia do fármaco, reduzindo seus efeitos tóxicos, por ser um sistema de entrega de fármaco com propriedades curativas.

2 JUSTIFICATIVA

A LC é uma doença grave e negligenciada, presente em mais de 90 países e com cerca de um bilhão de pessoas vivendo em áreas endêmicas e com risco de infecção (WHO, 2019). No Brasil, LC é endêmica, com casos registrados em todas as regiões brasileiras com uma incidência média anual de 21 mil novos casos, segundo dados do Ministério da Saúde (2019).

Os tratamentos atuais incluem os antimoniais pentavalentes, porém esses quimioterápicos se mostram ineficientes devido aos longos ciclos de tratamento e aos efeitos colaterais associados (CHAPPUIS et al., 2007). Em conjunto, essas limitações levam ao abandono do tratamento por parte dos pacientes, acarretando no insucesso terapêutico (MENEZES et al., 2015). Desta forma, torna-se importante o desenvolvimento de novos compostos quimioterápicos.

Neste contexto, inibidores da proteína de choque térmico 90 (Hsp90), uma proteína da família das chaperonas, essencial para o ciclo de vida de parasitos protozoários (HOMBACH et al., 2014), vêm ganhando destaque em estudos no controle de infecções parasitárias. O tratamento com 90 nM de GA, cujo alvo proteico é a Hsp90, leva à inibição em 50% do crescimento de *L. donovani*, devido a uma parada do crescimento celular na fase G2 do ciclo do parasito (WIESGIGL & CLOS, 2001). Um outro estudo utilizando GA demonstrou a indução de apoptose de promastigotas de *L. donovani*, de forma tempo e dose dependentes em culturas axênicas incubadas sob condições que mimetizavam o ambiente do vacúolo parasitóforo, 37 °C e pH 5,5 (LI et al., 2009). Esse mesmo trabalho mostrou que, após o tratamento com GA, ocorre um aumento da produção de ROS pelas promastigotas, o que pode levar a uma disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, à morte por apoptose destes parasitos (LI et al., 2009).

Dados prévios do nosso laboratório demonstraram que o análogo sintético de GA, o 17-AAG, se mostrou menos tóxico (SAUSVILLE et al., 2003), apresenta efeito leishmanicida *in vitro* e *in vivo*. Neste estudo, foi demonstrado que o tratamento de macrófagos infectados com *L. amazonensis* com 17-AAG reduziu drasticamente o percentual de infecção de 93,2% para valores que oscilaram de 66,0 a 3,0%, dependendo da dose e tempo de tratamento (PETERSEN et al., 2012). No modelo de camundongos BALB/c infectados via intradérmica por *L. braziliensis*, o tratamento intraperitoneal com 17-AAG demonstrou ser eficiente reduzindo o tamanho da lesão e a carga parasitária no sítio da lesão após tratamento intraperitoneal. Porém, devido à baixa solubilidade do 17-AAG, resolvemos testar um outro inibidor de Hsp90, o 17-DMAG, que é hidrossolúvel, que havia sido apresentado uma significativa capacidade de reduzir

a sobrevivência de diversas espécies de protozoários como *Babesia* e *Theileria equi* em estudos *in vitro* (GUSWANTO et al, 2018).

Em estudo preliminar do nosso laboratório demonstramos que 17-DMAG reduziu lesões causadas pela infecção por *L. braziliensis* em modelo murino de LC, além de reduzir a carga parasitária dose e tempo dependentes, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias, demonstrando assim que o 17-DMAG apresenta alto efeito leishmanicida e anti-inflamatório (dados não publicados). Desta forma, se apresenta como potencial fármaco contra leishmanioses.

O tratamento tópico apresenta vantagens devido à sua via de administração simples e indolor pelo próprio paciente, sem passagem pela circulação sanguínea causando menos toxicidade e sem necessidade de visitas recorrentes ao hospital ou posto de saúde (LAYEGH, et al, 2011). Neste cenário, MCB são um biopolímero que oferecem uma ampla gama de aplicações, especialmente as biomédicas, incluindo o uso de biomaterial para tratamento de feridas e úlceras que vem sendo utilizado como sistema de entrega de medicamento devido sua capacidade de absorção e liberação de fármacos (BARUD, et al; 2016). Celes e colaboradores (2016) demonstraram que MCB carregadas com DETC reduziram significativamente a taxa de infecção por *L. braziliensis in vitro* e *in vivo*, sendo ainda mais eficaz quando associadas ao tratamento intraperitoneal com antimoniais pentavalentes. Uma aplicação tópica se apresenta como uma alternativa mais viável para uma posterior utilização em humanos podendo ser utilizada em associação ao tratamento sistêmico, levando à redução do tempo e da toxicidade dos esquemas terapêuticos em curso. Sendo assim, o uso de MCB impregnadas com 17-DMAG pode aumentar a eficácia do mesmo, reduzindo seus efeitos tóxicos. No presente trabalho, desenvolvemos a formulação tópica de 17-DMAG impregnado em MCB e avaliamos a toxicidade e potencial leishmanicida *in vitro*, bem como a toxicidade *in vivo* do 17-DMAG impregnado em membrana de CB em modelos de LC causada por *L. Braziliensis*.

3 HIPÓTESE

O 17-DMAG impregnado em MCB apresenta efeito leishmanicida e possui baixa toxicidade em modelos *in vitro* e *in vivo* de leishmaniose cutânea.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar o potencial quimioterápico do 17-DMAG impregnado em MCB no tratamento de leishmaniose tegumentar em modelos *in vitro* e *in vivo*.

4.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver e otimizar uma formulação tópica de 17-DMAG, impregnado em MCB;
- Avaliar a toxicidade do 17-DMAG impregnado em MCB em culturas de macrófagos derivados de medula *in vitro*;
- Avaliar o potencial leishmanicida no 17-DMAG impregnado em MCB em culturas axênicas de promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis in vitro*;
- Conduzir estudos de toxicidade *in vivo* com 17-DMAG tópico para validação do fármaco para uso em futuros testes clínicos.

5 METODOLOGIA

5.1 IMPREGNAÇÃO DAS MEMBRANAS

As membranas de celulose bacteriana foram fornecidas pelo Dr. Hernane Barud, coordenador do Laboratório de Biopolímeros e Biomateriais (BioPolMat) da Universidade de Araraquara (UNIARA, SP, BR), elas são disponibilizadas embebidas em álcool 70 °GL, de forma que, antes da utilização, foram realizadas lavagens com água destilada até remoção completa do álcool. A membrana foi então cortada, utilizando um bisturi e uma placa de petri de 3,5 cm de diâmetro como molde, de forma a obter uma membrana circular com área de 9,62 cm². O cálculo para determinar a quantidade de 17-DMAG (LC Laboratories, Massachusetts, USA) a ser utilizado é realizado considerando massa/cm² de membrana, após determinada a massa a ser utilizada, foi realizada a diluição em 500 µl de solução de trealose 5% [D-(+)-Trehalose dihydrat, (SIGMA) diluída em água destilada]. Para a impregnação com diversas concentrações, primeiro foi realizada a diluição da maior concentração e foi então realizada uma diluição seriada para obtenção das concentrações subsequentes. As soluções de 17-DMAG foram colocadas em placa de seis poços e as membranas cortadas foram posicionadas em cima das soluções de forma que toda a área da membrana ficasse em contato com o fármaco, para membranas controle foi realizada a impregnação apenas com solução de trealose 5%. As membranas foram viradas a casa 5 min nos primeiros 20 min, a cada 15 min na primeira hora, a cada 30 min por duas horas e de hora em hora até completar seis horas de impregnação, dessa forma, garantimos a homogeneidade do processo. Após as seis horas de impregnação, as membranas foram transferidas para a parte interna da tampa da placa de petri, cobertas com papel filme, onde fizemos diversos furos com auxílio de uma ponteira de 200 µL. Posteriormente, as membranas, posicionadas na tampa, foram levadas para freezer -80 °C overnight, no dia seguinte foram então colocadas no liofilizador (Labconco FreeZone1) com temperatura -50 °C e pressão 0,050 mbar, por 24 h. Após esse processo, a membrana seca encontrava-se pronta para uso. Para a utilização da membrana a mesma foi novamente cortada, desta vez com o auxílio de punch de biópsia com tamanho diferente a depender do experimento, sendo o de 3 mm para ensaios *in vitro* e 8 mm para ensaios *in vivo*. Este protocolo de impregnação foi otimizado a partir de modificações em relação ao tipo de solvente utilizado para diluir o 17-DMAG (água, ou solução de trealose 5%), e as condições de secagem (estufa ou liofilizador).

5.2 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para avaliação da morfologia e aspecto da superfície, a membrana após impregnada, com o 17-DMAG, ou apenas com o diluente, e seca foi cortada com um *punch* de biópsia de 3 mm, colocadas em *stubs* com auxílio de uma pinça. Posteriormente, as amostras foram revestidas com partículas de ouro usando um revestidor de íons a vácuo. Por fim, as amostras foram analisadas e fotografadas a 15 kV usando o microscópio eletrônico de varredura JSM149 6390LV (JEOL LTD, Japan).

5.3 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DO 17-DMAG A PARTIR DE MCB

Para avaliar a cinética de liberação do 17-DMAG das MCB, cortes feitos com *punch* de 3 mm, em diferentes áreas da membrana, foram colocados em tubos eppendorf com 1 mL de meio RPMI completo e mantidos em agitação rotatória (carrossel) em estufa bacteriológica a 37 °C. Após os tempos de 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h ou 72 h, foi coletado o meio RPMI em que as MCB estavam imersas, e adicionado mais 1 mL de meio novo, mantendo as mesmas MCB no eppendorf. A quantidade de 17-DMAG liberada das membranas no decorrer do tempo de incubação foi mensurada por HPLC (Shimadzu LC20-A), utilizando coluna C18 (150 x 4,6 mm; 3 µm) (Supelco Ascentis). Para o ensaio de liberação, foi necessário a utilização de concentrações maiores do que aquelas utilizadas nos ensaios *in vitro*, devido ao limite de detecção da técnica. Para a construção da curva de calibração, o 17-DMAG foi diluído em água destilada na concentração estoque de 500 µg/mL, seguida de diluições seriadas em fase móvel [270 mL de acetonitrila (Agilent, Santa Clara, CA, USA) grau HPLC; 270 mL de metanol (SIGMA) grau HPLC; 460 mL água milli-Q; 500 µL ácido trifluoracético (SIGMA)], com concentrações variáveis de 50 µg/mL a 1 µg/mL. Posteriormente, 1,5 mL de cada amostra foram colocados nos *vials* para análise e as leituras foram realizadas sob comprimento de onda de 254 nm durante oito minutos por amostra. As concentrações do 17-DMAG nas membranas foram calculadas utilizando o Excel com base na equação da reta construída utilizando concentrações do composto livre.

5.4 ANIMAIS

Camundongos BALB/c fêmeas, com 6-12 semanas, foram fornecidas e mantidas em gaiolas com água e ração comercial balanceada *ad libitum* no biotério do Instituto Gonçalo

Moniz (IGM – Fiocruz). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Utilização de Animais (CEUA 013/2019).

5.5 PARASITOS

Os parasitos da espécie *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) foram mantidos no Laboratório de Interação Parasito Hospedeiro e Epidemiologia (LaIPHE) - IGM - FIOCRUZ-BA. As promastigotas foram mantidas por passagens sucessivas em animais (camundongos – CEUA 009/2018). Antes da utilização em experimentos, os parasitos foram isolados dos linfonodos, através da remoção de forma séptica do linfonodo drenante que, posteriormente, foi macerado em um poço de uma placa de seis poços com meio Schneider completo [Schneider (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado (Gibco®, Carlsbad, CA, USA) e gentamicina (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha)], utilizando o fundo do êmbolo de uma seringa, liberando as células infectadas. Essas células foram então mantidas em meio Schneider completo, em estufa B.O.D. a 24 °C por uma semana, de forma que as amastigotas intracelulares fossem liberadas e se diferenciavam em promastigotas, que, por sua vez, foram mantidas em cultura axênica por, no máximo, sete passagens, em meio Schneider completo, em estufa B.O.D. a 24 °C, o crescimento foi acompanhado diariamente por contagem em câmara de Neubauer e ao atingir a fase estacionária de crescimento (concentração maior que 10⁸ parasitos / ml) foram utilizadas para infecção.

5.6 INFEÇÃO

Para infecção tanto de animais quanto de células, com *L. braziliensis*, após a cultura axênica atingir fase estacionária, a mesma foi transferida para um tubo Falcon de 50 ml, onde foi adicionado salina (NaCl 0,9%) até completar o volume do tubo e, realizada centrifugação diferencial a 125 x G por 5 min, a 4 °C para separação dos parasitos móveis e afilados que permanecem no sobrenadante, que foi transferido para um novo tubo para realização das lavagens com solução salina e centrifugação a 750 x G por 10 min, 4 °C por três vezes. O *pellet* foi então ressuspenso em 1 mL e foi feita homogeneização com seringa de 1 mL e agulha de insulina para separar grumos. Posteriormente, foi realizada contagem em câmara de Neubauer e a suspensão foi então ajustada para concentração desejada em cada experimento. Para manutenção de cepa foram utilizados 5x10⁶ parasitos em 20 µL de solução salina para ser inoculada em uma das patas traseiras de camundongos BALB/c, utilizando seringa de insulina

0,5 mL com agulha 8,0 x 0,30 mm, 30g (PROCARD®, Varginha, MG, Brasil). Na infecção *in vitro* foram utilizadas $1,2 \times 10^8$ promastigotas em 30 mL de meio RPMI completo [RPMI (GIBCO) suplementado com 25 mM de HEPES (SIGMA), 2 g/L de bicarbonato de sódio (SIGMA), 20% de soro bovino fetal inativado (GIBCO), 200 mM de glutamina (SIGMA) e 0,02 mg/mL de ciprofloxacino (Isofarma, Precambura, CE, BR)].

5.7 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA BMMΦ

Para obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMMΦ), inicialmente, camundongos BALB/c foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de tiopental (50 mg/kg) e tiveram os ossos das patas posteriores (fêmur e tíbia) retirados de forma asséptica e mantidos em solução salina estéril gelada contendo 0,01 mg/mL de ciprofloxacino. Em seguida, as extremidades dos ossos foram removidas e a extração das células de medula foi realizada através da lavagem da cavidade óssea com jatos de meio RPMI completo, utilizando seringa de 10 mL conectada a uma agulha de 21g ou 22g. Após esta etapa, as células foram centrifugadas a 300xG, 4 °C, por 10 min, ressuspensas e cultivadas em placas de Petri bacteriológicas descartáveis (3 placas por animal) contendo 10 mL de RPMI completo com 30% de sobrenadante da cultura de célula de linhagem L929, que libera no sobrenadante de cultura GM-CSF, um fator de diferenciação que permite a diferenciação destas células em BMMΦ. Após 24 h, o sobrenadante das placas foi transferido para novas placas, descartando macrófagos residentes presentes na medula, que aderiram à placa. Após 72 h adicionais, mais 5 mL de RPMI completo contendo 30% de sobrenadante de L929 foram adicionados à cultura, reestimulando as células à diferenciação. Ao final de sete dias, obtivemos os macrófagos diferenciados.

Para utilização dos macrófagos diferenciados aderidos às placas utilizadas, inicialmente, o sobrenadante das placas foi removido e, em cada placa, foram adicionados 5 mL de solução EDTA a 1 mM. As placas foram então incubadas em estufa a 37 °C por 5 min e, em seguida, as células aderidas foram retiradas com jatos da mesma solução com EDTA, seguida de três ciclos de centrifugação a 300xG, 10 min, 4 °C. Posteriormente, essas células foram ressuspensas, contadas em câmaras de Neubauer e plaqueadas na concentração de 2×10^5 célula/poço.

5.8 TESTE DE EFICÁCIA DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB SOBRE CULTURA AXÊNICA de *L. BRAZILIENSIS* - IC50

Promastigotas de *Leishmania braziliensis* em fase logarítmica (entre 10^7 e 5×10^7) foram distribuídos, na concentração de 5×10^5 parasitos/poço, em placas de 24 poços com 1 mL de meio Schneider completo por poço. Em cada poço, foi adicionado uma membrana de 3 mm de diâmetro, com concentrações de 17-DMAG variando entre $32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $7,81 \text{ ng}/\text{cm}^2$, em triplicata, além da membrana branca, impregnada apenas com solução de trealose 5% e utilizada como controle negativo, também em triplicata. As placas foram mantidas em estufa B.O.D. a $24 \text{ }^\circ\text{C}$. Após 69 horas de tratamento, foi adicionado 10% de AlamarBlue (Invitrogen, Massachusetts, USA) por poço e, após mais três horas, totalizando 72 horas de tratamento, 600 μL de cada poço foi transferido para três novos poços (200 μL /poço) de uma placa de 96 poços, de acordo com o esquema abaixo, para leitura no SPECTRAmax 340pc® nos comprimentos de onda de 570 e 600 nM.

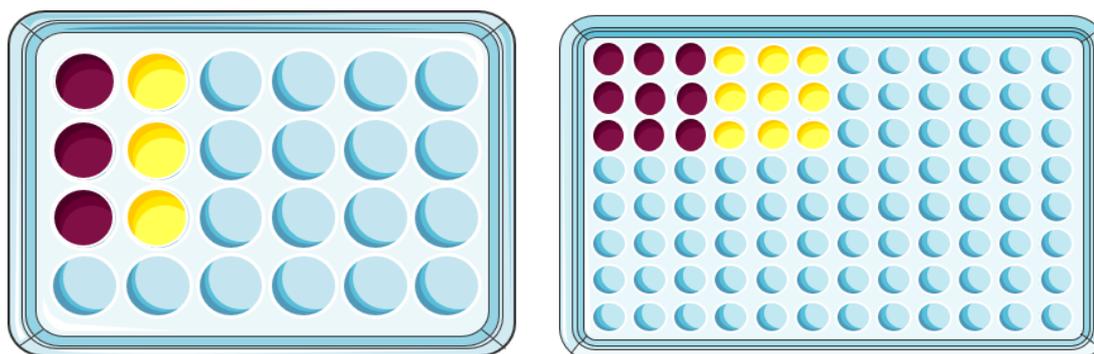


Figura 8 - Representação esquemática da transferência do volume de 600 μL de cada poço de uma placa de 24 poços para 3 novos poços em uma placa de 96 poços para leitura no espectrofotômetro.

Fonte: Elaborado pela autora

5.9 TESTE DE TOXICIDADE DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB SOBRE BMM Φ - CC50

BMM Φ foram distribuídos em placas de 24 poços na concentração de 2×10^5 célula/poço em 1 mL RPMI completo por poço. Após as células aderirem ao fundo do poço foram feitas duas lavagens com solução salina para remoção as células que não aderiram, foi então adicionado 1 mL de RPMI completo e a membrana de 3 mm de diâmetro contendo diferentes concentrações de 17-DMAG variando entre $32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $7,81 \text{ ng}/\text{cm}^2$, e membrana branca, em triplicata. As placas foram mantidas em estufa de célula a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% de CO_2 e 95% de umidade. Após 72 h de tratamento, as placas foram lavadas com solução salina para remoção das

membranas e, posteriormente, 1 mL de RPMI contendo 10% de AlamarBlue foi adicionado aos poços por 24 h adicionais. Por fim, 200 µL de cada poço foi transferido para três novos poços em uma placa de 96 poços (Fig. 8), para leitura no SPECTRAmax 340pc® nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

5.10. TESTE DE EFICÁCIA DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB CONTRA PARASITOS INTRACELULARES DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* EM BMMΦ *IN VITRO*

BMMΦ foram distribuídos em placas de 24 poços na concentração de 2×10^5 célula/poço em 1 mL de meio RPMI completo, após adesão das células ao fundo do poço, foram feitas duas lavagens com solução salina. Paralelamente, promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária foram submetidas a uma lavagem diferencial a 125xG por 5 min, a 4 °C, seguida de três lavagens com solução salina a 750xG, 10 min, 4 °C. As células foram então infectadas por *L. braziliensis* na proporção 10:1 e reincubadas por 24 h em estufa de célula a 37 °C 5% de CO₂ e 95% de umidade, permitindo a internalização dos parasitos. Após as 24 h, os poços foram lavados para remoção dos parasitos não internalizados e, então, foi adicionada MCB de 3 mm de diâmetro impregnada com 17-DMAG por poço em diferentes concentrações entre 500 e 7,81 ng/cm² e membrana branca, em quintuplicada. Após 72 h de tratamento, os poços foram lavados duas vezes com solução salina e, em seguida, foi adicionado 1 mL de Schneider completo por poço. As placas foram então incubadas por 6 dias em estufa B.O.D. a 24 °C, permitindo a diferenciação das amastigotas viáveis nas formas promastigotas do parasito. Por fim, as promastigotas foram contadas, de forma cega e aleatória, em câmaras de Neubauer.

5.11 TESTE DE TOXICIDADE DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB EM CAMUNDONGOS BALB/C

Camundongos BALB/c não infectados foram divididos nos grupos i) tratados com diferentes concentrações de 17-DMAG impregnado em MCB; ii) tratado com membrana branca. Membranas de 8 mm de diâmetro foram coladas na orelha dos camundongos com o auxílio de um curativo filme. Antes do tratamento as orelhas foram molhadas para criar uma superfície úmida de contato da membrana com a derme. Os camundongos foram mantidos com colar elizabetano produzido com chapa de raio x e velcro (Fig. 9) para que não removessem o curativo. Diariamente os colares foram removidos, bem como o curativo com a membrana, para

os camundongos poderem se higienizar. Posteriormente, foi colocada uma nova membrana com o curativo e o colar. A espessura da orelha exposta ao tratamento, comparativamente à contralateral, foi mensurada semanalmente utilizando paquímetro analógico (Köeppen – exatidão $\pm 0,1$ mm). Após um mês de tratamento, os camundongos foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de tiopental (50 mg/kg) e foi removida orelha, baço, fígado e rim para avaliação histológica e observação da presença de toxicidade local e/ou sistêmica.



Figura 9 - Representação do colar elizabetano para camundongos. O colar foi feito com chapa de raio x, velcro nas extremidades para facilitar colocar e tirar dos camundongos e cola quente na abertura interna para não ferir o pescoço dos animais.

Fonte: Imagem produzida por Cruz, Kercia ([s.d.]

5.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a remoção, os tecidos extraídos dos animais foram incubados por 48 h em solução de formalina ácida (5% de ácido acético glacial (SIGMA), 10% de formaldeído (SIGMA) e 85% de etanol absoluto (NEON, Suzano, SP, BR), que permite a fixação e manutenção da integridade do tecido. Em seguida, a formalina ácida foi substituída por álcool 70% e as amostras foram enviadas para a Plataforma de Histotecnologia do IGM, onde, as amostras foram banhadas em álcool 70%, álcool 90%, álcool absoluto, Xilol e parafina, respectivamente, em seguida foram emblocadas em parafina. Após o emblocamento, os tecidos foram cortados com um micrótomos e, com finos e uniformes, de espessura entre 3 e 4 μ m, foram corados com hematoxilina e eosina (coloração HE), seguindo o protocolo da Plataforma. As análises histopatológicas da orelha foram realizadas sob a supervisão de Dr. Washington Luis Conrado dos Santos, patologista colaborador do projeto que avaliou a intensidade da inflamação, características morfológicas e tipos celulares presentes no tecido. As alterações foram avaliadas semi-quantitativamente por meio da atribuição de valores que variaram de 1 a 5, de acordo com

a intensidade das alterações ou presença/ausência.

5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em valores numéricos absolutos e representam uma média de no mínimo três experimentos realizados de forma independente. Realizamos teste de normalidade (Kolmogorov Smirnov) através do software GraphPad Prism 8 que determinou o uso de teste paramétrico (teste *t* de Student, ANOVA seguida pelo pós-teste de Comparação Múltipla de Dunnett ou pós-teste para tendência linear, ou não paramétrico (Mann Whitney). O valor crítico para significância dos resultados foi estabelecido para $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 IMPREGNAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA

Nesta primeira etapa do estudo, padronizamos o protocolo de impregnação das MCB. Segundo informações do fabricante, a mesma deveria ser cortada no tamanho desejado, pressionada em papel absorvente, para remoção do excesso de água, posicionada em cima da solução para impregnação em uma placa de Petri de 10 cm de diâmetro e, posteriormente, seca em estufa até no máximo 30 °C. Ao seguir esse protocolo, observamos que o líquido não se distribuía de forma homogênea, refletindo numa impregnação não uniforme. Para solucionar esta limitação, utilizamos, como molde para as membranas, placas de Petri de 3,5 cm de diâmetro (Fig. 10). Assim, as membranas foram cortadas e, em seguida, impregnadas em placas da mesma dimensão das membranas, de forma que toda a superfície da membrana permaneceu em contato com o fundo da placa e, conseqüentemente, com a solução a ser impregnado.

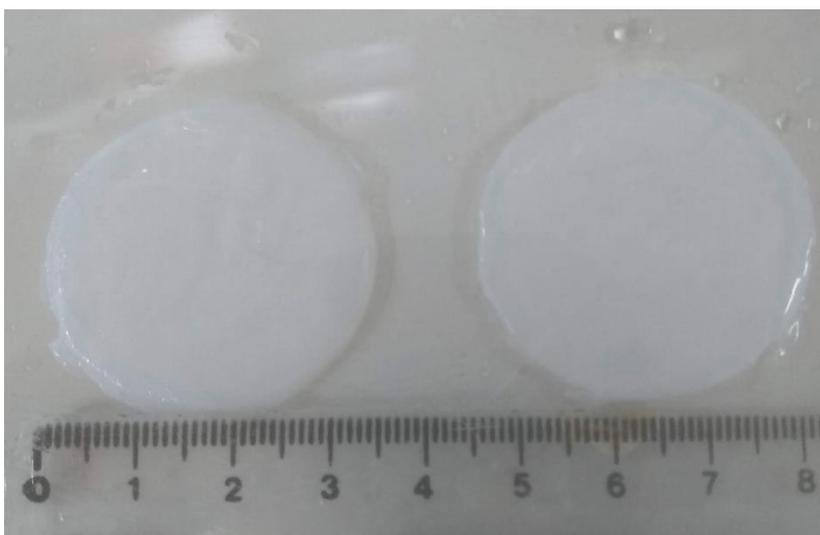


Figura 10 - Membranas de celulose bacteriana cortadas com bisturi utilizando placa de petri descartável de diâmetro de 3,5 cm como molde.

Fonte: Elaborado pela autora.

As primeiras impregnações foram realizadas utilizando água como solvente do 17-DMAG e a secagem em estufa. No entanto, o tempo de secagem era irregular, cada membrana secava em um tempo diferente e, após a secagem, as membranas enrugavam (Fig 11). Realizamos, então, a impregnação utilizando solução de trealose 5% como solvente do 17-DMAG, ao invés da água, seguida de secagem em estufa 30 °C *overnight* ou no liofilizador com temperatura -50 °C e pressão 0,050 mbar por 24 horas.



Figura 11- Membranas impregnadas com água e secas na estufa a 30 °C overnight.
Fonte: Elaborado pela autora

Após os testes com os solventes (água ou solução de trealose 5%) e diferentes condições de secagem (estufa ou liofilizador), foram realizadas análises em microscopia eletrônica de varredura para caracterização da estrutura de superfície das membranas. Observamos que a impregnação utilizando solução de trealose 5% (Fig. 12 A e B), deixou a superfície da membrana mais homogênea e plana quando comparada com a impregnação utilizando água (Fig. 12 C e D). A utilização de MCB enrugada pode prejudicar a distribuição do composto e altera a área de superfície. Conseqüentemente, a quantidade de composto também, já que a mesma é calculada por cm^2 de membrana. A impregnação com o 17-DMAG dissolvido em solução de trealose 5%, contornou esta limitação em comparação a impregnação com água apenas. Após cada lote de impregnação eram realizados ensaios de eficácia e toxicidade *in vitro* para avaliar a reprodutibilidade da impregnação e se a mesma ocorria de forma homogênea. Esta avaliação, mostrou que não foram encontradas diferenças significativas entre os ensaios utilizando diferentes lotes, mostrando que o protocolo é reprodutível e a impregnação estava ocorrendo de forma homogênea.

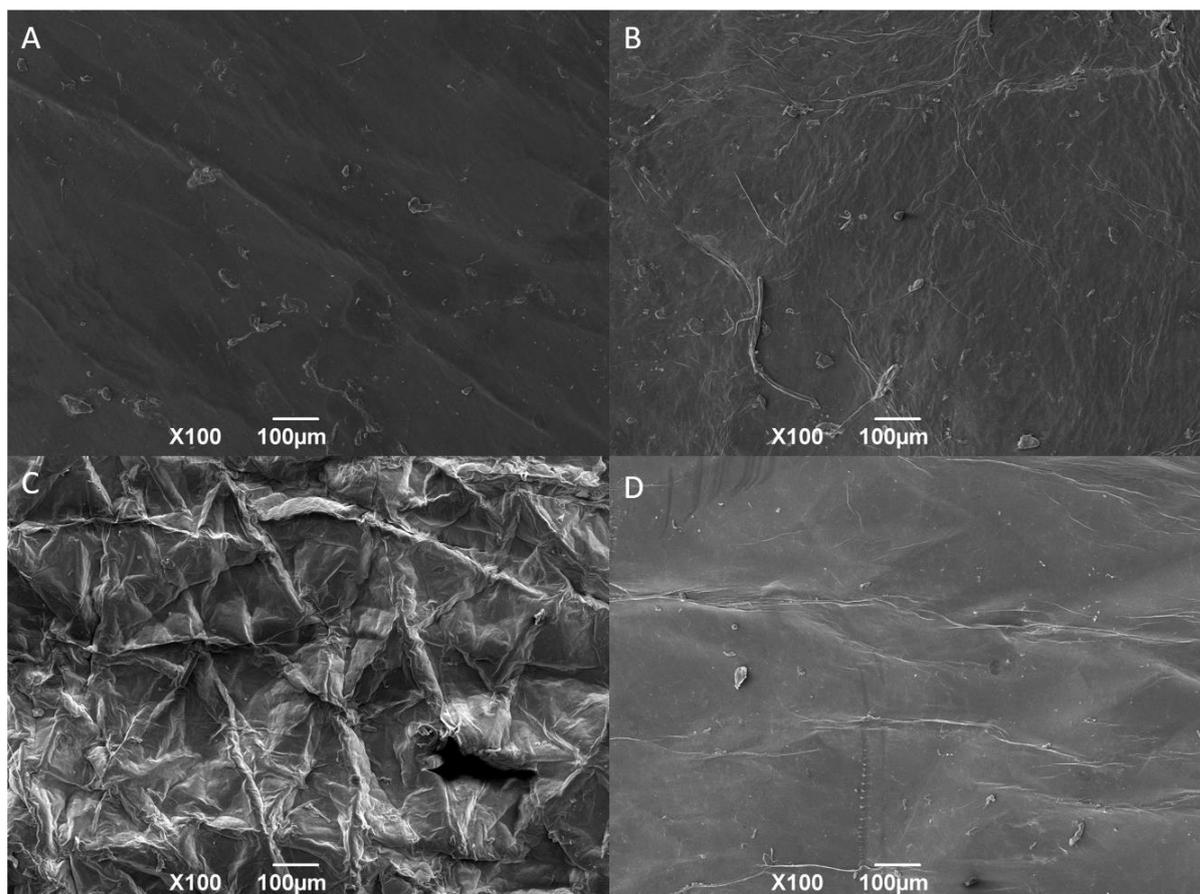


Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de MCB, impregnadas com solução de trealose 5% (A, B) ou água (C, D) e secas em estufa a 30 °C overnight (A, C) ou em liofilizador a -50 °C e pressão 0,050 mbar por 24 horas (B, D).

Fonte: Elaborado pela autora

6.2 ENSAIO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

Para este ensaio utilizamos a membrana no mesmo tamanho dos ensaios *in vitro* ($A = 0,07$), porém nas concentrações de 622, 311 e 155 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ devido ao limite de detecção do HPLC. Os resultados mostraram que, em 1 h, 86% do 17-DMAG na concentração de 622 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ foi liberado da membrana, 85% na concentração de 311 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e 100% na concentração de 155 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ foram liberados das MCB (Fig. 13). A partir de 3 horas, MCB impregnadas com as três concentrações do 17-DMAG liberaram 100% do composto. Esse dado mostra uma liberação relativamente rápida e reforça que o protocolo de impregnação é eficaz, tendo tido o aproveitamento de 100% do 17-DMAG no processo de impregnação.

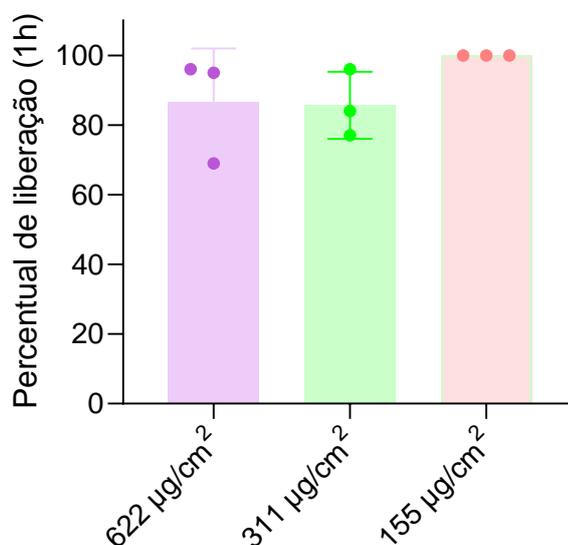


Figura 13 - Percentual de liberação do 17-DMAG impregnado em MCB no tempo de 1 hora

Fonte: Elaborado pela autora

6.3 TESTE DE TOXICIDADE DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB SOBRE BMMΦ

Ensaio anteriores no nosso laboratório mostraram que a concentração do 17-DMAG na forma livre capaz de causar citotoxicidade em 50% da cultura de (CC₅₀) é de 3,2 µM. Desta forma, iniciamos o tratamento com MCB impregnadas com concentração inicial de 32 µg/cm² seguida de 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 µg/cm². Todas essas concentrações apresentaram elevada citotoxicidade. Por questão de comparação, calculamos a massa de 17-DMAG na área do punch (A = 0,07 cm²) utilizado no corte da membrana para uso *in vitro*, possibilitando calcular a concentração molar (Tabela 1), do fármaco em 1 mL de meio (valor utilizado por poço no ensaio). Como a concentração molar depende do volume utilizado no poço, utilizamos a placa de 24 poços ao invés da placa de 96 poços, pois, o ensaio de viabilidade intracelular, é realizado em placas de 24 poços. Evitando, então, a realização de ensaios em que teríamos liberação do composto em volume menor de 200 µl nos poços de placas de 96, portanto, 5 vezes mais concentrado do que no volume de 1000 µl nas placas de 24 poços.

Tabela 1 - Relação entre a massa de 17-DMAG utilizada na impregnação da MCB e a concentração molar nos ensaios *in vitro* com massa inicial de 32 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em membranas de 0,07 cm^2 em um poço com 1000 μl de meio:

17-DMAG em toda membrana ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	17-DMAG em membrana cortada (μg)	Concentração (nM)
32	2,26	3462,82
16	1,13	1731,41
8	0,56	865,70
4	0,28	432,85
2	0,14	216,43
1	0,07	108,21
0,5	0,035	54,11
0,25	0,0176	27,05

Fonte: Elaborado pela autora

Com este resultado, observamos que, enquanto 3,2 μM de 17-DMAG livre reduziu em 50% a viabilidade das células, concentrações muito mais baixas do fármaco impregnado na MCB reduziram 100% da viabilidade das células, de forma que não foi possível calcular o CC_{50} . Assim, resolvemos reduzir as concentrações utilizadas, iniciando por 4000 ng/cm^2 , seguida de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63 e 7,81 ng/cm^2 (Tabela 2).

Tabela 2 - Relação entre a massa de 17-DMAG utilizada na impregnação da MCB e a concentração molar nos ensaios *in vitro* com massa inicial de 4000 ng/cm² em membranas de 0,07 cm² em um poço com 1000 µl de meio:

17-DMAG em toda membrana (µg/cm²)	17-DMAG em membrana cortada (µg)	Concentração (nM)
4000	282,74	432,85
2000	141,37	216,43
1000	70,68	108,21
500,00	35,34	54,11
250,00	17,67	27,05
125,00	8,84	13,53
62,50	4,42	6,76
31,25	2,21	3,38
15,63	1,10	1,69
7,81	0,55	0,84

Fonte: Elaborado pela autora

Neste segundo ensaio, observamos que incubando os macrófagos com MCB impregnadas nas concentrações de 4000, 2000 e 1000 ng/cm², o fármaco causou morte de 100% das células. MCB impregnadas com concentrações a partir de 500 ng/cm², mostraram menor toxicidade, demonstrando CC₅₀ de 30,76 ± 1,29 nM (Fig. 14), quase 100 vezes menor do que aquele identificado com o 17-DMAG em sua forma livre. Esse resultado, demonstra que a impregnação do 17-DMAG em MCB aumentaram, *in vitro*, sua toxicidade em comparação ao composto solúvel.

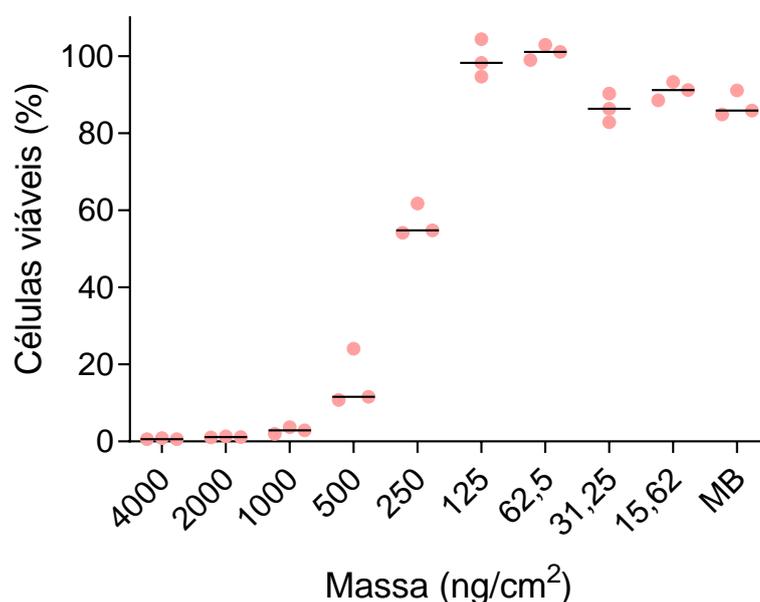


Figura 14 - Teste de toxicidade do 17-DMAG impregnado em MCB sobre BMM ϕ - CC50. BMM ϕ foram plaqueados na concentração de 5×10^5 célula por poço, em placa de 24 poços, incubadas com MCB impregnadas com diferentes concentrações de 17-DMAG em 1000 μ l de meio RPMI. Após 72 horas de incubação, as placas foram lavadas com solução salina, foi adicionado 1000 μ l de RPMI contendo 10% de Alamar Blue e, novamente, foram incubadas por mais 24 horas. Finalmente, 600 μ l de cada poço foram transferidos para 3 novos poços (200 μ l/poço) em uma placa de 96 poços para leitura em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

Fonte: Elaborado pela autora

6.4 TESTE DE EFICÁCIA DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB SOBRE CULTURA AXÊNICA DE *L. BRAZILIENSIS*

Utilizando as mesmas concentrações que nos permitiram calcular o CC₅₀, avaliamos a eficácia do 17-DMAG impregnado em MCB sobre culturas axênicas de *L. braziliensis* (IC₅₀). Anteriormente, ensaios mostraram que o IC₅₀ para o 17-DMAG livre é de 700 nM e, neste ensaio, observamos um IC₅₀ de $159,9 \pm 49,6$ nM (Fig.15), valor mais de 4 vezes menor do que o 17-DMAG livre, de forma que é preciso menos composto para obter o mesmo valor de inibição. Esse resultado foi maior do que o observado para o CC₅₀, de 30,76 nM, mostrando que, o 17-DMAG impregnado é mais tóxico para a célula do que para a *Leishmania*. Esta toxicidade não é dependente da membrana, pois as MCB brancas não causaram qualquer toxicidade para as BMM ϕ (Figura 14).

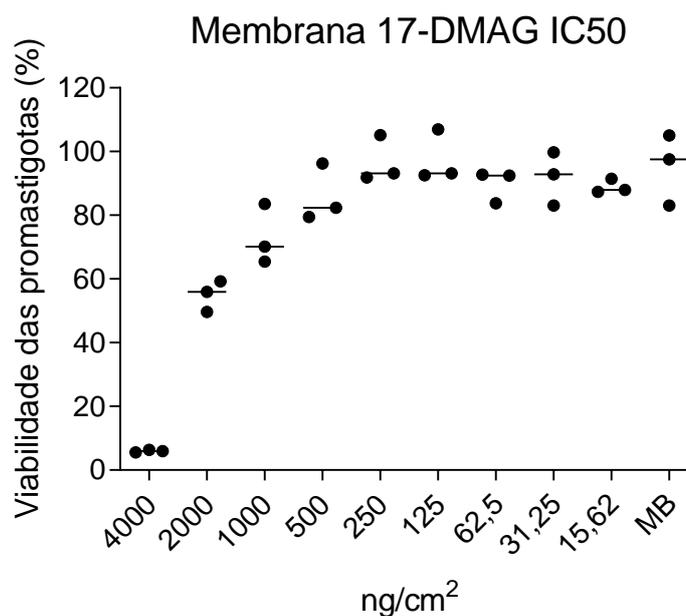


Figura 15 - Teste de eficácia do 17-DMAG impregnado em MCB sobre culturas axênicas de *L. braziliensis*. Parasitos de *L. braziliensis* foram plaqueados em placas de 24 poços na concentração de 5×10^5 parasitos/poço e incubados com MCB em diferentes concentrações de 17-DMAG em 1000 μ l de Schneider completo. Após 69 horas de incubação, foi adicionado AlamarBlue na diluição de 10% por 3 horas, totalizando 72 horas de tratamento. Por fim, 600 μ l de cada poço foi transferido para 3 novos poços (200 μ l/poço) em uma placa de 96 poços para leitura em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

Fonte: Elaborado pela autora

6.5 TESTE DE EFICÁCIA DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB CONTRA PARASITOS INTRACELULARES DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* EM BMM Φ *IN VITRO*

Como nós observamos que as concentrações de até 500 μ g/cm² eram tóxicas para as células, começamos este ensaio a partir de 250 μ g/cm². Não foram identificadas diferenças entre os grupos (Fig.16), de forma que não foi possível calcular o valor do IC₅₀ dos parasitos intracelulares e, conseqüentemente, do índice de seletividade, e, apesar da membrana branca não ter sido tóxica nos ensaios de CC₅₀ e IC₅₀, foi observada uma redução da viabilidade das amastigotas intracelulares tratadas com membrana branca

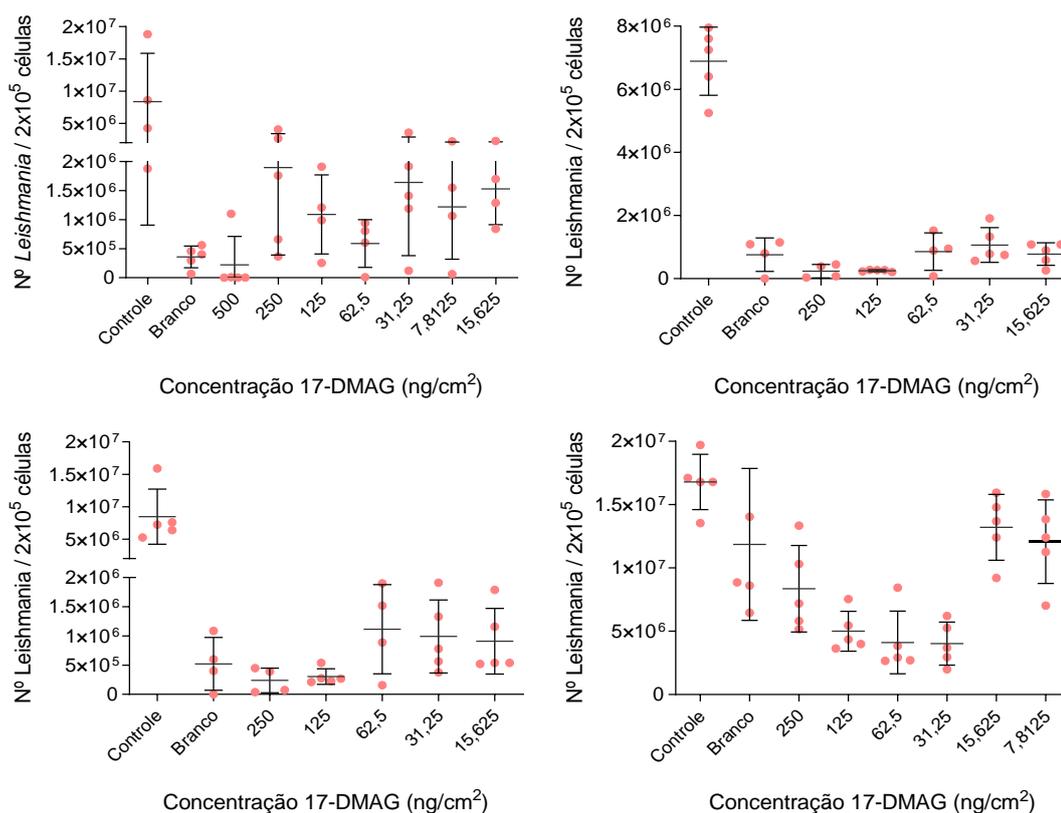


Figura 16 - Teste de eficácia do 17-DMAG impregnado em MCB sobre amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. BMM Φ foram plaqueados na concentração de 5×10^5 célula por poço, em placa de 24 poços, após quatro horas de impregnação foi realizada a lavagem da placa e posteriormente realizada infecção com parasitos de *L. braziliensis* em fase estacionária na proporção 10:1. Após 24 horas de infecção foi realizada lavagem da placa e adicionado o tratamento. Após 72 horas de tratamento, foi realizada nova lavagem e troca de meio RPMI por Schneider, por fim, passados 6 dias foi realizada contagem, através de câmara de Neubauer, dos parasitos viáveis. Cada gráfico representa uma repetição do mesmo experimento.

Fonte: Elaborado pela autora

6.6 TESTE DE TOXICIDADE DO 17-DMAG IMPREGNADO EM MCB EM CAMUNDONGOS BALB/C

Para o ensaio de toxicidade *in vivo* utilizamos as MCB impregnadas com 311,0, 155,0, 4,0 e 2,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, as primeiras, utilizadas inicialmente no ensaio de liberação, e as últimas, utilizadas nos ensaios *in vitro* de toxicidade e eficácia. A área da membrana foi superior ($A = 0,2 \text{ cm}^2$) aquela utilizada nos ensaios *in vitro*, para que possa cobrir a lesão causada pelo parasito em ensaios futuros de eficácia *in vivo*. Observamos que, seguindo a exposição da membrana à pele da orelha do camundongo, a liberação do composto ocorreu apenas em peles umedecidas. Esta liberação do 17-DMAG, provavelmente, não ocorreu em peles não umedecidas, pois as membranas impregnadas permaneceram de cor arroxeadada (Fig 17 A), característica da coloração do composto. Por outro lado, em peles umedecidas, a membrana perdeu a tonalidade

roxa (Fig 17 B).



Figura 17- Membranas impregnadas com 17-DMAG em solução de trealose 5%, secas em liofilizador, cortadas com punch de biópsia de 8 mm. Posteriormente, as membranas foram aplicadas na orelha de camundongos BALB/c com auxílio de curativo filme. (A) membrana aplicada com a orelha seca. (B) membrana aplicada com a orelha molhada.

Fonte: Elaborado pela autora

Com uma semana de tratamento os grupos de 311 e 155 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ começaram a aparecer sinais de toxicidade, apresentando vermelhidão na orelha e secreção. Após duas semanas de exposição, os sinais de toxicidade agravaram nestes dois grupos, sendo que a orelha apresentou sinais de inflamação, formando um cascão (Fig. 18 A e B). Assim definimos interromper o tratamento com as MCB impregnadas com as doses mais elevadas. Os grupos de 4 e 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ não apresentaram alteração na primeira semana, mas na segunda semana apresentaram discreta vermelhidão local e secreção (Fig. 18 C e D).



Figura 18- Camundongos BALB/c tratados diariamente por duas semanas com MCB impregnadas com 311 (A), 155 (B), 4 (C), 2 μg (D) de 17-DMAG por cm^2 , ou membrana branca (E). As membranas eram coladas com curativo filme.

Fonte: Elaborado pela autora

Além do aspecto macroscópico da orelha, retiramos tecido para observar os efeitos da toxicidade local e para avaliar a presença de toxicidade sistêmica em baço, fígado e rim. A análise histológica da orelha mostrou que os animais dos grupos 311 e 155 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Fig. 19 A – F) apresentaram ulceração, com processo inflamatório intenso com predomínio de células polimorfonucleares, edema e formação de crosta. Apenas um animal do grupo 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Fig. 19 I) apresentou um discreto infiltrado inflamatório com presença de polimorfonucleares, todos os outros animais grupo (Fig. 19 G, H) e do grupo 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Fig. 19 J, K, L) não apresentaram alterações histológicas em comparação aos controles (Fig. 19 M, N, O).

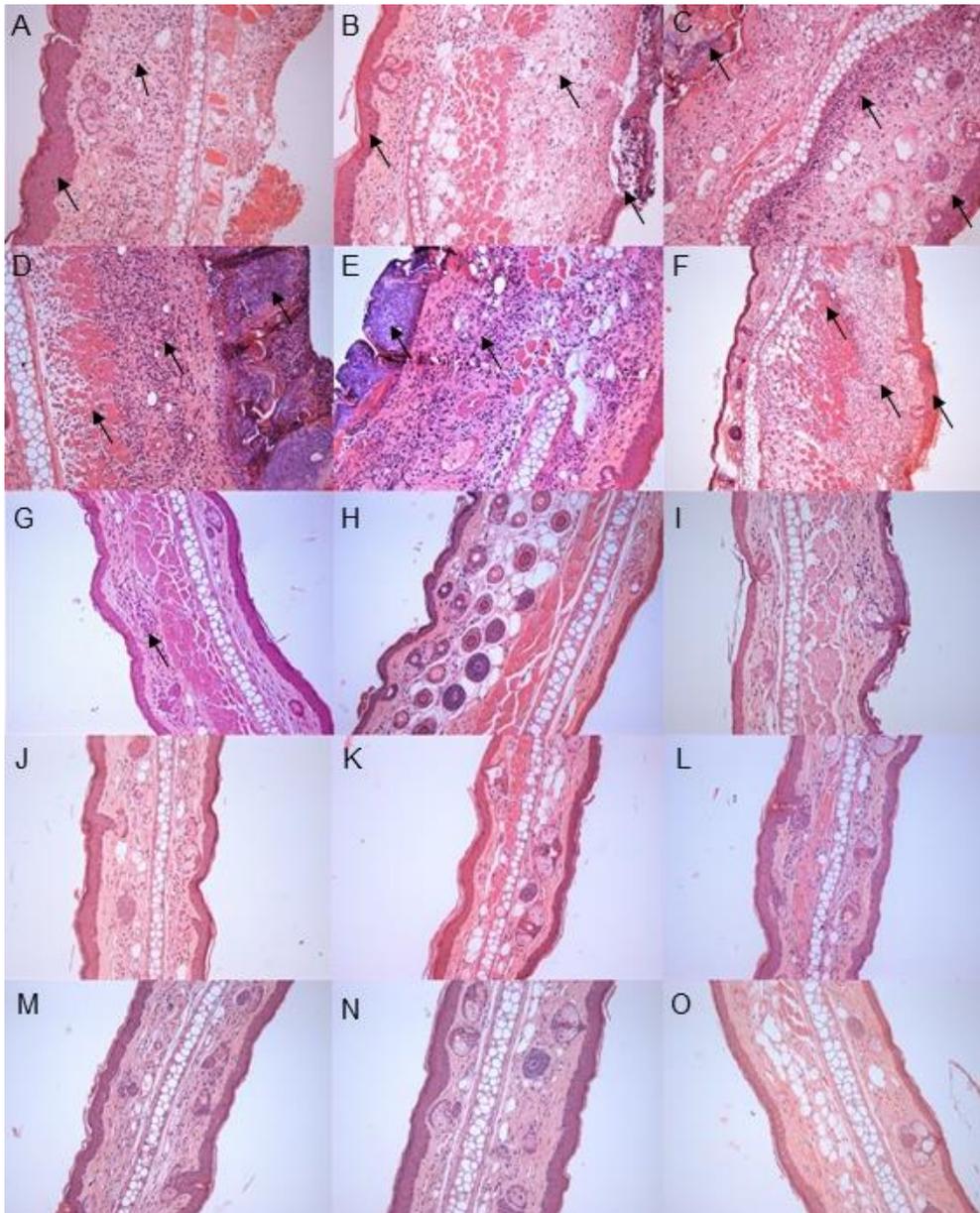


Figura 19 - Cortes histológicas da orelha de camundongos BALB/c tratados com MCB impregnada ou não com 17-DMAG. Após 2 semanas de tratamento os animais foram eutanasiados e tiveram orelha retirada, e mantida em formalina ácida por 48 horas, posteriormente em álcool 70% até o processamento pela plataforma de microscopia. (A, B, C) animais tratados com MCB impregnada com 311 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de 17-DMAG, apresentam processo inflamatório agudo intenso com predomínio de neutrófilos, presença de edema e formação de crosta. (D, E, F) animais tratados com MCB impregnada com 255 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de 17-DMAG, apresentam ulceração, inflamação moderada com predomínio de neutrófilos e formação de crosta. (G, H, I) animais tratados com MCB impregnada com 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de 17-DMAG, G e H apresentam leve infiltrado inflamatório e H apresenta aspecto normal. (J, K, L) animais tratados com MCB impregnada com 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de 17-DMAG, apresentam aspecto normal. (M, N, O) Animais tratados com MCB branca, sem fármaco, apresentam aspecto normal. Imagens obtidas com aumento de 20X.

Fonte: Elaborado pela autora

Em nenhuma das concentrações testadas, foram observadas alterações histopatológicas em algum dos órgãos analisados. O baço, fígado e rim dos animais tratados mantiveram aspecto normal em comparação ao grupo controle.

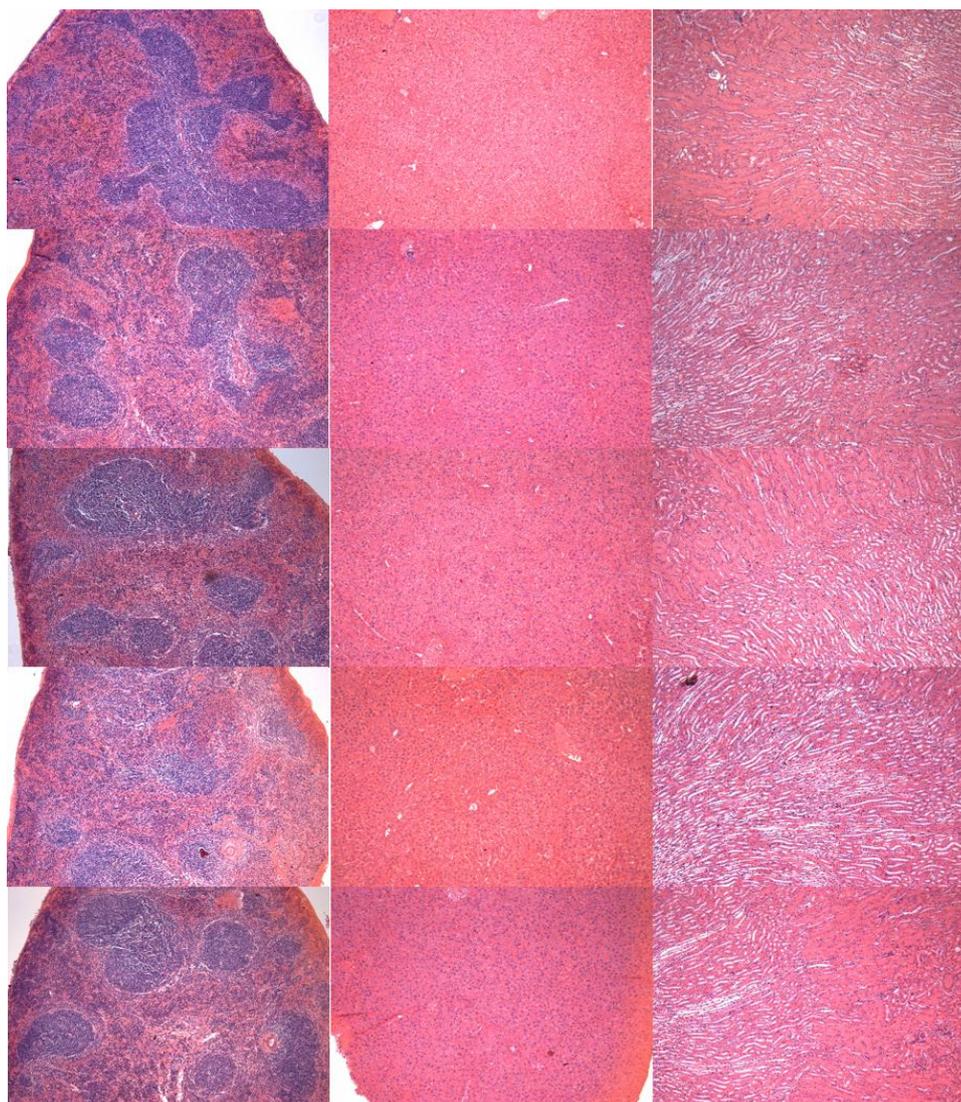


Figura 20 - Cortes histológicas de baço, fígado e rim de camundongos BALB/c tratados MCB impregnada com 311 (A, B, C), 155 (D, E, F), 4 (G, H, I), 2 μg (J, K, L) de 17-DMAG por cm^2 ou membrana branca (M, N, O) Após 2 semanas de tratamento os animais foram eutanasiados e tiveram baço, fígado e rim retirados, e mantidos em formalina ácida por 48 h, posteriormente, em álcool 70% até o processamento pela plataforma de microscopia. Imagens obtidas com aumento de 10X.

Fonte: Elaborado pela autora

Devido aos efeitos tóxicos locais observados, realizamos um novo ensaio com concentrações menores de 1.000, 500, 250 e 125 ng/cm^2 . O tratamento foi realizado durante 4 semanas e não foram observadas alterações em nenhum dos grupos submetidos ao tratamento com as diferentes doses em comparação ao controle (Fig. 21).

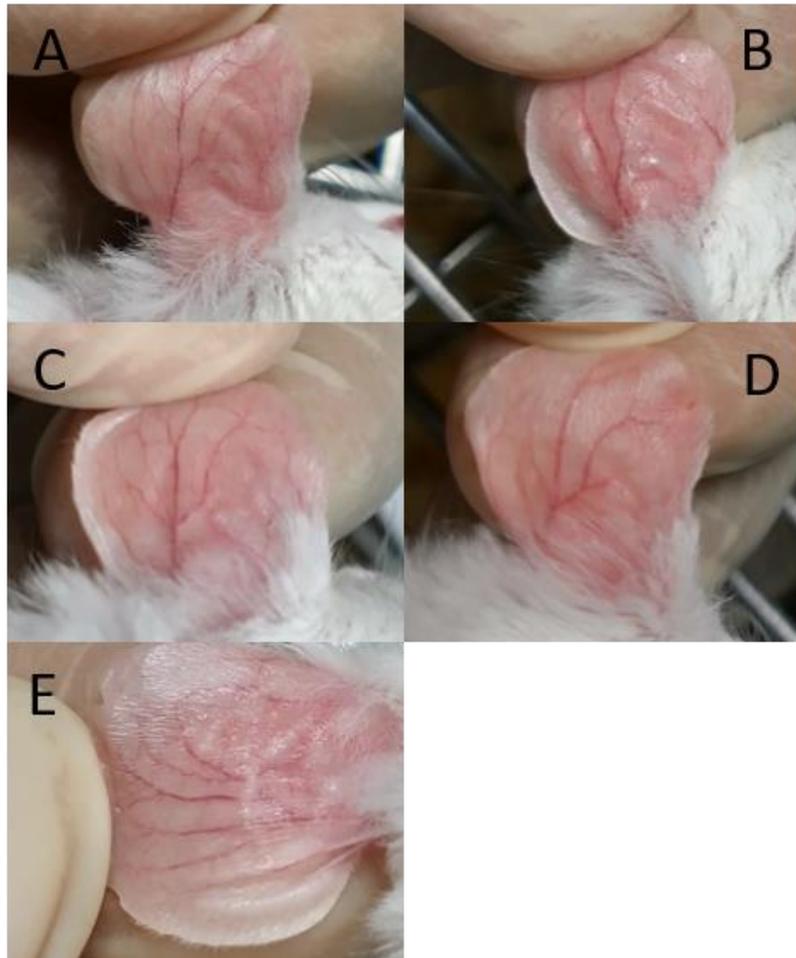


Figura 21 - Imagem macroscópica da orelha de camundongos BALB/c tratados diariamente durante quatro semanas com MCB impregnadas com 1000 (A), 500 (B), 250 (C), 125 ng (D) de 17-DMAG por cm^2 , ou com membrana branca (E). As membranas foram coladas com curativo filme e foi utilizado colar elizabetano para que os camundongos não retirassem a membrana durante o tratamento.

Fonte: Elaborado pela autora

7 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi padronizado o protocolo de impregnação do 17-DMAG em MCB, processo que ocorreu de forma homogênea e reprodutiva. Após a padronização, avaliamos a toxicidade do fármaco impregnado em MCB em cultura de BMM Φ e encontramos um CC₅₀ de $30,76 \pm 1,29$ nM. Na avaliação da toxicidade sobre culturas de promastigotas axênicas de *L. braziliensis*, encontramos um IC₅₀ de $159,9 \pm 49,6$ nM. Devido ao valor de IC₅₀ ser menor do que o do CC₅₀, não foi possível identificar o IC₅₀ para amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e calcular o índice de seletividade. Nos ensaios *in vivo*, as concentrações de 311 e 155 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ apresentaram toxicidade local após duas semanas de tratamento. Na análise histológica, foi possível observar infiltrado inflamatório extenso, edema e formação de crosta, porém não foi observada toxicidade sistêmica. Nos grupos tratados com concentrações entre 1.000 e 125 ng/cm^2 não foi observada toxicidade local mesmo após quatro semana de tratamento.

Devido as características e aplicações biomédicas, existe um grande interesse no uso das MCB, de forma que existem diversos trabalhos com fármacos impregnados, porém a forma de impregnação e secagem varia de acordo com o estudo. Trovatti e colaboradores (2012) imergiram a membrana em solução com o fármaco de interesse e agitaram com 100 rpm a 30 °C durante uma hora, transferidas para uma placa de Petri e, posteriormente, foram secas em estufa ventilada a 50 °C durante 16 h. Celes e colaboradores (2016) aplicaram a solução de interesse nas membranas, incubaram por 2 h, seguida de secagem em estufa ventilada a 37 °C durante 24 h. Em outro estudo, Barud e colaboradores (2013) imergiram a membrana na solução de impregnação durante 24 h, seguida de secagem a 40° °C durante 24 h. Apesar nas variações de protocolos, nenhum dos estudos relatou que a secagem promove o enrugamento das membranas. No entanto, os processos de secagem descritos utilizaram estufa ventilada (BARUD *et al.*, 2013; CELES *et al.*, 2016; SILVA, N. H. C. S. *et al.*, 2014; TROVATTI *et al.*, 2012). No presente estudo, a estufa utilizada para secagem não apresenta ventilação, o que nos permite sugerir que a ausência da ventilação pode ter contribuído para enrugamento das MCB. Similar aos estudos anteriores, nesse trabalho a secagem no liofilizador manteve a estrutura das MBC organizadas, como podemos verificar na imagem em microscopia eletrônica de varredura (Fig. 12).

Além de ser um sistema de entrega de fármaco, devido a sua aplicação diretamente sobre a pele, pode ser adicionalmente considerado um sistema de liberação controlada, visto que o

fármaco pode ser liberado de forma progressiva. No nosso ensaio de liberação, foi observada uma liberação rápida e não progressiva, tendo, o 17-DMAG, sido quase que totalmente liberado no tempo de 1 h e totalmente em 3 h após a incubação da MCB impregnada com 17-DMAG em meio aquoso (CACICEDO *et al.*, 2016; SULAEVA *et al.*, 2015), já que o 17-DMAG é um composto solúvel, com alta capacidade leishmanicida quando aplicado sistemicamente por via intraperitoneal (dado não publicado). Outros trabalhos utilizam célula de Franz para realização deste ensaio (TROVATTI *et al.*, 2012), mimetizando a superfície da pele e, conseqüentemente, obtendo uma liberação mais lenta como observamos nos ensaios *in vivo*, onde, 24 h após aplicação da MCB na orelha do animal, a mesma ainda apresentava tonalidade roxa, mostrando a presença do fármaco, tendo sido necessário umedecer o tecido para que o fármaco fosse liberado da membrana. Esse dado sugere que para liberação do 17-DMAG da membrana é necessário um meio aquoso.

Nos ensaios *in vitro*, IC₅₀ e CC₅₀, os valores obtidos (159,9 ± 49,6 nM e 30,76 ± 1,29 nM, respectivamente) foram muito menores do que os observados anteriormente com o 17-DMAG livre (700 nM e 3,2 µM, respectivamente), de forma que podemos utilizar menos fármaco para obter o mesmo efeito, reduzindo o custo do tratamento e diminuindo o tempo de exposição. Porém, não conseguimos calcular o índice de seletividade, pois, apesar da MCB impregnada apenas com solução de trealose 5% não ser tóxica, a formulação com 17-DMAG foi mais tóxica *in vitro* para os BMM $\square\square$ do que para a *Leishmania*, além disso, nesse ensaio, foi observada uma redução da viabilidade das amastigotas intracelulares nos grupos tratados com membrana branca. Uma diferença desses ensaios, quando comparados com os ensaios que realizamos anteriormente com o 17-DMAG livre, é a utilização de placas de 24 poços, enquanto que, previamente, realizamos os ensaios em placas de 96 poços com o 17-DMAG livre. Com isso, temos a mesma concentração do composto, porém o volume de meio, o número de células e de *Leishmania* são distintos nas condições dos dois tipos de ensaios. Em ensaio futuro iremos comparar a toxicidade e eficácia do 17-DMAG *in vitro* utilizando as mesmas condições para os ensaios utilizando 17-DMAG livre e impregnado em MCB.

Na avaliação da toxicidade *in vivo*, observamos que ao colar a MCB com o curativo filme na orelha dos camundongos, os animais retiraram rapidamente as MCB. Dessa forma, passamos a utilizar o colar elizabetano que levou ao aumento do tempo de exposição da pele ao fármaco. É provável, que este aumento do tempo de exposição seja o responsável pelo surgimento da irritação pelo contato direto do 17-DMAG com a pele do animal (FERMENTEK, 2020). Mesmo com a identificação de um intenso processo inflamatório nos animais tratados com as maiores concentrações do 17-DMAG, não foi encontrada toxicidade sistêmica,

corroborando com os dados de que tratamento tópico dificilmente visceraliza e, portanto, apresenta menos efeitos colaterais em comparação aos tratamentos sistêmicos (CARNEIRO *et al.*, 2012; GARNIER; CROFT, 2002). Determinar um tempo de exposição fixo, em que a membrana é colocada sobre a orelha e, posteriormente, retirada depois do tempo definido, pode diminuir a toxicidade local. Em razão do conhecido potencial curativo da MCB para feridas e queimaduras, diminuindo o tempo de cicatrização, o risco de contaminação e o custo do tratamento (BARUD *et al.*, 2013; CZAJA, W. *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA BARUD *et al.*, 2016; SULAEVA *et al.*, 2015), são justificativas para conduzirmos ensaios para avaliar *in vivo* a eficácia do 17-DMAG impregnado nessas membranas em concentrações que não se mostraram tóxicas para o animal.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de apresentar uma toxicidade na aplicação local com doses mais elevadas, o 17-DMAG impregnado em MCB apresentou aumento do efeito leishmanicida em culturas axênicas de *L. braziliensis*. Estes dados, somados aos resultados anteriores com o composto livre, demonstram que, após ajustes de doses, 17-DMAG tem potencial para compor esquema terapêutico contra LC. Estudos estão sendo conduzidos para determinar a eficácia *in vivo* em modelo experimental de LC do 17-DMAG impregnado em MCB em doses que não foram tóxicas para o animal infectado.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, Bruce *et al.* Molecular biology of the cell. *In*: MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL. 5. ed. [S. l.: s. n.], 2010. p. 388–391.

AZIM, Marium *et al.* Therapeutic advances in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: A review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 1–15, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009099>

BARUD, Hernane Da Silva *et al.* Antimicrobial Brazilian propolis (EPP-AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2013, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/703024>

BATES, Paul A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>

BLUM, Johannes *et al.* Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 158–166, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkh058>

BOSE, Suchira *et al.* Chaperone function of Hsp90-associated proteins. **Science**, [s. l.], v. 274, n. 5293, p. 1715–1717, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1715>

BRAY, Patrick G. *et al.* Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: Past, present and future. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 232–239, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00069-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00069-2)

BROWN, Mark A. *et al.* Hsp90-From signal transduction to cell transformation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 363, n. 2, p. 241–246, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.054>

CACICEDO, Maximiliano L. *et al.* Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 213, p. 172–180, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.071>

CARNEIRO, Guilherme *et al.* Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 1083–1097, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.701204>

CARVALHO, E. M. *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 315–325, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(94\)90103-1](https://doi.org/10.1016/0001-706X(94)90103-1)

CELES, Fabiana S. *et al.* DETC-based bacterial cellulose bio-curatives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. iii, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep38330>

CHENG, Hai-Peng *et al.* Cultivation of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 125, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/ba20010066>

CROFT, Simon L.; SUNDAR, Shyam; FAIRLAMB, Alan H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.111-126.2006>

CRUZ, Angela Kaysel *et al.* Current Treatment and Drug Discovery Against. **Tropical Medicine**, [s. l.], p. 178–192, 2009.

CZAJA, Wojciech *et al.* Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. **Biomaterials**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 145–151, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.035>

CZAJA, Wojciech K. *et al.* The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–12, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm060620d>

DE MENEZES, Juliana Perrone Bezerra *et al.* Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, p. 15–18, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/815023>

DE OLIVEIRA BARUD, Héliida Gomes *et al.* A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 153, p. 406–420, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.059>

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>

EGORIN, Merrill J. *et al.* Metabolism of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 330507) by murine and human hepatic preparations. **Cancer Research**, [s. l.], v. 58, n. 11, p. 2385–2396, 1998.

FERMENTEK. **Safety Data Sheet: 17-DMAG HCl**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: https://www.fermentek.com/product/17-dmag-hydrochloride?gclid=Cj0KCQiA7oyNBhDiARIsADtGRZaEgXcS216aYucqkk85q5umsqM2c6zJTnv0477TbaeMGbsnit3W3ewaAoyhEALw_wcB.

FRAGA, Jorge *et al.* Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 238–245, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007>

GARNIER, Tracy; CROFT, Simon L. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Investigational Drugs**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 538–544, 2002.

GRANER, Michael W. **HSP90 and Immune Modulation in Cancer**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. ISSN 0065230X.v. 129 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.10.001>

ISAACS, Jennifer S. *et al.* Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v.

277, n. 33, p. 29936–29944, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M204733200>

JACKSON, Sophie E. Hsp90: Structure and Function. *In*: [S. l.: s. n.], 2012. p. 155–240. Disponível em: https://doi.org/10.1007/128_2012_356

JHAVERI, Komal *et al.* Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1823, n. 3, p. 742–755, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.10.008>

LI, Qiaoli *et al.* Apoptosis caused by Hsp90 inhibitor geldanamycin in *Leishmania donovani* during promastigote-to-amastigote transformation stage. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 105, n. 6, p. 1539–1548, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1582-y>

LINDOSO, Josi; Angelo Lauletta *et al.* Leishmaniasis–HIV coinfection: Current challenges. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, [s. l.], v. 8, p. 147–156, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/HIV.S93789>

LLANOS-CUENTAS, Alejandro *et al.* Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 223–231, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/524042>

MARTINEZ-PEINADO, Nieves *et al.* Anti-trypanosoma cruzi activity of metabolism modifier compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 1–16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22020688>

MEIRA, Camila dos Santos; GEDAMU, Lashitew. Protective or detrimental? Understanding the role of host immunity in leishmaniasis. **Microorganisms**, [s. l.], v. 7, n. 12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120695>

O. ANGEL, Sergio; MATRAJT, Mariana; C. ECHEVERRIA, Pablo. A Review of Recent Patents on the Protozoan Parasite HSP90 as a Drug Target. **Recent Patents on Biotechnology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 2–8, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1872208311307010002>

PALLAVI, Rani *et al.* Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: Biochemical characterization of HSP90 from *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma evansi* and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 285, n. 49, p. 37964–37975, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155317>

PALMA, Luana Carneiro *et al.* A docking-based structural analysis of geldanamycin-derived inhibitor binding to human or *Leishmania* Hsp90. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51239-0>

PALUMBO, Emilio. Current treatment for cutaneous leishmaniasis: A review. **American Journal of Therapeutics**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 178–182, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MJT.0b013e3181822e90>

PEARL, Laurence H.; PRODROMOU, Chrisostomos. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 75, p. 271–294, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142738>

PETERSEN, Antonio Luis de O.A. *et al.* 17-AAG-induced activation of the autophagic

pathway in leishmania is associated with parasite death. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 1–15, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051089>

PETERSEN, Antonio Luis de Oliveira Almeida *et al.* 17-AAG Kills Intracellular Leishmania amazonensis while Reducing Inflammatory Responses in Infected Macrophages. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 1–12, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049496>

ROMERO, G. A.S. *et al.* Comparison of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania (Viannia) braziliensis and L. (V.) guyanensis in Brazil: Clinical findings and diagnostic approach. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 32, n. 9, p. 1304–1312, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/319990>

ROY, Nainita *et al.* Heat shock protein 90 from neglected protozoan parasites. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1823, n. 3, p. 707–711, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.12.003>

SANTOS, Diego M. *et al.* Chemotherapeutic Potential of 17-AAG against Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania (Viannia) braziliensis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003275>

SANTOS, Dilvani O. *et al.* Leishmaniasis treatment - A challenge that remains: A review. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 1–10, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0943-2>

SAUSVILLE, Edward; TOMASZEWSKI, Joseph; IVY, Percy. Clinical Development of 17-Allylamino, 17-Demethoxygeldanamycin. **Current Cancer Drug Targets**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 377–383, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1568009033481831>

SILVA, K. P.; SERAPHIM, T. V.; BORGES, J. C. Structural and functional studies of Leishmania braziliensis Hsp90. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [s. l.], v. 1834, n. 1, p. 351–361, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.08.004>

SILVA, Nuno H.C.S. *et al.* Topical caffeine delivery using biocellulose membranes: A potential innovative system for cellulite treatment. **Cellulose**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 665–674, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0114-1>

SOLIT, David B.; CHIOSIS, Gabriela. Development and application of Hsp90 inhibitors. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 13, n. 1–2, p. 38–43, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.10.007>

STEBBINS, Charles E. *et al.* Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: Targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. **Cell**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 239–250, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80203-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80203-2)

SULAEVA, Irina *et al.* Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 1547–1571, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.009>

SUN, Hongchao *et al.* The heat shock protein 90 of Toxoplasma gondii is essential for invasion

of host cells and tachyzoite growth. **Parasite**, [s. l.], v. 24, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/parasite/2017023>

SUNDAR, Shyam *et al.* Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: Report from the center of the Indian epidemic. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 1104–1107, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/318121>

SUNDAR, Shyam; RAI, Madhukar. Advances in the treatment of leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 593–598, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00001432-200212000-00007>

SUNDAR, Shyam; SINGH, Anup. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, [s. l.], v. 3, n. 3–4, p. 98–109, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2049936116646063>

SUNTER, Jack; GULL, Keith. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, [s. l.], v. 7, n. 9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>

TIUMAN, Tatiana S. *et al.* Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 8, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.03.021>

TROVATTI, Eliane *et al.* Bacterial cellulose membranes applied in topical and transdermal delivery of lidocaine hydrochloride and ibuprofen: In vitro diffusion studies. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 435, n. 1, p. 83–87, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.002>

TURETZ, Meredith L. *et al.* Disseminated leishmaniasis: A new and emerging form of leishmaniasis observed in Northeastern Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 186, n. 12, p. 1829–1834, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/345772>

UZEDA MACHADO, Gustavo; VENTIN PRATES, Fernanda; LIMA MACHADO, Paulo Roberto. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 94, n. 1, p. 09–16, 2019.

VERAS, Patrícia Sampaio Tavares; DE MENEZES, Juliana Perrone Bezerra. Using proteomics to understand how Leishmania parasites survive inside the host and establish infection. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms17081270>

WIESGIGL, Martina; CLOS, Joachim. Heat Shock Protein 90 Homeostasis Controls Stage Differentiation in Leishmania donovani. **Molecular Biology of the Cell**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 3307–3316, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1091/mbc.12.11.3307>