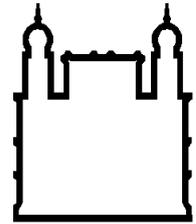




**UFBA**

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



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADOR DE  
COMPOSTOS NATURAIS NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA AMAZONENSIS* E  
*LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

**JÉSSICA REBOUÇAS SILVA**

**Salvador – Bahia**

**2022**

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

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADOR DE  
COMPOSTOS NATURAIS NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA AMAZONENSIS* E  
*LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

**JÉSSICA REBOUÇAS SILVA**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana para obtenção de grau de doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria de Matos Borges

**Salvador – Bahia**

**2022**

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

**S586a** Silva, Jéssica Rebouças

Avaliação do efeito leishmanicida e imunomodulador de compostos naturais na infecção por *leishmania amazonensis* e *leishmania braziliensis*/ Jéssica Rebouças Silva. \_ Salvador, 2022.

156 f.: il.: 30 cm

Orientadora: Profa. Dra. Valéria de Matos Borges

Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. Leishmaniose cutânea. 2. *Leishmania*. 3. Anfotericina B. 4. Própolis. I. Título.

CDU 616.928.5

"AVALIAÇÃO DO EFEITO LEISHMANICIDA DE COMPOSTOS NATURAIS NA INFECÇÃO POR LEISHMANIA SPP".

**Jéssica Rebouças Silva**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

29 de julho de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dra. Flávia Raquel Fernandes do  
Nascimento  
Professora  
UFMA



---

Dra. Tatiana Rodrigues Moura  
Professora  
UFS



---

Dra. Cecília Beatriz Fiuza Favali  
Professora  
UNB



---

Dra. Natália Machado Tavares  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



---

Dra. Valéria de Matos Borges  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Patologia Humana.

À Universidade Federal da Bahia

Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina- UFBA

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Valéria Borges, a qual sou grata por ter tido a oportunidade de estar sob sua orientação durante esses 9 anos de IGM. Obrigada por toda dedicação, atenção e cuidado.

Ao Me. Flávio Henrique por todo o apoio e dedicação na finalização dos ensaios de biologia molecular.

Às Dra. Franciane Marquele, Msc Maraine Tadini e Ana Luíza Mansur, responsáveis pelo desenvolvimento e caracterização dos CLNs e caracterização da iangambina e epi-iangambina, pela confiança e dedicação durante esses 9 anos colaboração.

Às Dra. Andresa Berretta, Nathaly Amorin e Jéssica Lima, responsáveis pelo desenvolvimento e caracterização do extrato e gel EPP-AF<sup>®</sup> e pela caracterização da iangambina e epi-iangambina, por todo empenho e dedicação durante esses 9 anos colaboração.

À Dra. Camila Oliveira, por toda a contribuição nas discussões dos ensaios *in vivo* com *L. braziliensis*.

Ao Me. Paulo Mattos por toda atenção em me ensinar o modelo experimental de infecção de camundongos por *Leishmania* no início do meu mestrado.

Ao Me Valdomiro Moitinho por toda ajuda no ensaio *in vivo* do Cap. I.

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

Ao Dr. Jonilson Lima por toda colaboração e discussões para a realização desse trabalho.

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

À Dayse Lira e Matheus Correa pelo excelente trabalho no apoio técnico do LIB, o qual permitiu a manutenção de um ambiente organizado e favorável ao trabalho.

A todos os pesquisadores integrantes das minhas bancas de qualificação e defesa de doutorado por aceitarem fazer parte dessa jornada e pelas valorosas contribuições.

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

Ao Biotério e às plataformas de citometria e histotecnologia por todo apoio e colaboração para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia (PGPAT) e a todos os membros da secretaria acadêmica por todo suporte.

À Biblioteca do IGM/FIOCRUZ/BA por todo suporte técnico.

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

À minha família e amigos por trilharem esse caminho comigo.

Obrigada!

“Pode ser fácil se você ver o mundo de outro jeito.”

**(Alvin L. / Dinho Ouro Preto)**

SILVA, Jéssica Rebouças. **Avaliação do efeito leishmanicida e imunomodulador de compostos naturais na infecção por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis***. 2022. 156 f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

## RESUMO

A leishmaniose cutânea (LC) é um grave problema de saúde pública. Devido à falta de interesse comercial, o atual arsenal terapêutico é ultrapassado e apresenta sérias limitações. O presente estudo empregou ferramentas nanotecnológicas e explorou a biodiversidade brasileira para avaliar quatro possíveis candidatos à terapia da LC: Carreadores Lipídicos Nanoestruturados contendo Anfotericina B (CLN-AnB), extrato de própolis verde brasileiro padronizado (EPP-AF<sup>®</sup>) e as lignanas iangambina e epi-iangambina em modelos *in vitro* e/ou *in vivo* de infecção por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, ambos agentes etiológicos da LC no Brasil. Para tanto, macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c foram infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* e tratados com os compostos por 48h. Os dados *in vitro* revelaram a rápida absorção de CLN-AnB pelos macrófagos após 1h de tratamento, contribuindo para redução da citotoxicidade e efeito leishmanicida sobre *L. braziliensis* em baixas concentrações, não associado à produção de TNF- $\alpha$  ou óxido nítrico. Macrófagos infectados por *L. amazonensis* e tratados com EPP-AF<sup>®</sup> apresentaram distinta modulação na produção de mediadores pró e anti-inflamatórios, além da ativação da via de sinalização ERK 1/2, apresentando reduzido índice de infecção. Ademais, demonstramos pela primeira vez os efeitos leishmanicida e imunomodulador da iangambina e da epi-iangambina em macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. Nos ensaios *in vivo*, semelhante eficácia foi observada entre os tratamentos CLN-AnB e antimoniato de meglumina em relação à redução de lesões e redução da carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. O tratamento tópico com gel EPP-AF<sup>®</sup> resultou na redução do tamanho da lesão em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, sem possuir efeito na redução da carga parasitária ou na produção de mediadores inflamatórios sistêmico, nos linfonodos ou no sítio de infecção. Em suma, este projeto possui potencial inovador para identificar novos candidatos à terapia de CL, além de aprofundar a busca por compostos bioativos no contexto da biodiversidade brasileira.

**Palavras-chave:** Leishmaniose cutânea. *Leishmania*. Compostos naturais. Anfotericina B. Própolis. Iangambina. Epi-Iangambina. Nanocarreadores.

SILVA, Jéssica Rebouças. **Evaluation of leishmanicidal and immunomodulatory effects of natural compounds on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* Infection.** 2022. 156 f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

### ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a serious public health concern. Due to lacking commercial interest, the current therapeutic arsenal is outdated and presents serious limitations. The present study employed nanotechnological tools and explored the Brazilian biodiversity to evaluate four possible candidates for CL therapy: Nanostructured Lipid Carriers containing Amphotericin B (CLN-AnB), Standardized Brazilian green propolis extract (EPP-AF<sup>®</sup>) and the yangambin and epi-yangambin lignans in *in vitro* and/or *in vivo* models of *L. amazonensis* or *L. braziliensis* infection, both etiological agents of CL in Brazil. For this purpose, macrophages derived from bone marrow of BALB/c mice were infected with *L. amazonensis* or *L. braziliensis* and treated with the compounds for 48h. *In vitro* assays revealed the rapid uptake of CLN-AnB by macrophages after 1h of treatment, contributing to reduced cytotoxicity and a leishmanicidal effect against *L. braziliensis* at low concentrations, in the absence of TNF- $\alpha$  or nitric oxide production. *L. amazonensis*-infected macrophages treated with EPP-AF<sup>®</sup> modulated the production of pro- and anti-inflammatory mediators, in addition to activating the ERK 1/2 signaling pathway, while also reducing infection index. Besides, the leishmanicidal and immunomodulatory effects of yangambin and epi-yangambin were demonstrated for the first time in both *L. amazonensis*- and *L. braziliensis*-infected macrophages. In *in vivo* assays, similar efficacy was observed between the CLN-AnB and meglumine antimoniate treatments with respect to lesion reduction and decreased parasite burden in *L. braziliensis*-infected BALB/c mice. Furthermore, topical treatment with EPP-AF<sup>®</sup> gel resulted in reduced lesion size in *L. amazonensis*-infected BALB/c mice in the absence of reduced parasite load or altered systemic inflammatory mediator production, as well as in the lymph nodes or at the site of infection. In sum, this project possesses the innovative potential to identify novel candidates for CL therapy, in addition to furthering the search for bioactive compounds in the context of Brazilian biodiversity.

**Keywords:** Leishmaniasis cutaneous. *Leishmania*. Natural compounds. Amphotericin B. Propolis. Yangambin. Epi-yangambin. Nanocarriers.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Ciclo de transmissão da Leishmaniose Cutânea.	20
<b>Figura 2</b>	Casos de Leishmaniose Tegumentar por UF – Brasil, 2020	21
<b>Figura 3</b>	Estrutura esquemática dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados	35
<b>Figura 4</b>	Estrutura química das lignanas iangambina e Epi-iangambina	39
<b>Figura 5</b>	Citotoxicidade do extrato de própolis verde EPP-AF <sup>®</sup>	72
<b>Figura 6</b>	Efeito leishmanicida <i>in vitro</i> do extrato de própolis verde EPP-AF <sup>®</sup> na infecção por <i>L. amazonensis</i>	73
<b>Figura 7</b>	Extrato de própolis verde EPP-AF <sup>®</sup> induz expressão de HO-1 em macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i>	76
<b>Figura 8</b>	Tratamento com extrato de própolis verde EPP-AF <sup>®</sup> modula a via das enzimas iNOS e COX-2, sem impacto na via da argina 1	78
<b>Figura 9</b>	Efeito imunomodulador <i>in vitro</i> do extrato de própolis verde EPP-AF <sup>®</sup> .	81
<b>Figura 10</b>	Tratamento com extrato de própolis verde EPP-AF <sup>®</sup> ativa ERK 1/2 em macrófagos	83
<b>Figura 11</b>	Efeito imunomodulador do extrato de própolis verde EPP-AF <sup>®</sup> em macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i>	84
<b>Figura 12</b>	Efeito <i>in vivo</i> do tratamento tópico com gel de própolis verde EPP-AF <sup>®</sup> na infecção por <i>L. amazonensis</i>	86
<b>Figura 13</b>	Efeito sinérgico do tratamento tópico com gel de própolis verde EPP-AF <sup>®</sup> em associação com antimoniato de meglumina na infecção <i>in vivo</i> por <i>L.</i>	88
<b>Figura 14</b>	Resposta imune celular de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados de forma tópica com gel de própolis verde EPP-AF <sup>®</sup>	90
<b>Figura 15</b>	Produção de mediadores inflamatórios por orelhas de camundongos BALB/c infectados por <i>L. amazonensis</i> e tratados de forma tópica com gel de própolis verde EPP-AF <sup>®</sup>	91
<b>Figura 16</b>	Efeito do tratamento tópico com gel de própolis verde EPP-AF <sup>®</sup> nos níveis de mediadores inflamatórios circulantes de camundongos BALB/c infectados por <i>L. amazonensis</i>	92
<b>Figura 17</b>	Citotoxicidade de macrófagos tratados com diferentes concentrações dos	101

compostos Iangambina e Epi-Iangambina

- Figura 18** Efeito leishmanicida da iangambina e epi-iangambina sobre a viabilidade intracelular de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. 102
- Figura 19** Efeito imunomodulador da iangambina e epi-iangambina sobre macrófagos infectados por *L. amazonensis* 105
- Figura 20** Efeito imunomodulador da iangambina e epi-iangambina sobre macrófagos infectados por *L. braziliensis* 106
- Figura 21** Mudança do perfil inflamatório apresentado por macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* e tratados com as lignanas Iangambina e Epi-iangambina 107

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	HPLC/DAD: quantificação de substâncias bioativas do extrato de própolis (n=3 ± SD).	62
<b>Tabela 2</b>	HPLC/DAD: quantificação de substâncias bioativas do extrato de própolis utilizado no gel carbopol (n=3 ± SD).	63
<b>Tabela 3</b>	IC <sub>50</sub> , CC <sub>50</sub> e Índice de Seletividade (IS) dos compostos Iangambina e Epi-Iangambina.	103

## LISTA DE ABREVIATURAS

AnB	Anfotericina B
AnB-CL	Anfotericina B Complexo Lipídico
AnB-D	Anfotericina B Desoxicolato de Sódio
AnB-DC	Anfotericina B Dispersão Coloidal
AnB-L	Anfotericina B Lipossomal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLN-AnB	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados com Anfotericina B
CLN-Ø	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados Vazios
DDS	<i>Drug Delivery Systems</i> (Sistemas de Entrega de Droga)
EPI	Epi-Iangambina
EPP-AF®	Extrato de Própolis Padronizado – Apis Flora
ERK 1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i> (Quinase 1/2 regulada por sinal extracelular)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína Verde Fluorescente)
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i> (Geralmente Reconhecido como Seguro)
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Alta Densidade)
IAN	Iangambina
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IL-17 $\alpha$	Interleucina-17 $\alpha$
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LCM	Leishmaniose Cutânea Mucosa
LD	Leishmaniose Disseminada

LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Baixa Densidade)
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LV	Leishmaniose Visceral
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> (Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno)
MDMO	Macrófagos Derivados de Médula Óssea
NO	<i>Nitric Oxide</i> (Óxido nítrico)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato-Salino)
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
Sb <sup>+5</sup>	Antimonial Pentavalente
SBF	Soro Bovino Fetal
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral-alfa)
VP	Vacúolo Parasitóforo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1. ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE E DO CICLO DO PARASITO.....	18
1.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE.....	20
1.2.1. Aspectos epidemiológicos e clínicos da leishmaniose cutânea.....	21
1.3. TRATAMENTOS.....	24
1.3.1. Antimoniais pentavalentes (Sb <sup>+5</sup> ).....	25
1.3.2 Pentamidina.....	26
1.3.3 Miltefosina.....	27
1.3.4 Paromomicina.....	28
1.4 ANFOTERICINA B.....	29
1.4.1 Formulações de Anfotericina B.....	30
1.5 NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS.....	33
1.5.1 Carreadores Lipídicos Nanoestruturados com Anfotericina (CLN-AnB).....	34
<b>1.5.2 Própolis</b> .....	36
<b>1.5.3 Iangambina e Epi-iangambina</b> .....	38
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	40
<b>3 HIPÓTESE</b> .....	42
3.1 OBJETIVOS.....	42
3.1.1 Objetivo geral.....	42
3.1.2 Objetivos específicos.....	42
<b>4 MANUSCRITO I</b> .....	43
<b>5. HIPÓTESE</b> .....	58
5.1 OBJETIVOS.....	58
5.1.1 Objetivo geral.....	58
5.2.2 Objetivos específicos.....	58
<b>6 MANUSCRITO II</b> .....	59
<b>7 HIPÓTESE</b> .....	94
7.1 OBJETIVOS.....	94

<b>7.1.1 Objetivo geral.....</b>	<b>94</b>
<b>7.1.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>94</b>
<b>8 MANUSCRITO III.....</b>	<b>95</b>
<b>9 DISCUSSÃO.....</b>	<b>109</b>
<b>10 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>117</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>137</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE E DO CICLO DO PARASITO

Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são um conjunto de doenças infecto-parasitárias ainda predominantes em áreas tropicais e subtropicais pobres e vulneráveis, como as encontradas na África, Ásia e na América Latina. São consideradas negligenciadas devido à falta de recursos para uma correta abordagem médica e científica, como o desenvolvimento de medicamentos, de métodos diagnósticos, preventivos e de controle dessas enfermidades. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que mais de um bilhão de pessoas sofrem de uma ou mais dessas doenças em 149 países, e que vários milhões vivem em áreas onde existe o risco de contraí-las (PAHO/WHO, 2017).

As leishmanioses estão inseridas entre as dez principais DTNs devido à sua importância para a saúde pública mundial. Trata-se de antropozoonoses infecto-parasitárias e com aspectos clínicos heterogêneos e importante diversidade epidemiológica. A OMS estima que cerca de 0.7 – 1 milhão de novos casos ocorram anualmente, com 20.000 – 30.000 mortes, e que, aproximadamente, mais de 1 bilhão de pessoas vivam em áreas caracterizadas pela transmissão ativa da doença, em países atingidos pela pobreza no Sudeste Asiático, África Oriental e América Latina (PAHO/WHO, 2017; WHO, 2022).

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (protozoa: Trypanosomatidae). Parasitos *Leishmania* são digenéticos, possuindo um estado evolutivo flagelado, alongado e móvel, denominado promastigota, e um outro estado evolutivo redondo, com curto flagelo e imóvel, denominado amastigota. As promastigotas são encontradas de forma extracelular no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, insetos da subfamília Phlebotominae (Díptera, Psychodidae), denominados genericamente de flebotomos, mosquito-palha, biriguis, dentre outros. Por outro lado, as formas amastigotas são parasitos intracelular obrigatórios, encontradas no hospedeiro vertebrado (RODRIGUEZ et al., 2018).

O ciclo de transmissão tem início quando a fêmea do vetor flebotomíneo, infectada pelo protozoário, regurgita promastigotas metacíclicas de *Leishmania* – forma altamente infectante – juntamente com sua saliva na derme do hospedeiro vertebrado, no momento do repasto sanguíneo. Os danos nos tecidos causados pela probóscide do inseto vetor e as substâncias presentes em sua saliva – moléculas com propriedades vasodilatadoras, anticoagulantes e

imunomodulatórios (LESTINOVA et al., 2017; PRATES et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2014) – são capazes de gerar um compartimento na derme denominado lago sanguíneo, o que permite a fácil obtenção de sangue pelo inseto vetor, além de ser um potente estímulo para o recrutamento de células do sistema imune. No lago sanguíneo, as promastigotas são fagocitadas por neutrófilos e macrófagos. Dentro do vacúolo parasitóforo - organela formada a partir da fusão do fagossoma, gerado durante a fagocitose do parasito, com os lisossomos – as promastigotas se diferenciam em amastigotas (PESSOA et al., 2016). As amastigotas passam então a se multiplicar por fissão binária até que as células infectadas são lisadas e os parasitos liberados para o meio extracelular, a fim de infectar e parasitar novas células ou se espalhar pela via circulatória ou linfática e infectar órgãos como o fígado, baço ou medula óssea (RODRIGUEZ et al., 2018).

O ciclo completa-se quando, em um novo repasto sanguíneo, fêmeas do vetor flebotomíneo não infectadas se alimentam de sangue do hospedeiro vertebrado contendo células infectadas pelas formas amastigotas de *Leishmania*. No trato digestivo do vetor, ocorre rompimento da membrana dos macrófagos e as amastigotas liberadas diferenciam-se na forma promastigota, onde se fixam e sofrem uma série de modificações bioquímicas em sua superfície, perdem a capacidade de adesão ao epitélio do intestino do vetor, tornando-se móveis e altamente infectantes, em um processo denominado metaciclogênese. Assim, as promastigotas metacíclicas migram para a probóscide do inseto vetor, podendo iniciar um novo ciclo de transmissão durante um novo repasto sanguíneo do flebótomo (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; SINAN/SVS/MS, 2013) (Figura 1).

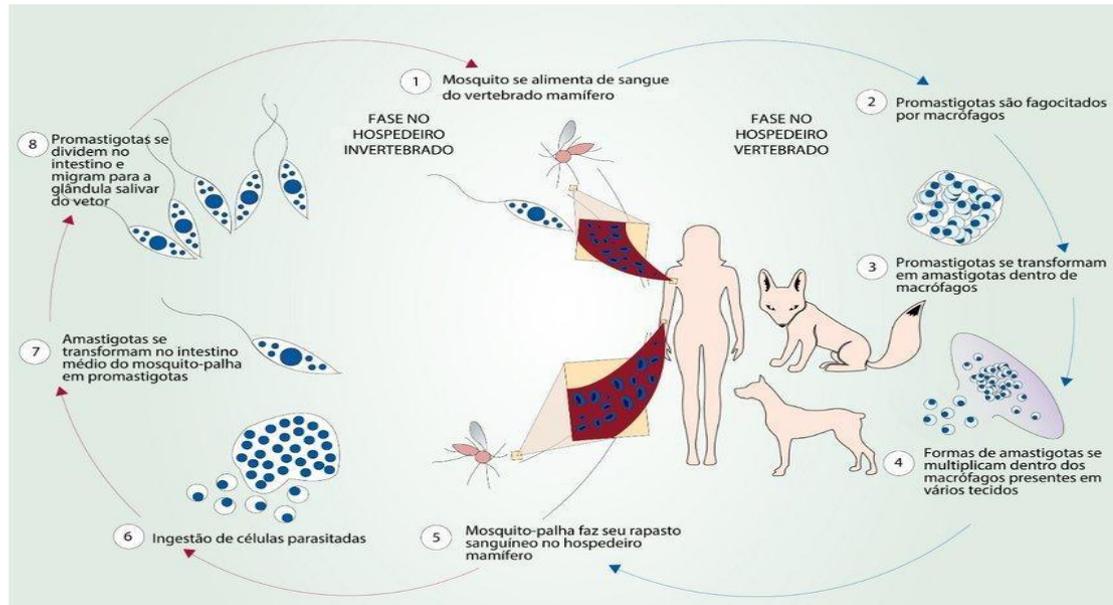


Figura 1 - Ciclo de transmissão da Leishmaniose Cutânea.

Fonte: (MOREIRA et al., 2020)

## 1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE

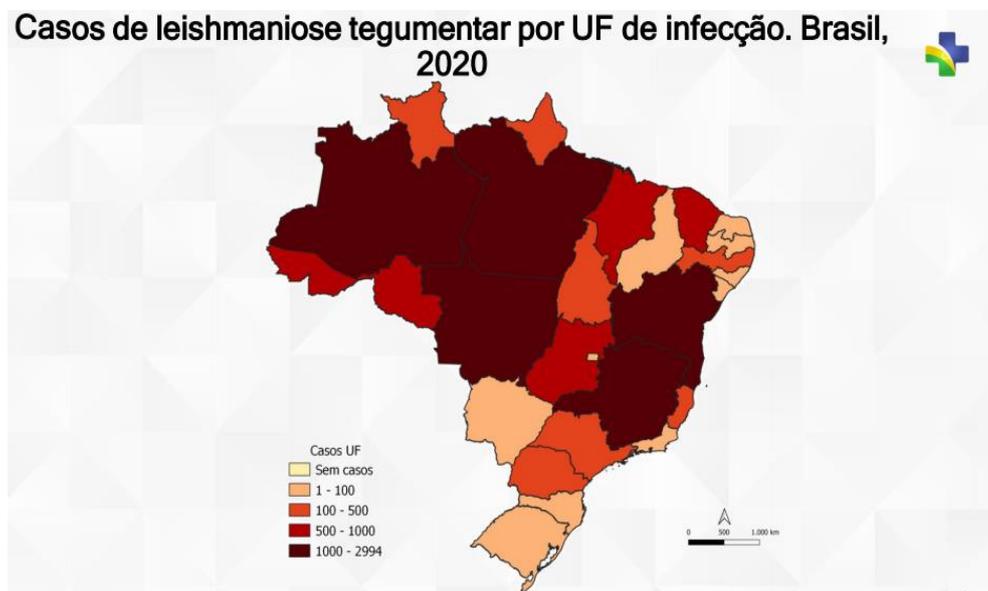
As diversas manifestações clínicas da leishmaniose são um resultado da interação entre vários fatores, como a espécie de *Leishmania* envolvida, virulência da cepa, quantidade de parasitos inoculados no momento da infecção, *background* genético do hospedeiro e da resposta imunológica por ele desenvolvida. As leishmanioses apresentam-se sob três formas principais: a Leishmaniose Visceral (LV), Mucocutânea (LMC) e a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL).

A Leishmaniose Visceral é a forma clínica potencialmente letal em mais de 90% dos casos quando não tratada. A OMS estima que o número de novos casos anuais esteja entre 0.2 – 0.4 milhões, dos quais cerca de 90% ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (PAHO/WHO, 2017). No Brasil, conhecida como calazar e barriga d'água, os casos de LV distribuem-se majoritariamente entre os estados da região Nordeste, acumulando ao todo 26.613 números de casos confirmados notificados entre os anos de 2007 – 2020, enquanto que todo o Brasil registrou cerca de 50.084 casos no mesmo período (BRASIL, 2021).

### 1.2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Diante de da diversidade fisiopatogênica e imunológica das leishmanioses, esta tese irá abordar aspectos relativos à leishmaniose cutânea, especificamente sobre a leishmaniose cutânea localizada (LC). A leishmaniose cutânea ou leishmaniose tegumentar é a forma clínica mais comum da doença, com uma estimativa de 0.6 -1 milhão de novos casos anuais. De acordo com a OMS, em 2019, mais de 87% dos novos casos de LCL ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã (República Islâmica do), Iraque, Líbia, Paquistão, Síria e Tunísia (WHO, 2021).

Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, a LCL é uma doença de caráter endêmico encontrada em todos os estados brasileiros (Figura 2), com relato de 16.432 números de casos em 2020. Nesse mesmo ano, a região Norte apresentou o maior coeficiente de detecção de casos (39.2 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (14.8 casos/100.000 habitantes) e Nordeste (5 casos/100.000 habitantes) BRASIL, 2021).



**Figura 2** - Casos Leishmaniose Cutânea por UF - Brasil, 2020.

**Fonte:** Adaptado de (BRASIL, 2021)

Dos estados que compõem a região do Nordeste brasileiro, a Bahia apresentou o maior número de casos em 2020: 1.153, indicando um coeficiente de detecção médio de 7.7

casos/100.000 habitantes, dispersos 153 em municípios (153/417; 36.6%). Na Bahia, a LC teve maior impacto no ano de 2020 nas macrorregiões Sul (674 casos; 58,5%) e Leste (162 casos; 14,1 %) (SESAB, 2020).

No Brasil, as três principais espécies de *Leishmania* relacionadas à LC são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, sendo também descritos recentemente casos relacionados às espécies *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi* e *Leishmania (V.) lainsoni*. Enquanto o ciclo de transmissão da *L. (V.) guyanensis* está limitado à Região Norte do Brasil, casos de LC causados por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* possuem ampla distribuição pelo território brasileiro (BRASIL, 2021).

A *L. braziliensis* é o principal agente etiológico da LC no Brasil, sendo também importante em toda a América Latina. A infecção causada por esta espécie de *Leishmania* pode progredir para três principais formas subclínicas diferentes: a leishmaniose cutânea localizada (LCL), a leishmaniose mucosa ou mucocutânea (LMC) e a leishmaniose disseminada (LDi). Por outro lado, a infecção causada pela *L. amazonensis* pode levar à LCL, em casos menos frequentes à LMC e em casos raros pode levar à Leishmaniose Difusa (LD) (LESSA et al., 2007).

A LCL é a forma subclínica mais comum da LC (~ 95%) e é caracterizada pela presença de pápula eritematosa, seguida de nódulo e posterior o surgimento de úlceras múltiplas na pele, com formato redondo ou ovalado, bordas proeminentes, eritematosas e de fundo granuloso, localizadas principalmente nas áreas expostas do corpo, acessíveis à picada do vetor flebotomíneo. As lesões causadas por *L. braziliensis* possuem infiltração dérmica mais modesta na qual macrófagos e parasitas são geralmente escassos, devido à forte resposta CD4 tipo-Th1, com produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e óxido nítrico (NO). Assim, pacientes com LCL causada por *L. braziliensis* apresentam imunidade celular preservada, observado através da reatividade ao teste Intradérmico de Montenegro e de proliferação de linfócitos *in vitro* (BRASIL, 2017; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004a). Diferentemente, a LCL causada por *L. amazonensis* é caracterizada por um denso infiltrado dérmico de macrófagos vacuolados e intensamente parasitados, que persiste por vários meses. Além disso, o teste Intradérmico de Montenegro apresenta-se negativo em mais de 50% dos casos. Isso sugere que esta espécie apresenta mecanismos mais eficientes de escape da resposta imune celular, caracterizada por uma resposta imune CD4 tipo-Th2 e presença de quantidades significantes das citocinas IL-4 e

IL-10 circulantes (MORAES e SILVEIRA 1994; SANDOVAL PACHECO et al., 2021; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A cura espontânea ocorre ao longo de vários meses/anos e pode deixar uma cicatriz e alterações permanentes na pigmentação da pele, o que pode comprometer o bem-estar psíquico e social dos indivíduos acometidos. Apesar de não apresentar risco de vida ao indivíduo acometido, há uma grande variabilidade no tempo de cicatrização, aumento da frequência de falha terapêutica e risco de desenvolvimento de lesões mucosas, meses ou anos após uma lesão cutânea primária (BRASIL, 2007, 2017; NOGUEIRA; SOTTO; CUCÉ, 2008; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A LMC representa cerca de 3% a 6% dos casos de LC relatados no Brasil. Se estabelece quando ocorre disseminação do parasito oriundo da LCL para o trato nasofaríngeo, através dos sistemas hematogênico e linfático, ou em casos raros através do contato direto entre lesões cutâneas com a mucosa. Embora a maioria dos casos de LMC é geralmente secundária às lesões cutâneas, em alguns casos pode haver o comprometimento primário das mucosas. Essa enfermidade é caracterizada por úlceras, inflamação, presença de secreções, dor e epistaxe nas mucosas do nariz e boca, com posterior comprometimento orofaríngeo e laríngeo. As complicações incluem perfuração do septo nasal e destruição do nariz e boca. A grave destruição tecidual observada na LMC é devido ao intenso processo inflamatório desbalanceado observado nessa condição, com aumento de linfócitos, macrófagos, citocinas do tipo Th1, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , Óxido Nítrico (NO), IL-17 e células T CD8<sup>+</sup> expressando granzima A, além da redução da citocina regulatória IL-10. Se por um lado, esse processo inflamatório é responsável pela redução da carga parasitária nas lesões mucosas em comparação à LCL, por outro leva a um extenso dano tecidual e à dificuldade no controle da doença pelos atuais tratamentos. Assim, ao contrário da LCL, a LMC não possui cura espontânea, representando a forma mais desfigurante da LC (BRASIL, 2017; CARVALHO et al., 2022; CONCEIÇÃO-SILVA et al., 2018; FARIA et al., 2005; LESSA et al., 2007; MANN et al., 2021; PALMEIRO et al., 2012).

A LD é uma forma subclínica rara e grave da LC. É caracterizada por múltiplas lesões (>10) de aspectos papulares, nodulares, acneiforme ou ulceradas que atingem mais de duas áreas do corpo, podendo haver comprometimento das mucosas. Trata-se de uma enfermidade com resposta imune predominantemente Th1, com elevados níveis de IFN- $\gamma$  comparado à produção de IL-4. Entretanto, a produção de mediadores como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  é menor

comparada à LCL. Turetz et al (2002) observaram baixa produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e alta produção de IL-10 em células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) de pacientes com LD em à comparação CMSP de pacientes com LCL, o que pode explicar a disseminação hematogênica dos parasitos. Por outro lado, análises *in situ* mostraram expressão semelhante de mediadores inflamatórios, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL3, CCL11, CXCL9 e CXCL10, além de aumento de marcadores citotóxicos, neutrófilos e células NK em biópsias de pacientes com LD em comparação à LCL, o que explicaria a baixa carga parasitária observada nas lesões de LD (MACHADO et al., 2011; RAMOS et al., 2021; TEIXEIRA et al., 2006). Ademais, trata-se de uma doença de difícil tratamento, devido ao alto número de lesões, comprometimento das mucosas e baixa taxa de cura (~23%) (MACHADO et al., 2019).

Já a LCD, outra forma subclínica rara da LC, caracteriza-se por lesões de aspecto nodular, papulares ou em infiltrado de placas, porém sem a presença de úlceras, que abrangem grande parte do corpo. Não é observado comprometimento de mucosas. As lesões possuem macrófagos intensamente parasitados e o teste Intradérmico de Montenegro apresenta-se sempre negativo, o que se deve a forte resposta imune celular CD4 tipo-Th2, com altos níveis circulantes de IL-4 e IL-10. Assim, a LCD é caracterizada pela incapacidade do sistema imune do hospedeiro em montar uma resposta imune protetora eficiente. França-Costa e colaboradores (2014) identificaram altos níveis sistêmicos e *in situ* de arginase I, ODC, PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$  em pacientes com LDC em comparação com pacientes com LCL. Ademais, a inibição *in vitro* de arginase 1 e ODC levou à redução da replicação de intracelular *L amazonensis*, demonstrando a associação dessas vias com o perfil de resposta imune anérgico observado na LDC. Esse quadro de anergia do sistema imune leva ao descontrole da doença e à frequente falha terapêutica (BARRAL-NETTO et al., 1998; FRANÇA-COSTA et al., 2014; SAMPAIO et al., 2021; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

### 1.3 TRATAMENTOS

A escolha do melhor esquema terapêutico para tratamento das leishmanioses deve ser feita de forma individualizada, levando-se em consideração as características de cada paciente, como ocorrência de gestação e o estado de saúde do mesmo, bem como a forma clínica de leishmaniose e a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (CDC, 2022). No Brasil, o fármaco de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose cutânea localizada é o

antimonial pentavalente ( $\text{Sb}^{+5}$ ) desde 1945 (LIMA et al., 2007). Na impossibilidade de uso do antimonial pentavalente ou em casos de falha terapêutica, o Ministério da Saúde do Brasil recomenda o emprego da anfotericina B, nas apresentações em solução de desoxicolato de sódio ou lipossomal, ou da pentamidina (BRASIL, 2017).

### 1.3.1 Antimoniais pentavalentes ( $\text{Sb}^{+5}$ )

Há duas apresentações comerciais de antimonial pentavalente empregadas na prática clínica, o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>) e o estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>), não comercializado no Brasil (BRASIL, 2017). Essas apresentações são quimicamente semelhantes, e sua toxicidade e eficácia estão relacionadas ao seu conteúdo antimonial: a solução de antimoniato de N-metilglucamina contém 8,1% de  $\text{Sb}^{+5}$  (81 mg/mL), enquanto a solução de estibogluconato de sódio contém 10% de  $\text{Sb}^{+5}$  (100 mg/mL) (WHO, 2010).

Apesar do mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes não ser completamente entendido, acredita-se que o  $\text{Sb}^{+5}$  se comporte como uma pró-droga, sendo convertido, posteriormente, à forma trivalente ( $\text{Sb}^{+3}$ ), mais ativa e tóxica (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; HANSEN et al., 2011). Esses compostos interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*. Tanto a glicólise quanto a oxidação dos ácidos graxos são inibidos, sendo que esta inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP (BRASIL, 2017). Além disso, estudos sugerem que estes compostos são capazes de induzir apoptose do parasito através da indução de estresse oxidativo – inibindo a tripanotiona redutase, uma enzima responsável pela proteção do parasito contra espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, produzidas pela célula hospedeira – e do aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (BASU et al., 2006; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; KIP et al., 2018; SINGH & KUMAR, 2012).

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

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

### 1.3.2 Pentamidina

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

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

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

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

### 1.3.2 Miltefosina

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

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

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

#### 1.3.4 Paromomicina

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

Krause e colaboradores (1994) relataram eficácia de 76% do uso tópico desse composto em pacientes com LCL causada por *L. panamensis* no Equador. A eficácia aumentou para 90% quando o tratamento tópico foi associado ao uso parenteral de Glucantime<sup>®</sup>. Do mesmo modo, o uso tópico do composto apresentou taxa de cura de 82% em LCL causada por *L. major* na Tunísia (SALAH et al., 2013). Contudo, o tratamento da LT empregando Paromomicina de forma sistêmica é raro, uma vez que este composto apresentou baixa eficácia no tratamento da LMC (LLANOS-CUENTAS et al., 2007; ROMERO et al., 1996, 1998), bem como eficácia

variável para LCL. Soto e colaboradores (1994) relataram eficácia < 50% em pacientes com LCL causada por *L. panamensis* na Colômbia. Hepburn e colaboradores (1994) compararam a eficácia da Paromomicina ao Estibogluconato de Sódio, em um estudo randomizado com pacientes apresentando LCL causada por *L. braziliensis* e *L. mexicana*, em Belize. Neste estudo, a Paromomicina apresentou eficácia de 59%, enquanto o Estibogluconato de Sódio apresentou eficácia de 88%. Em contrapartida, na região de Corte de Pedra na Bahia, Brasil, Correia e colaboradores (1996) obtiveram eficácia de 90% empregando-se a Paromomicina na terapia de pacientes com LCL causada por *L. braziliensis*, não havendo diferença estatística entre a eficácia apresentada por este esquema terapêutico e pelos grupos que receberam Pentamidina e Glucantime<sup>®</sup>. Contudo, os autores relataram que a alta eficácia obtida com a Paromomicina deve-se à dose mais alta empregada no estudo, 20 mg/kg/dia durante 20 dias.

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

#### 1.4 ANFOTERICINA B

A Anfotericina B é um composto natural produzido pela actinobactéria *Streptomyces nodosus*, isolada do solo do rio Orinoco na Venezuela e caracterizada no início da década de 50 por Gold e colaboradores (1956). Quimicamente, a AnB é um composto anfipático definido como um antibiótico poliênico de cadeia macrocíclica.

Acredita-se que a AnB exerça ação no parasito em dois diferentes níveis: dois eventos ocorreriam a nível membranar e outro de forma intracelular. Os eventos a nível membranar estão relacionados com a afinidade da molécula da AnB pelo ergosterol, principal esterol encontrado na membrana dos fungos e outros parasitos, como o *Leishmania*. A ligação da molécula de AnB ao ergosterol leva à formação de múltiplos poros, os quais permitem a passagem de eletrólitos, como  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  bem como de outros componentes citoplasmáticos, levando à morte celular. O segundo evento a nível membranar seria o sequestro do ergosterol pela AnB, de forma a impedir que este esterol exerça seu papel na membrana celular, como endocitose, fusão de vacúolos e estabilização e manutenção da fluidez

da membrana e de suas proteínas. Entretanto, a AnB também consegue se ligar ao colesterol da membrana de mamíferos, o que explica os efeitos tóxicos observados no hospedeiro. Contudo, a afinidade pelo ergosterol é cerca de dez vezes superior em comparação ao colesterol. Isso, provavelmente, se deve à conformação cilíndrica do ergosterol, que possibilita uma melhor ligação à molécula de AnB em comparação à estrutura sigmoidal do colesterol (GALE, 1974; MATSUMORI et al., 2009; MESA-ARANGO et al., al., 2012; ODDS; et al., 2003; SOKOL-ANDERSON et al., 1986; YANG et al., 2013). O modo de ação a nível intracelular da AnB no parasito seria a indução de estresse oxidativo e acúmulo de radicais livres na célula do parasito, levando à múltiplos efeitos deletérios sobre os componentes essenciais da célula (membrana, proteínas, DNA e mitocôndrias) e resultando na morte celular. Entretanto, os mecanismos envolvidos ainda não são completamente entendidos (MESA-ARANGO et al., 2012, 2014; SANGALLI-LEITE et al., 2011; SOKOL-ANDERSON et al., 1988).

Ademais, vários estudos vêm sugerindo que a anfotericina B pode exercer um potente efeito imunomodulador, oferecendo, assim, um mecanismo de ação alternativo para este composto (MESA-ARANGO et al., 2012). Mas, ao mesmo tempo, esse efeito tem sido relacionado à toxicidade associada ao composto devido à transcrição e produção de múltiplos mediadores, como TNF- $\alpha$ , prostaglandinas, IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1 e óxido nítrico em estudos *in vitro* (CAMACHO et al., 2004; SAU et al., 2003; SIMITSOPOULOU et al., 2005).

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

#### 1.4.1 Formulações de Anfotericina B

Apesar da AnB ser um composto anfipático, a parte lipofílica da molécula a torna insolúvel em meios aquosos. Por isso, a molécula necessita ser associada a excipientes que aumentem sua solubilidade em meios aquosos. Atualmente, a molécula de Anfotericina B possui quatro formulações aprovadas para uso clínico: AnB desoxicolato de sódio, complexo lipídico de AnB, formulação com dispersão coloidal de AnB e formulação lipossomal.

A primeira formulação de Anfotericina B, aprovada para uso clínico, foi associada ao desoxicolato de sódio (AnB-D) para estabilizar a solução em meio aquoso, através da formação

de micélios. Essa formulação recebeu o nome de Fungizone<sup>®</sup> e foi introduzida no mercado em 1958 para administração intravenosa. A AnB-D foi considerada por muito tempo droga de referência para tratamento de infecções sistêmicas, como em infecções disseminadas por *Candida spp*, meningite criptocócica e zigomicose invasiva (SAAG et al., 2000; WANESS et al., 2009; ZHANG et al., 2006), devido ao seu amplo espectro de ação e eficácia, tanto em relação à fungos quanto em relação à parasitos, como *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus multilocularis* e *Leishmania spp* (MONÉ et al., 2010; PAILA et al., 2010; REUTER et al., 2003; YARDLEY; CROFT, 1999). Em relação à leishmaniose, a AnB-D era utilizada como droga de segunda escolha, na dose de 0.5 a 1mg/kg/dia por 15 consecutivos ou alternados (SUNDAR et al., 2007; WHO, 2010).

Apesar de possuir eficácia clínica de ~100%, o uso clínico da AnB-D é limitado, tanto pela necessidade de aplicação intravenosa quanto, principalmente, pelos efeitos adversos, sendo a nefrotoxicidade mais comum, acometendo cerca de 65% dos pacientes (FANOS; CATALDI, 2000; LEMKE, 2005; SAWAYA et al., 1995; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Contudo, a AnB-D, juntamente com a Paromomicina<sup>®</sup>, são os únicos fármacos leishmanicidas que podem ser empregados no tratamento de gestantes (BRASIL, 2017).

As formulações lipídicas de AnB foram desenvolvidas com o objetivo de reduzir o efeito tóxico da AnB-D. Atualmente, existem três formulações aprovadas para uso clínico: complexo lipídico de AnB, formulação com dispersão coloidal de AnB e formulação lipossomal.

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

Na formulação com dispersão coloidal (AnB-DC), a AnB está contida, juntamente com sulfato de colesterol, em microdiscos com diâmetro médio de 122 nm. Seus representantes comerciais são o Amphocil<sup>®</sup> e o Amphotec<sup>®</sup>. Essa formulação foi aprovada como tratamento de segunda escolha para aspergilose nos EUA e Europa na dose de 3,4 mg/kg/dia dia (ANAÏSSIE et al., 1998).

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

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

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

indicando o uso do Glucantime<sup>®</sup> como primeira escolha para o tratamento da LV (BRASIL, 2014; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Em relação à LC, estudos realizados com LCL no novo e velho mundo mostram taxa de eficácia da AnB-L entre 85 e 100% (SOLOMON et al., 2013; WORTMANN et al., 2010). Em relação à LCM, a AnB-L também tem mostrado bons resultados, com taxa de eficácia entre 88 a 100% (AMATO et al., 2011; ROCIO et al., 2014; SAMPAIO; MARSDEN, 1997). Entretanto, há poucos estudos empregando a AnB-L no tratamento da LT, devido ao preço proibitivo e a falta de um grande ensaio clínico randomizado e controlado. No Brasil, o Ministério da Saúde atualizou as recomendações sobre o manejo dos pacientes com LC para a realidade brasileira. Assim, a partir de 2013, a AnB-L passou a ser considerada medicamento de primeira escolha para tratamento de pacientes imunocomprometidos, ou >50 anos ou ainda gestantes (BRASIL, 2017; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Apesar da reduzida toxicidade e, conseqüentemente, aumento do índice terapêutico e melhora da qualidade de vida dos pacientes, a ampla utilização da AnB-L no tratamento das leishmanioses ainda é limitada devido ao alto custo desse medicamento. Apesar da iniciativa da OMS em reduzir o valor do Ambisome<sup>®</sup>, o tratamento com esse fármaco ainda continua extremamente custoso. Segundo a OMS, uma ampola do medicamento com 50 mg custa US\$18. Sendo assim, o tratamento de uma pessoa com 35 kg, no regime de 4 mg/kg/dia por 5 dias, teria um custo de US\$ 252 (WHO, 2010).

Considerando-se todos os dados apresentados, acreditamos que o desenvolvimento de novas formulações de AnB, eficazes, seguras e, principalmente, mais acessíveis em comparação às formulações existentes é imprescindível (ULIANA et al., 2017).

## 1.5 NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

Como visto, as estratégias de tratamento da leishmaniose consistem nos mesmos medicamentos empregados há décadas na prática clínica, os quais possuem limitações como alto custo e toxicidade, principalmente. Segundo dados do DATASUS, no ano de 2020 o Brasil registrou 2.656 internações por leishmaniose, com um custo total de R\$ 1.484.963,52. Considerando os preços de apenas dois dos principais medicamentos recomendados para tratamento da leishmaniose no mercado brasileiro, como o Ambisome<sup>®</sup> (R\$ 16.990,89/ 10 ampolas) e o Glucantime<sup>®</sup> (R\$ 306,68/ 50 ampolas) (PMVG e ICMS de 18%) (CMED, 2022),

além do número de casos de LC (16.432) e LV (1.933) no Brasil somente em 2020, nota-se que o ônus da leishmaniose para o Brasil, um país emergente, é alto (BRASIL, 2022). A estimativa de gastos e perda econômica são ainda maiores se considerarmos os impactos provenientes dos óbitos e da perda de força de trabalho no país devido à doença.

Dessa forma, desenvolver novos medicamentos ou esquemas terapêuticos que sejam economicamente acessíveis a países pobres, auxiliando na redução de custos e no tempo de tratamento, que sejam de simples administração, por via oral ou tópica, podendo ser utilizados em áreas com sistema de saúde inadequado, e que possuam baixos efeitos tóxicos, é umas das principais estratégias no combate à doença e meta da Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) (DNDI, 2022).

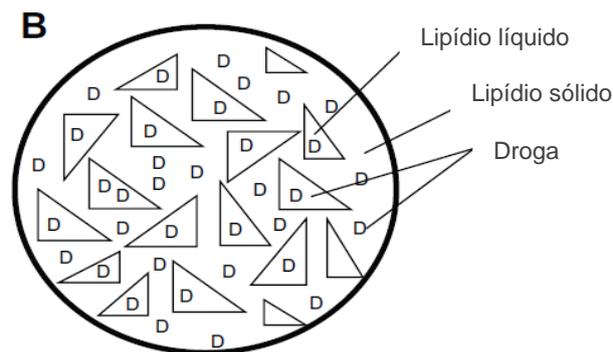
Nesse sentido, este estudo usa de ferramentas nanotecnológicas para desenvolver uma nova formulação de Anfotericina B, os Carreadores Lipídicos nanoestruturados com Anfotericina B (CLN-AnB), bem como avalia compostos oriundos da biodiversidade brasileira, Iangambina, Epi-Iangambina e Própolis verde, como potenciais candidatos à terapêutica alternativa para a leishmaniose.

### 1.5.1 Carreadores Lipídicos Nanoestruturados com Anfotericina (CLN-AnB)

Os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs) ganharam destaque no *Drug Delivery Systems* - DDSs (Sistemas estáveis de entrega de drogas) por causa da sua capacidade de aumentar a biodisponibilidade e promover a liberação controlada de drogas em locais específicos, além do reduzido custo (principalmente drogas lipofílicas, como a AnB) (PARDESHI et al., 2012). Os CLNs, em geral, são partículas lipídicas esféricas, com tamanho de 10-1000 nm e preparados com uma mistura de lipídios sólidos e líquidos com diferentes pontos de fusão à temperatura ambiente, resultando em uma matriz nuclear lipídica sólida (estabilizada por surfactantes) encapsulando compartimentos de lipídios líquidos. A mistura de lipídios sólidos e líquidos resulta em uma matriz nanoestrutura com imperfeições entre os lipídios, o que fornece espaços para acomodar a droga na matriz, levando à alta capacidade de carregamento de drogas, além de modular o perfil de liberação dos fármacos veiculadas e fornecer uma maior estabilidade dos mesmos (Figura 4) (JENNING et al., 2000; MÜLLER et al., 2002; SAUPE, 2005). Os lipídios utilizados na construção dos CLNs são fisiológicos e biodegradáveis ou substâncias lipídicas e estabilizantes que são geralmente reconhecidos como

seguros (GRAS). Comparado com outros DDSs, como lipossomos, microemulsões e nanopartículas poliméricas, os CLNs possuem outras vantagens, como a não utilização de solventes orgânicos ou altas concentrações de surfactantes, estabilidade física por longo tempo e facilidade de transposição para a escala industrial (SAUPE, 2005).

Diante de tantas vantagens, há vários relatos na literatura avaliando e demonstrando a eficiência dos CLNs. Hosny e colaboradores (2022) observaram a eficácia do tratamento tópico com formulação de CLN contendo miconazol em modelo *in vivo* de candidíase oral. Em outro estudo, os CLNs foram capazes de atuar como um sistema de liberação sustentada para a liberação de itraconazol no cérebro, após administração intravenosa em camundongos (LIM et al., 2014). Os CNLs também foram avaliados na infecção *in vivo* por *Leishmania* Monteiro e colaboradores (2022) demonstraram a eficácia da administração oral de CLN contendo o fármaco buparvaquona na redução da carga parasitária do fígado de hamsters infectados com *L. infantum*.



**Carreadores lipídicos nanoestruturados**

**Figura 3** - Estrutura esquemática dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.

**Fonte:** Adaptado de KHAN et al., 2013.

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

### 1.5.2 Própolis

A própolis é uma substância resinosa e balsâmica, que possui coloração e resistência diversa, variando de marrom até verde-escuro. É elaborada pelas abelhas a partir de resinas de broto, botões florais e outras partes de tecidos vegetais. As abelhas utilizam-na para recobrir a parede da colmeia, reparar frestas, reforçar os favos, manter asséptico o ambiente interno da colméia e mumificar. Basicamente a própolis é composta por: 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de cera, 5-10% de óleos essenciais e 5% de pólen e outros compostos inorgânicos (ODA et al., 2011; SANTOS et al., 2020). Uma menor variação da composição química da própolis é observada nas regiões temperadas do planeta, como na Europa, onde seus principais compostos bioativos são os flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas) (PEREIRA et al., 2002).

No Brasil, devido à grande diversidade de espécies vegetais brasileiras visitadas pelas abelhas, ocorre uma elevada variação de seus princípios ativos, apresentando uma composição química bem diferente e complexa, constituída de ácidos fenólicos prenilados, lignanas, terpenos, álcoois terpênicos e pequenas quantidades de flavonóides (BOUDOUROVA-KRASTEVA3 et al., 1997). Ao todo, já foram descritos 14 tipos de própolis no território brasileiro, classificados de acordo com a sua origem botânica, propriedades físico-químicas e geolocalização (DAUGSCH et al., 2008; FERREIRA et al., 2017; PARK et al., 2002). Dentre todos os tipos conhecidos, a própolis verde brasileira é um dos mais comercializados e estudados do mundo. A principal fonte botânica da própolis verde é a *Baccharis dracunculifolia* DC, uma planta da família Asteraceae. Possui como principais componentes compostos fenólicos, como ácido p-cumárico, ácido fenílico, ácido cafeico, kaempferol, quercetina e o Artepillin C, sendo este último considerado como marcador de própolis verde (SANTOS et al., 2020).

A elevada variedade de princípios da própolis brasileira tem sido uma grande referência internacional, não só para fins comerciais, mas também na área científica. Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas à este composto, destacando-se: atividade antibacteriana (DE SOUZA SILVA et al., 2021; DEVEQUI-NUNES et al., 2018; KALIL et al., 2019), antiviral (GÜLER et al., 2021; KUROKAWA et al., 2011; REFAAT et al., 2021), anti-inflamatória (CONTE et al., 2021; TOUZANI et al., 2019), antifúngica (BEZERRA et al., 2020; WOŹNIAK et al., 2020), antiparasitária (ALOTAIBI et al., 2019; MOHAMED et al., 2016;

REGUEIRA-NETO et al., 2018; SILVA et al., 2021), anticarcinogênica (AMALIA; DIANTINI; SUBARNAS, 2020; ELNAKADY et al., 2017) e leishmanicida (CAVALCANTE et al., 2021; REBOUÇAS-SILVA et al., 2017; REGUEIRA-NETO et al., 2018).

O Extrato de Própolis Padronizado da Apis Flora (EPP-AF<sup>®</sup>) é um extrato de própolis verde brasileira cuja composição química e propriedades biológicas foram determinadas juntamente com sua reprodutibilidade de lote a lote. Essa padronização torna o EPP-AF<sup>®</sup> um extrato único cujos estudos não podem ser aplicados ou traduzidos para outros tipos de extratos de própolis. Os três principais bioativos encontrados no EPP-AF<sup>®</sup> são o artepelin C, o ácido 4,5 dicafeoilquínico e a drupanina, cujos efeitos biológicos, como anti-inflamatória, anticâncer, antiparasitária e gastroprotetora, já são relatadas na literatura científica (COSTA et al., 2018; DE PAULA et al., 2020; KIM et al., 2017; PUANGPRAPHANT et al., 2011). Assim, diversas propriedades farmacológicas já foram descritas para o extrato EPP-AF<sup>®</sup>, como antiúlcera, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e, recentemente, um estudo clínico mostrou os benefícios do tratamento adjuvante com própolis para a recuperação de pacientes acometidos por COVID-19 hospitalizados, apresentando impacto na redução do tempo de internação. Essa combinação de características (padronização, reprodutibilidade, atividades biológicas comprovadas e segurança) permite que o EPP-AF<sup>®</sup> seja considerado para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (BARUD et al., 2013; BERRETTA et al., 2012, 2013; DINIZ et al., 2020; HORI et al., 2013; MACHADO et al., 2012; MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2019; SILVEIRA et al., 2021).

Em relação ao efeito leishmanicida, estudos têm demonstrado o efeito de diferentes extratos da própolis tanto *in vitro* como *in vivo*, seja por atuar diretamente sobre as formas promastigotas e/ou amastigotas, por agir na produção de substâncias microbidas pelos macrófagos ou ainda por diminuir o diâmetro das lesões em experimentos *in vivo*. Em trabalhos anteriores, nosso grupo demonstrou a ação leishmanicida e imunomodulatória de três diferentes extratos de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> na infecção *in vitro* por *L. braziliensis* ou diretamente sobre as formas promastigotas deste parasito (REBOUÇAS-SILVA et al., 2017). Nesta tese, expandimos nossos conhecimentos ao avaliar o efeito do EPP-AF<sup>®</sup> na infecção por *L. amazonensis*, espécie relacionada com a leishmaniose cutânea difusa, forma rara e de difícil tratamento, além de causar lesões crônicas, inflamatórias e altamente parasitadas em modelo experimental (DE OLIVEIRA & BARRAL-NETO, 2005).

### 1.5.3 Iangambina e Epi-iangambina

O gênero *Ocotea* (família Lauraceae), conta com mais de 400 espécies de plantas, distribuídas pelos continentes americano e africano. Estima-se que 175 espécies deste gênero ocorram no Brasil, com 103 espécies registradas na região sudeste (“FLORA DO BRASIL,” 2020; “The Plant List,” 2013). As espécies deste gênero são amplamente utilizadas na construção civil, fabricação de móveis e na culinária. Além disso, as plantas do gênero *Ocotea* são também utilizadas na medicina popular para o tratamento de várias afecções, tais como: infecções, úlceras, cólicas menstruais, picadas de cobra, diarreia, indigestão e dores em geral (COUTINHO et al., 2006; MORAES, 2005).

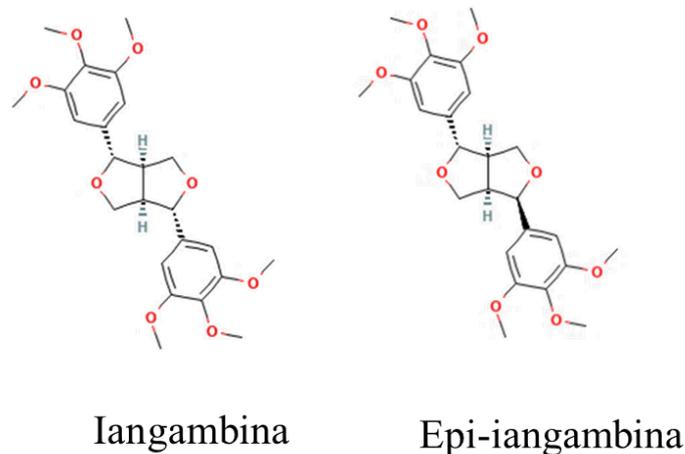
Estudos fitoquímicos vêm relatando a ocorrência de diversos alcalóides, terpenos, flavonoides, lignanas e neolignanas nas principais estruturas morfológicas - como folhas, cúpulas e cascas - das espécies desse gênero (ANTONIO et al., 2020; GILARDONI et al., 2021; GONTIJO et al., 2017; LI et al., 2018). Dentre os metabólitos avaliados, os lignóides, especialmente as lignanas e as neolignanas, são uma das classes químicas mais biossintetizadas no gênero *Ocotea* (ANTONIO et al., 2022; LI et al., 2018).

A iangambina e seu isômero a epi-iangambina (Figura 4) são as principais lignanas encontradas em *Ocotea fasciculata* (Nees) Mez (também conhecida como *Ocotea duckei* Vattimo-Gil), árvore nativa da floresta Atlântica do nordeste brasileiro e conhecida popularmente como louro-de-cheiro ou louro-canela. Antonio e colaboradores (2022)) demonstraram através de análises por HPLC que a iangambina pode ser usada como biomarcador para *Ocotea fasciculata*.

Várias propriedades farmacológicas vêm sendo atribuídas à iangambina, tais como: antagonista do receptor do fator de ativação plaquetária (PAF) e analgésico (CASTRO-FARIANETO et al., 1995; JESUS-MORAIS, 2000), antialérgico (SERRA et al., 1997), ação protetora contra problemas cardiovasculares e choque anafilático (ARAÚJO et al., 2014, 2001; RIBEIRO et al., 1996; TIBIRICA et al., 1996), bem como atividade antitumoral em células colorretais (HAUSOTT et al., 2003) e células da linhagem tumoral KB (BALA et al., 2015). Até o momento, poucos estudos relataram a capacidade leishmanicida da iangambina e o efeito imunomodulador nesse contexto não foram explorados. Em estudos conduzidos por Monte Neto e colaboradores (2007), a iangambina foi capaz de reduzir a viabilidade de promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*, provocando alterações ultraestruturais sugestivas de morte por

apoptose e autofagia (NETO et al., 2011). Em sua dissertação de mestrado, Penha (2010) demonstrou a eficácia da iangambina em reduzir a carga parasitária de macrófagos infectados por *L. infantum*, por mecanismo independente da produção de óxido nítrico e TNF-alfa. Além disso, em estudo *in vivo*, o tratamento oral com iangambina foi capaz de reduzir a carga parasitária de animais infectados com *L. amazonensis* (PENHA, 2011). Contudo, até a presente data, não são conhecidos estudos avaliando as propriedades farmacológicas da epi-iangambina.

O desastre da talidomida entre as décadas de 50-60 lançou luz sobre a necessidade de maior regulação de medicamentos. Introduzida na década de 50 como sedativo, tranquilizante e antiemético para enjoos matinais, a talidomida era uma mistura racêmica de dois enantiômeros rectus (R) e sinistro (S), no qual o isômero R é um sedativo e o isômero S é um teratôgeno, o qual levou ao nascimento de milhares de crianças com malformações nos membros, ouvido, coração e órgãos internos (KESSERWANI, 2021; MORO et al., 2017). Assim, levando em consideração a importância do estudo de isômeros para o desenvolvimento de medicamentos seguros e mais eficazes, esta tese busca avaliar o efeito leishmanicida e imunomodulador dos isômeros iangambina e epi-iangambina.



**Figura 4** - Estrutura química das lignanas iangambina e epi-iangambina.

**Fonte:** Adaptado de NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2022a; 2022b)

## 2 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são Doenças Tropicais Negligenciadas que ainda persistem entre as populações com menos recursos econômicos, constituindo um importante problema de saúde pública mundial. Devido à falta de interesse comercial, poucas novidades em desenvolvimento de novos fármacos estão sendo introduzidas no mercado. A atual terapêutica para as leishmanioses é constituída majoritariamente por medicamentos utilizados para a mesma finalidade há décadas, possuindo desvantagens como: alto custo, toxicidade e aumento de casos de resistência. Além disso, vacinas eficientes para esta condição não estão disponíveis. Por isso, o desenvolvimento de tratamentos seguros, eficazes e acessíveis é considerado como prioridade pela Organização Mundial da Saúde e imprescindível no combate a esta enfermidade.

Neste estudo, utilizamos ferramentas nanotecnológicas e exploramos a biodiversidade brasileira para avaliar quatro possíveis candidatos à terapêutica da leishmaniose cutânea (LC): Carreadores Lipídicos Nanoestruturados contendo Anfotericina B, as lignanas Iangambina e Epi-Iangambina e a Própolis verde EPP-AF<sup>®</sup>, em experimentos *in vitro* e/ou *in vivo* nas infecções por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, principais agentes etiológicos da LC no Brasil, e que possuem distintos aspectos imunológicos.

Os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs) são partículas lipídicas esféricas nanométricas que vêm ganhando atenção da comunidade científica por proporcionar aumento da biodisponibilidade, liberação controlada em sítios específicos de fármacos, segurança e reduzido custo. O CLN utilizado neste trabalho foi produzido por duas empresas brasileiras: a Apis Flora Industrial e Comercial Ltda e a Eleve Pesquisa & Desenvolvimento, com custo de R\$ 5,87 produção/ampola. Assim, o estudo possui potencial inovador e poderá propor a utilização de uma nova formulação de Anfotericina B produzida no Brasil, o que contribuirá para a manutenção do seu reduzido custo.

Já a própolis verde é oriunda do sudeste brasileiro e trata-se de um composto amplamente empregado na medicina popular há séculos. Apesar de diversos estudos relatarem a capacidade leishmanicida da própolis, os mecanismos pelos quais este composto exerce esse efeito não são esclarecidos. Em trabalhos anteriores, nosso grupo demonstrou a capacidade de três extratos de própolis verde, oriundos de um extrato padronizado (EPP-AF<sup>®</sup>) e com composição química e efeito biológico reprodutíveis lote a lote, em controlar a infecção

intracelular por *L. braziliensis*, bem como modular a resposta inflamatória (REBOUCAS-SILVA et al, 2017). No atual estudo, avaliamos mais profundamente o efeito leishmanicida do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> frente à infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. amazonensis*, espécie relacionada com a leishmaniose cutânea difusa, forma rara e de difícil tratamento, associada a uma resposta imune voltada para a produção de mediadores envolvidos com a resposta do tipo Th2, levando ao desenvolvimento de lesões mais inflamatórias e altamente parasitadas.

As lignanas Iangambina e Epi-Iangambina foram isoladas das folhas de Louro de Cheiro, árvore encontrada na floresta Atlântica do Brasil. Apesar de já descritos efeitos farmacológicos e biológicos desses compostos na literatura, há poucos estudos avaliando sua ação leishmanicida, sendo a maioria deles performados diretamente em culturas axênicas, não explorando o aspecto imunomodulatório desses compostos na infecção por *Leishmania*.

Dessa forma, esse projeto possui o potencial inovador de propor novos candidatos a terapêutica da LC, além de fomentar e valorizar a busca e triagem de compostos bioativos da biodiversidade brasileira.

### 3 HIPÓTESE

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

#### 3.1 OBJETIVOS

##### 3.1.1 Objetivo geral

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

##### 3.2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a citotoxicidade dos CLN-AnB em cultura de macrófagos não infectados;
2. Testar o efeito dos CLN-AnB na infecção de macrófagos com *L. braziliensis*;
3. Avaliar a captação dos CLN-AnB por macrófagos infectados com *L. braziliensis* GFP;
4. Avaliar o efeito imunomodulatório dos CLN-AnB em macrófagos infectados com *L. braziliensis*;
5. Avaliar a capacidade de controle da infecção dos CLN-AnB em modelo experimental utilizando camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*.

## 4 MANUSCRITO I

### **Evaluation of *in vitro* and *in vivo* Efficacy of a Novel Amphotericin B-Loaded Nanostructured Lipid Carrier in the Treatment of *Leishmania braziliensis* Infection**

O trabalho avalia pela primeira vez a eficácia de um novo carreador lipídico nanoestruturado contendo Anfotericina B (CLN-AnB) no controle da infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. braziliensis*, principal agente etiológico da leishmaniose cutânea no Brasil.

#### **Resumo:**

Os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs) estão emergindo como uma abordagem promissora devido à alta capacidade de carregamento de drogas, perfil de liberação controlado dos fármacos veiculados, maior estabilidade e reduzido custo. Neste trabalho, exploramos o efeito dos CLN carregados com Anfotericina B (CLN-AnB) na infecção *in vitro* e *in vivo* por *Leishmania braziliensis*. Em nossas análises, os CLNs apresentaram-se com formato esférico com tamanho nanométrico de  $242,0 \pm 18,3$  nm. O potencial Zeta registrado foi sugestivo de alta estabilidade do carreador ( $-42,5 \pm 1,5$  mV), o qual também apresentou cerca de 99% de eficiência de encapsulamento do fármaco (EE%). Nas análises *in vitro*, observamos reduzida toxicidade do CLN-AnB, quando comparada à anfotericina livre e à anfotericina desoxicolato, além de valor de IC50 para amastigotas intracelulares semelhante à anfotericina B desoxicolato ( $11,7 \pm 1,73$ ;  $5,3 \pm 0,55$  and  $13 \pm 0,57$  ng/mL, respectivamente). As análises por microscopia confocal mostraram a captação dos CLNs por macrófagos infectados já após uma hora de incubação e sua maior entrada com 48 horas. O tratamento de camundongos BALB/c, infectados na derme da orelha, mostrou semelhante eficácia na redução do tamanho da lesão de camundongos, bem como na redução da carga parasitária do sítio de infecção entre os animais tratados com antimônio pentavalente e o CLN-AnB. Dessa forma, nossos dados sugerem que os CLN-AnB constituem uma formulação promissora de Anfotericina B para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar.

Trabalho publicado no periódico *International Journal of Nanomedicine*, em 2020.

# Evaluation of in vitro and in vivo Efficacy of a Novel Amphotericin B-Loaded Nanostructured Lipid Carrier in the Treatment of *Leishmania braziliensis* Infection

This article was published in the following Dove Press journal:  
*International Journal of Nanomedicine*

Jéssica Rebouças-Silva <sup>1,2,\*</sup>  
Maraine Catarina Tadini <sup>3,4,\*</sup>  
Danielle Devequi-Nunes <sup>1,5</sup>  
Ana Luíza Mansur <sup>3</sup>  
Paulo S Silveira-Mattos <sup>1,2</sup>  
Camila I de Oliveira <sup>2,6</sup>  
Fábio R Formiga <sup>7,8</sup>  
Andresa A Berretta <sup>9</sup>  
Franciane Marquele-Oliveira <sup>3</sup>  
Valéria M Borges <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Inflammation and Biomarkers, Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil;

<sup>2</sup>Postgraduate Program in Pathology, Faculty of Medicine of Bahia, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brazil; <sup>3</sup>Eleve Science Research and Development, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; <sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil; <sup>5</sup>Laboratory of Pharmaceutical Formulations, SENAI Institute of Innovation in Advanced Health Systems, Salvador, Bahia, Brazil; <sup>6</sup>Laboratory of Vector-Borne Infectious Diseases, Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil; <sup>7</sup>Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Recife, Pernambuco, Brazil; <sup>8</sup>Postgraduate Program in Applied Cellular and Molecular Biology, University of Pernambuco (UPE), Recife, Pernambuco, Brazil; <sup>9</sup>Laboratory of Research, Development and Innovation, Apis Flora Industrial e Comercial Ltda, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

\*These authors contributed equally to this work

Correspondence: Valéria M Borges;  
Franciane Marquele-Oliveira  
Email vborges@bahia.fiocruz.br;  
franciane.oliveira@elevescience.com.br

**Background:** Leishmaniasis is a neglected disease, and the current therapeutic arsenal for its treatment is seriously limited by high cost and toxicity. Nanostructured lipid carriers (NLCs) represent a promising approach due to high drug loading capacity, controlled drug release profiles and superior stability. Here, we explore the efficacy of a unique pH-sensitive amphotericin B-loaded NLC (AmB-NLC) in *Leishmania braziliensis* infection in vitro and in vivo.

**Methods and Results:** AmB-NLC was assessed by dynamic light scattering and atomic force microscopy assays. The carrier showed a spherical shape with a nanometric size of  $242.0 \pm 18.3$  nm. Zeta potential was suggestive of high carrier stability ( $-42.5 \pm 1.5$  mV), and the NLC showed ~99% drug encapsulation efficiency (EE%). In biological assays, AmB-NLC presented a similar IC<sub>50</sub> as free AmB and conventional AmB deoxycholate (AmB-D) ( $11.7 \pm 1.73$ ;  $5.3 \pm 0.55$  and  $13 \pm 0.57$  ng/mL, respectively), while also presenting higher selectivity index and lower toxicity to host cells, with no observed production of nitric oxide or TNF- $\alpha$  by in vitro assay. Confocal microscopy revealed the rapid uptake of AmB-NLC by infected macrophages after 1h, which, in association with more rapid disruption of AmB-NLC at acidic pH levels, may directly affect intracellular parasites. Leishmanicidal effects were evaluated in vivo in BALB/c mice infected in the ear dermis with *L. braziliensis* and treated with a pentavalent antimonial (Sb<sup>5+</sup>), liposomal AmB (AmB-L) or AmB-NLC. After 6 weeks of infection, AmB-NLC treatment resulted in smaller ear lesion size in all treated mice, indicating the efficacy of the novel formulation.

**Conclusion:** Here, we preliminarily demonstrate the effectiveness of an innovative and cost-effective AmB-NLC formulation in promoting the killing of intracellular *L. braziliensis*. This novel carrier system could be a promising alternative for the future treatment of cutaneous leishmaniasis.

**Keywords:** leishmaniasis, neglected disease, nanoparticles, drug delivery

## Introduction

Leishmaniasis is a widespread group of neglected vector-borne tropical diseases caused by *Leishmania* spp. (protozoa: Trypanosomatidae). The disease mainly manifests in two forms: visceral leishmaniasis (VL), which is potentially lethal, and the more common form, cutaneous leishmaniasis (CL). It is estimated that between 700,000 and 1,000,000 new cases are reported annually worldwide; about

95% of CL cases occur in Afghanistan, Algeria, Bolivia, Brazil, Colombia, Iran, Iraq, Pakistan, the Syrian Arab Republic and Tunisia.<sup>1</sup> In Brazil, CL mainly arises from *Leishmania braziliensis*, which can induce ulcerating lesions often characterized by crusted papules in the human host.<sup>2,3</sup>

Pentavalent antimonials (Sb<sup>5+</sup>) have been employed as the first-line of treatment against leishmaniasis since the 1940s.<sup>4</sup> However, Sb<sup>5+</sup> therapy presents several limitations, such as systemic side effects, cardiac, renal and hepatic toxicity and a prolonged course of therapy (20–30 days). In addition, increasing evidence of variable efficacy and higher numbers of resistant cases has prompted the development of novel therapies.<sup>5–10</sup>

Amphotericin B (AmB) is the second-line drug of choice for leishmaniasis treatment in Brazil. Despite being considered the most effective antileishmanial commercially available, AmB is also one of the most toxic compounds utilized in clinical practice.<sup>11,12</sup> Among the lipid formulations developed to mitigate the toxic effects caused by conventional AmB (AmB-deoxycholate), the liposomal formulation of AmB (Ambisome<sup>®</sup>) presents the lowest toxicity, and has therefore been recommended by the Brazilian Ministry of Health as a first-line drug for VL treatment in priority groups.<sup>13</sup> However, its wide clinical use in the treatment of CL has been restricted by high cost, which also limits its application in large-scale clinical trials designed to test safety and efficacy.

The present study developed and tested Nanostructured Lipid Carriers (NLC) loaded with AmB (AmB-NLC) to evaluate efficacy as candidates for CL treatment. NLCs are spherical lipid particles, sized 10–1000 nm, with a lipid nanoparticle formulation consisting of a solid lipid core matrix mixed with liquid lipids. NLCs have gained prominence due to increased bioavailability, improvements in controlled drug release at specific sites, the non-use of organic solvents or high concentrations of surfactants, physical stability over longer periods and feasibility of production on an industrial scale.<sup>14,15</sup>

The development and characterization of AmB-NLC has been previously demonstrated by our group, with outstanding results achieved in terms of sustained release and reduced AmB cytotoxicity, probably related to the poly-aggregate drug form.<sup>16</sup> The particle presents a sustained controlled release profile of up 46 h at pH 7.4, with faster disruption in acidic environments (pH 5), and presents a target-driven effect due to the phospholipid nanoparticle composition employed. In this context, AmB-NLC

represents an innovative new approach to AmB treatment in leishmaniasis and fungal infections.

In clinical use, despite recent advances in the literature employing new pharmaceutical forms of AmB, this drug is conventionally administered by intravenous route. The development of lipid carrier delivery systems has made new routes of AmB administration possible, including oral, topical and intraperitoneal.<sup>17–19</sup> Ammar et al employed AmB-loaded PLGA to treat cutaneous leishmaniasis by topical therapy, with controlled drug release demonstrated by this carrier system.<sup>20</sup> Few studies have intraperitoneally administered AmB via lipid carrier to treat leishmaniasis.<sup>17,18</sup> The AmB lipid carrier developed by De Carvalho et al to treat cutaneous leishmaniasis demonstrated efficacy and significantly greater reduction in parasitic burden compared to AmB-deoxycholate.<sup>17</sup>

Here we show that AmB-NLC, with a pH-sensitive design, was able to significantly reduce the rate of *L. braziliensis* infection in vitro, as well as lesion development in vivo in a BALB/c mouse model. Accordingly, our data suggest that AmB-NLC constitutes a promising new and potentially safer and cheaper formulation of AmB for CL treatment.

## Materials and Methods

### Material and Reagents

To produce AmB-NLC, the liquid lipid extract of MCT (medium-chain triacylglycerides) and a surfactant were acquired from Lipoid GMBH (Ludwigshafen, Germany), while solid stearic acid lipid nanoparticles, the co-surfactant of sodium cholate hydrate and Triton<sup>™</sup> X-100 were all acquired from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Polyethylene glycol 400 co-surfactant was acquired from Cosmo Química (São Paulo, SP, Brazil), and antioxidant vitamin E was obtained from Tovani Ltda (São Paulo, SP, Brazil). The active compound of amphotericin B was acquired from North China Pharmaceutical Huasheng (Hong Kong, China), and Amphotericin B reference medicine was acquired from União Farmacêutica Nacional S/A- Unianf<sup>®</sup> (Embu-Guaçu, SP, Brazil). The liposomal formulation of Amphotericin B (Ambisome<sup>®</sup>) was acquired from United Medical Ltda (São Paulo, SP, Brazil). The other reagents employed herein were Schneider's insect medium, lipopolysaccharide (LPS), IFN- $\gamma$  and Resazurin sodium salt, all obtained from SIGMA-Aldrich (St Louis, MO, USA). Lactate Dehydrogenase (LDH) Cytotoxicity Detection Kit and Nutridoma<sup>™</sup>-SP were obtained from Roche Diagnostics GmbH (Sandhofer Strasse,

Mannheim, Germany). Inactive Fetal bovine serum (FBS), RPMI 1640 medium and RPMI 1640 medium without phenol red, Geneticin<sup>®</sup> antibiotic and penicillin were purchased from GIBCO (Carlsbad, CA, USA). Streptomycin, L-glutamine and DAPI were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Lumogen Red F300<sup>®</sup> (0.02%<sub>w/v</sub>) was purchased from BASF (Ludwigshafen, Germany). A Human TNF- $\alpha$  DuoSet Elisa kit was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

## NLC Production

A previously established proportion of ingredients was used to formulate AmB-NLC.<sup>16</sup> Initially, NLC was produced by hot microemulsion ( $65 \pm 5^\circ\text{C}$ ), consisting of a blend of liquid and solid lipids, a surfactant and co-surfactants, using the method described by Tadini et al.<sup>16,21</sup> To obtain AmB-NLC, amphotericin B (0.1%) and the antioxidant (0.005%) were added to a hot microemulsion under stirring at 150 rpm. The microemulsion containing the drug was then diluted in cold water ( $1-4^\circ\text{C}$ ) under homogenization (IKA - TURRAX T25). Empty NLC ( $\emptyset$ -NLC) was prepared in the absence of amphotericin B. The above-described procedure resulted in the formation of nanostructured lipid carriers suspended in water, which were subsequently physicochemically characterized. NLC-AmB and  $\emptyset$ -NLC containing Lumogem Red F300 (employed only in the Uptake assessment) were prepared by adding the fluorophore (0.02% w Lumogem/w lipid phase) by hot microemulsion.<sup>22</sup> In sequence, the same steps were performed for the NLC preparation. All resulting suspensions were employed in biological testing.

## AmB-NLC Physicochemical Characterization

### Dynamic Light Scattering

An aliquot of 100  $\mu\text{L}$  of AmB-NLC was diluted 1000-fold in deionized water. The diluted suspension was analyzed by Zetasizer Nano ZS dynamic light scattering (DLS) equipment (Malvern Panalytical). Z-average particle size, polydispersity index and Zeta Potential were measured by optical path. All measurements were taken at room temperature ( $\sim 24^\circ\text{C}$ ) and performed in triplicate.

### Atomic Force Microscopy

To perform microscopic characterization using an atomic force microscope (Shimadzu, SPM-9600), AmB-NLC was first diluted 100-fold in deionized water and the diluted suspension was placed on mica plates (200  $\mu\text{L}$ ). Analysis was performed after the sample dried.

## Drug Content

The analysis employed herein was performed using a HPLC-DAD (Shimadzu, Kyoto, Japan) in accordance with the method previously described by Tadini et al, which was previously validated by our group in accordance with the European Medicines Agency (EMA) guideline on Bioanalytical Method Validation.<sup>16,23</sup>

The guard column (3.0 mm x 4.6mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ) was coupled to a Ascentis Express Fused Core C<sub>18</sub> chromatographic column (100 mm x 4.6 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ), both acquired from Supelco (St. Louis, MO, USA). Analyses were carried out at  $30^\circ\text{C}$  under ambient yellow light. The flow rate was set to 1 mL/min in isocratic mode, with 70% of methanol and 30% of an aqueous solution containing 0.1% of formic acid. The injection volume was 10  $\mu\text{L}$ . Carbamazepine was used as the internal standard (25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Amphotericin B and carbamazepine were detected at wavelengths of 407 nm and 285 nm, respectively. The analytical curve range was 5.0–60.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , applying a weighting factor of 1/x.

## Entrapment Efficiency

Aliquots of 1.00 mL of AmB-NLC suspension were transferred to a vial and centrifuged at  $14,000 \times g$  for 30 min using a Hitachi RX II (Hitachi) centrifuge at a controlled temperature of  $4^\circ\text{C}$ . Sample aliquots (100  $\mu\text{L}$ ) were diluted 10-fold in methanol, mixed and submitted to HPLC-DAD analysis. Concentrations of free Amphotericin B ( $C_{\text{FreeAmB}}$ ) were determined using the previously generated analytical curve.  $C_{\text{TotalAmB}}$ , referring to the total mass of amphotericin B in the suspension of AmB-NLC, was quantified using the analytical curve. Entrapment efficiency was calculated using the equation below:<sup>16</sup>

$$EE(\%w/w) = \frac{C_{\text{TotalAmB}} - C_{\text{FreeAmB}}}{C_{\text{TotalAmB}}} * 100$$

## Antileishmanial Positive Controls

For comparison purposes, we tested the effects of the following first- and second-line antileishmanials recommended by the Brazilian Ministry of Health: Glucantime<sup>®</sup>, a meglumine antimonate ( $\text{Sb}^{5+}$ ), Unianf<sup>®</sup>, a micellar formulation of amphotericin B deoxycholate (AmB-D) and Ambisome<sup>®</sup>, a liposomal formulation of amphotericin B (AmB-L).<sup>24</sup> In addition, the active compound of amphotericin B (AmB) was used as control in its free state.

## Ethics Statement

Male BALB/c mice aged 6–8 weeks were obtained from the animal care facility at the Gonçalo Moniz Institute (IGM-FIOCRUZ), located in the city of Salvador, Bahia-Brazil. All animal experimentation was conducted in accordance with the Guidelines for Animal Experimentation established by the Brazilian Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). The present study received approval from the local institutional review board (CEUA protocol no.: 018/2017, IGM/FIOCRUZ).

## Parasites

Wild-type *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) ( $1 \times 10^6$ ) were cultured in Schneider's insect medium supplemented with 10% inactive Fetal Bovine Serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine in 25 cm<sup>2</sup> flasks at 24°C for 6 days. Promastigotes of *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) ( $1 \times 10^6$ ) modified to express green fluorescent protein (GFP) were cultured at 24°C in Schneider's Insect medium supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin-streptomycin-glutamine and 50 µg/mL of Geneticin<sup>®</sup> antibiotic (G418).<sup>25</sup> *Leishmania braziliensis* GFP was exclusively employed in uptake assessment assays.

## Macrophage Toxicity Assay

Bone-marrow derived macrophages (BMDM) were obtained from BALB/c mice femurs and cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 7 days in RPMI medium supplemented with 20% FBS, 100U/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin, 2mM L-glutamine and 20% L929 cell culture supernatant (a source of macrophage colony-stimulating factor). Next, differentiated BMDM were harvested using cold saline solution. BMDM ( $2 \times 10^5$ /well) were plated on 96-well plates and cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-supplemented medium for 24 hours. BMDM were then treated with either AmB, AmB-D, AmB-L or AmB-NLC at varying concentrations (8–0.0078 µg/mL) at 37°C for 48h. Next, cells were reincubated for another 4h with supplemented RPMI medium containing 10% Resazurin sodium salt. Absorbance was read at 570 nm and 600 nm using a spectrophotometer (SPECTRA Max 190). Uninfected BMDM cultures supplemented RPMI medium (Medium) and empty Nanostructured Lipid Carriers (Ø-NLC) were as used as controls.

Measurements of cytoplasmic lactate dehydrogenase (LDH) enzyme activity were performed by plating

BMDM ( $2 \times 10^5$ /well) on 96-well plates, followed by culturing at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in RPMI medium without phenol red, supplemented with 1% Nutridoma instead of FBS. BMDM were then treated as described above. Next, cells were centrifuged at 250×g and the cell-free culture supernatant was used to spectrophotometrically measure LDH activity using a commercial LDH Cytotoxicity Detection Kit. According to the manufacturer's instructions, absorbance was recorded at 490 nm using a spectrophotometer (SPECTRA Max 190). Total LDH activity was determined by lysing the cells with 1% Triton X-100. The percentage of LDH release was calculated as follows: [(LDH sample – Blank LDH) × 100]/total LDH.

## Determination of AmB-NLC IC<sub>50</sub> by Assessing *L. braziliensis* Intracellular Viability

BMDM were isolated as described above and  $10^5$  cells/well were seeded on 96-well plates in supplemented RPMI medium. Macrophages were then infected (10 : 1) with stationary-phase *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) promastigotes for 24h. Next, macrophage cultures were washed 2x with saline to remove non-internalized parasites and treated with varying concentrations (250–3.9 ng/mL) of AmB, AmB-D or AmB-NLC for 48h. After the medium was replaced with 0.2 mL of supplemented Schneider's insect medium, cells were cultured at 24°C for an additional 6 days, after which the number of viable parasites was determined by direct counting. The obtained IC<sub>50</sub> corresponding to each of the treatments was validated as follows: BMDM were plated at a density of either  $10^5$ /well on 96-well plates (parasite viability) or  $2 \times 10^5$ /well on 24-well plates with glass coverslips (parasite counts via microscopy). Cells were then infected and treated with the corresponding IC<sub>50</sub> concentrations of each of the compounds as described above. Coverslips were stained with hematoxylin and eosin to calculate infection index (percentage of infected cells x mean number of amastigotes per cell), as determined by random counts of 200 cells/field on each glass coverslip under optical light microscopy.

## Uptake Assessment of AmB-NLC by Macrophages

BMDM ( $10^5$ /well) were seeded on glass coverslips and cultured overnight at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Next, cells were

infected with stationary-phase *Leishmania braziliensis* GFP promastigotes for 24h. After washing 2x with saline, cells were treated at a dilution of 1:200 (~4 mg/mL) of AmB-NLC or  $\emptyset$ -NLC containing the fluorochrome Lumogen Red F300. Plates were then incubated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 1, 2, 24 or 48h. After each treatment time, cells were washed 2x with 1x PBS and fixed with a 4% paraformaldehyde solution. Coverslips were then labeled with DAPI (Invitrogen) and kept protected from light at -20°C until analysis by spectral confocal microscopy (SPS TC8, Leica Microsystems, Germany).

## Nitric Oxide and TNF- $\alpha$ Level Quantification

BMDM (10<sup>6</sup>/well) were stimulated with IFN- $\gamma$  (100 UI/mL) for 24h and infected with stationary-phase *Leishmania braziliensis* promastigotes for an additional 24h. Macrophages were then washed twice to remove any non-internalized parasites, the RPMI cell medium was replaced and IFN- $\gamma$  stimulation was reapplied along with the obtained IC<sub>50</sub> concentrations of AmB, AmB-D and AmB-NLC, or  $\emptyset$ -NLC, for 48h (Table 1). After collecting culture supernatants, the Griess reaction was used to measure nitric oxide (NO) production. Production levels were measured in culture supernatants using a Human TNF- $\alpha$  DuoSet Elisa kit (R&D), in accordance with the manufacturer's instructions.

## In vivo Evaluation

BALB/c mice were inoculated with stationary-phase *L. braziliensis* promastigotes (10<sup>5</sup> parasites in 10 $\mu$ L of saline) in the left ear dermis using a 30G needle, according to the model described by Moura et al.<sup>26</sup> The animals were divided into four experimental groups (n = 12) at 3 weeks post-infection and treated intraperitoneally with seven doses (6mg/kg/day) of: 1)  $\emptyset$ -NLC; 2) AmB-NLC or 3) AmB-L (Ambisome<sup>®</sup>) on alternating days (14-day total treatment period). In parallel, 4) another experimental group of mice received Sb<sup>5+</sup> (Glucantime<sup>®</sup> at 100mg/Sb<sup>5+</sup>/kg/day) intraperitoneally five times a week for 5 weeks.<sup>27</sup> Lesion development was monitored weekly for 10 weeks using an analog caliper (Kroeplin, *Schlüchtern*, GER). Mouse ear lesion size development was considered successful when ~1 mm, with a nodular and ulcerated presentation, in accordance with the model previously described by Moura et al.<sup>26</sup> At six and 10 weeks post-infection, half of the mice in each group were euthanized with a lethal dose of sodium thiopental (100 mg/kg, intraperitoneally), after which the ears and draining

lymph nodes (dLN) near the site of infection were aseptically removed and homogenized in supplemented Schneider's medium. These homogenates were serially diluted and seeded onto 96-well plates. Parasite load was determined using a limiting-dilution assay, as described by Titus et al.<sup>28</sup> The number of viable parasites was determined using the lowest concentration at which promastigotes were able to grow after 2 weeks of incubation in a BOD incubator at 24°C.

## Histological Analysis

The postmortem aseptic removal of mouse ears was performed at six or 10 weeks post-infection, followed by fixing in 10% formaldehyde. Tissues were then embedded in paraffin, 5- $\mu$ m-thick sections were stained with hematoxylin and eosin and subsequently analyzed by light microscopy.

## Statistical Analysis

Data are represented as the average of 3–4 independent experiments (mean  $\pm$  SEM) performed at least in triplicate, or a representative experiment performed in vivo with 12 animals/group (mean  $\pm$  SD) (Figure legends indicate the respective number of experiments performed). The Kruskal–Wallis non-parametric test was used for multiple comparisons and comparisons between two groups were performed by Mann–Whitney non-parametric test. Sigmoidal dose–response curves were used to determine mean inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) values relative to intracellular parasite viability, as well as cytotoxicity concentration implying 50% cell viability (CC<sub>50</sub>). Values representative of selectivity index (SI), which indicates how selective a compound is relative to parasite versus macrophages, were calculated using CC<sub>50</sub>: IC<sub>50</sub> ratios. Analyses were performed using GraphPad Prism v 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California). Results were considered statistically significant when p < 0.05.

## Results

### AmB-NLC Physicochemical Characterization

AFM images of AmB-NLC (Figure 1) illustrate the morphological characteristics of the obtained nanoparticle. The particle was spherical in shape and the observed nanometric particle Z-average size of 242.0  $\pm$  18.3 nm corroborated DLS analysis. AmB-NLC exhibited

a characteristic polydispersity index (PDI) of  $0.44 \pm 0.02$  and a Zeta potential of  $-42.5 \pm 1.5$  mV (Table 1).

The HPLC-DAD analysis revealed an AmB content of  $1.02 \pm 0.05$  mg mL<sup>-1</sup> in AmB-NLC, which corresponded to the amount of active compound added to the formulation. The resulting entrapment efficiency was ~99%, indicating that the lipid carrier was capable of encapsulating all available AmB (Table 1).

## AmB-NLC Presents Low Toxicity to Uninfected Macrophages

The cytotoxicity of amphotericin B formulations to uninfected macrophages was assessed by resazurin reduction assay (Figure 2) and by Lactate dehydrogenase activity (Supplementary Figure 1) in the supernatants of macrophages treated at concentrations ranging from 0.0078 to 8 µg/mL. After 48h of treatment, the highest tested concentrations of AmB and AmB-D were found to reduce cell viability by 66% and 40%, respectively, compared to Medium ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.01$ , respectively). By contrast, no cytotoxic effects were observed in cells treated at identical concentrations with AmB-NLC and Ø-NLC (Figure 2). In addition, a significant increase in LDH levels in AmB-treated macrophages at the highest concentrations tested ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ ) indicated cell damage as evidenced by loss of plasma membrane integrity (Supplementary Figure 1).

Accordingly, the highest CC<sub>50</sub> value for uninfected macrophages was obtained using AmB-NLC ( $12.34 \pm 2.67$  µg/mL), compared to the other tested formulations:  $4.31 \pm 2.66$  and  $10.79 \pm 1.54$  µg/mL for AmB and AmB-D, respectively (Table 2).

## AmB-NLC Reduces Intracellular *L. braziliensis* Viability in a Dose-Dependent Manner

Next, we evaluated the efficacy of AmB-NLC in reducing intracellular *L. braziliensis* viability. After 48h of treatment, both AmB and AmB-NLC significantly reduced the number of viable parasites by 84% and 70%, respectively, beginning at a concentration of 31.2 ng/mL ( $p < 0.0001$

and  $p < 0.05$ , respectively) (Figure 3A). AmB-D was also shown to significantly reduce the number of viable parasites recovered in a similarly dose-dependent manner ( $\geq 62.5$  ng/mL,  $p < 0.01$ ). No significant antileishmanial effect was detected using Ø-NLC.

The IC<sub>50</sub> values found for AmB, AmB-D and AmB-NLC were  $5.3 \pm 0.55$ ;  $13 \pm 0.57$  and  $11.7 \pm 1.73$  ng/mL, respectively (Table 2). We then validated the obtained IC<sub>50</sub> values by analyzing the leishmanicidal effect on infected AmB-treated macrophages using the infection index described above in Materials and Methods. Our data showed similar infection rates across all three tested AmB treatments, with statistically significant results compared to the control (Medium) ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ ) (Figure 3B). Treatment with AmB-D and AmB-NLC similarly affected promastigote viability in infected macrophages (85.9% and 81.6% growth inhibition, respectively), with the highest efficacy observed for AmB (90.2% inhibition) ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ ) (Figure 3C).

AmB-NLC was not only found to present the highest CC<sub>50</sub> value in our comparisons, but also had the highest SI value (1046) in comparison to AmB (813) and AmB-D (830) (Table 2). In sum, AmB-NLC appears to effectively reduce parasite load and presents low toxicity to macrophages, the main host cell of *Leishmania*.

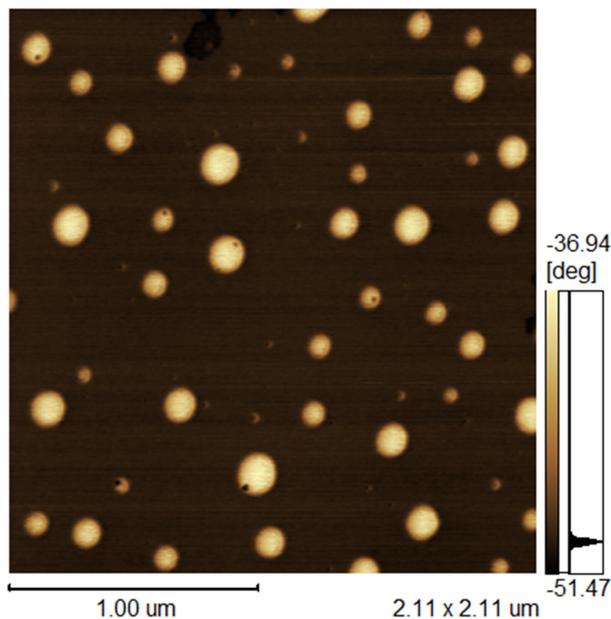
## Rapid Uptake of NLCs by *L. braziliensis*-Infected Macrophages

The ability of NLCs to cross the membrane of the GFP mutant *L. braziliensis*-infected macrophage was evaluated by treatment kinetics at 1, 2, 24 and 48 h. After 1 h of treatment at 4µg/mL, NLCs were detectable in the macrophage cytoplasm (Figure 4). Greater fluorescence intensity of NLCs (shown in red) was seen at the highest tested concentration, which increased over time. The colocalization of nanoparticles with amastigote forms was also evident (shown in green). Reduced parasite fluorescence was observed in the presence of AmB-NLC over time, which further reinforces our previous finding that AmB-NLC effectively reduces intracellular parasite viability. The intracellular fluorescence intensity

**Table 1** AmB-NLC Characterization

Diameter	PDI <sup>a</sup>	Zeta Potential	Amphotericin B Amount	EE <sup>b</sup>
$242.0 \pm 18.3$ nm	$0.44 \pm 0.02$	$-42.5 \pm 1.5$ mV	$1.02 \pm 0.05$ mg mL <sup>-1</sup>	~ 99%

**Abbreviations:** <sup>a</sup>PDI, polydispersity index; <sup>b</sup>EE, entrapment efficiency.



**Figure 1** Atomic force microscopy of AmB-NLC.

**Abbreviation:** AmB-NLC, amphotericin B-loaded nanostructured lipid carrier.

of both NLCs was similar at 2 h and 48 h of treatment, compared to 1 h and 24 h, respectively ([Supplementary Figure 2](#)).

## Modulation of Nitric Oxide and TNF- $\alpha$ Production by Different Amphotericin B Formulations

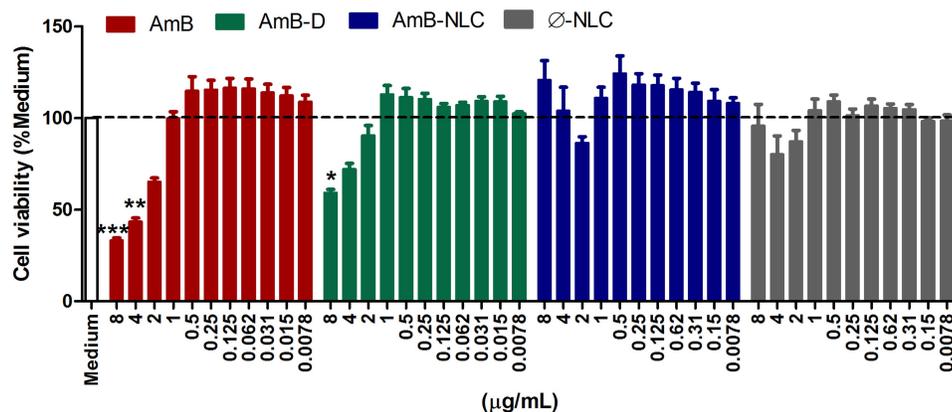
The leishmanicidal effects of amphotericin B on nitric oxide (NO) and TNF- $\alpha$  production by INF- $\gamma$ -activated

uninfected or infected murine macrophages were assessed in vitro ([Figure 5](#)). Among all tested amphotericin B formulations at IC<sub>50</sub> concentrations, only AmB was found to significantly increase both NO and TNF- $\alpha$  production in activated *L. braziliensis*-infected macrophages compared to the infected control (INF) ( $p < 0.01$ ) ([Figure 5A](#) and [B](#), respectively). As expected, no nitric oxide or TNF- $\alpha$  production was detected following treatment with  $\emptyset$ -NLC.

## AmB-NLC Treatment Reduces Lesion Size and Parasite Load in vivo

The effects of AmB-NLC on *L. braziliensis* infection were evaluated in vivo. Mice were inoculated in the left ear dermis with *L. braziliensis* promastigotes and treated intraperitoneally 3 weeks later with Sb<sup>5+</sup> (Glucantime<sup>®</sup>), AmB-L (Ambisome<sup>®</sup>), AmB-NLC or  $\emptyset$ -NLC, as described in Materials and Methods.

The animals treated with AmB-NLC had the smallest ear lesion size of all treated mice ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ ) ([Figure 6A](#)). Histopathological analysis showed an intense inflammatory cell infiltrate consisting mainly of lymphocytes and macrophages, characteristic of chronic inflammation, in the ears of the animals in both the  $\emptyset$ -NLC and AmB-L groups ([Figure 6B](#)). On the other hand, the animals that received Sb<sup>5+</sup> or AmB-NLC treatment showed milder inflammatory cell infiltrate ([Figure 6B](#)). Lower parasitic loads were seen in the ears of mice that received either AmB-NLC or Sb<sup>5+</sup> ( $p < 0.05$ ) ([Figure 6C](#)). Surprisingly, AmB-L treatment



**Figure 2** AmB-NLC cytocompatibility in vitro. Macrophages were treated with AmB, AmB-D or AmB-NLC (8–0.0078  $\mu\text{g/mL}$ ) for 48h. Cell viability was determined by Resazurin sodium salt reduction percentage. Supplemented RPMI Medium (Medium) and empty carriers ( $\emptyset$ -NLC) were used as controls. Bars represent  $\pm$  SEM of two experiments. Kruskal–Wallis nonparametric testing, followed by Dunn’s multiple comparison post-test, were used for comparisons between experimental groups (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.0001$ ).

**Abbreviations:** AmB, active compound of amphotericin B; AmB-D, deoxycholate amphotericin B; AmB-NLC, amphotericin B-loaded nanostructured lipid carrier; RPMI, cell culture medium developed at Roswell Park Memorial Institute; SEM, standard error of the mean.

**Table 2** IC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> and Selective Index (SI) of Different Amphotericin B Formulations

Compound	Amastigote IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ± SEM <sup>b</sup> (ng/mL)	Macrophage CC <sub>50</sub> <sup>c</sup> ± SEM (µg/mL)	SI <sup>d</sup>
AmB	5.3 ± 0.55 *	4.31 ± 2.66	813
AmB-D	13 ± 0.57	10.79 ± 1.54	830
AmB-NLC	11.7 ± 1.73	12.34 ± 2.67	1046

**Note:** \*Indicate statistically significant differences ( $p = 0.0210$ ) in relation to AmB-D (deoxycholate amphotericin B).

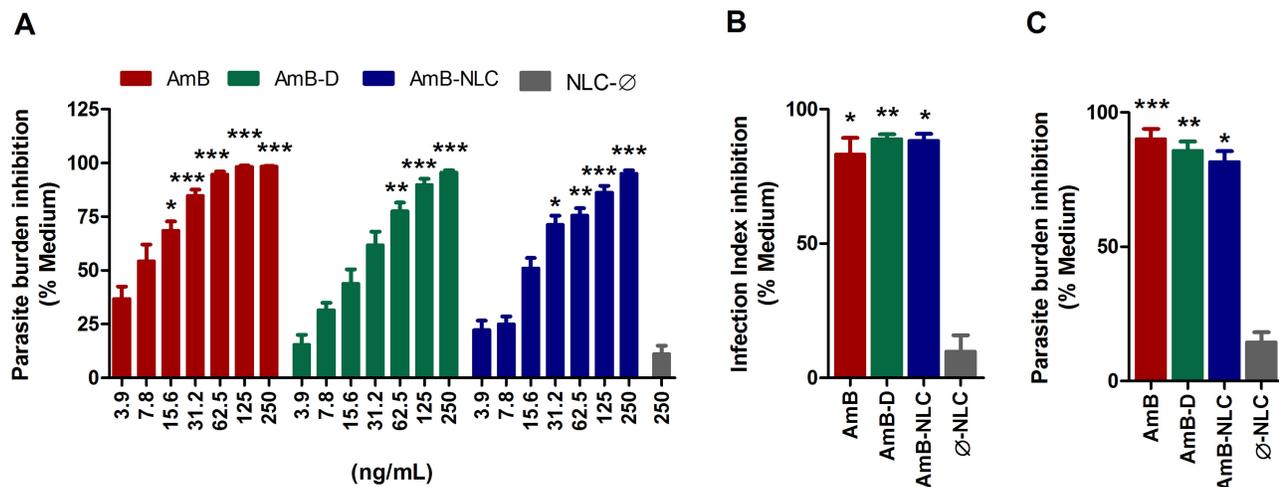
**Abbreviations:** <sup>a</sup>IC<sub>50</sub>, half-inhibitory concentration. Concentration needed to inhibit a given biological process by half; <sup>b</sup>SEM, standard error of the mean; <sup>c</sup>CC<sub>50</sub>, 50% cytotoxic concentration, the concentration needed reduce cell viability by 50%; <sup>d</sup>SI, selectivity index. Macrophage CC<sub>50</sub>/amastigote intracellular IC<sub>50</sub>

did not effectively reduce *L. braziliensis* parasite burden or lesion size. None of the treatments evaluated reduced parasitic load in the dLNs near the site of infection (Figure 6D). A previous pilot study using Ø-NLC as well as the dilution vehicle (Dextrose 5%) to treat animals ( $n = 5$  animals/group) revealed no differences between these groups, as evidenced by nodular and ulcerated ear lesions measuring approximately 1.0 mm in size (Supplementary Figure 3). Thus, in the above in vivo experiment ( $n = 12$  animals/group), the dilution vehicle control group was replaced by the Ø-NLC treated group, simply in an effort to reduce the number of animals used in the study.

## Discussion

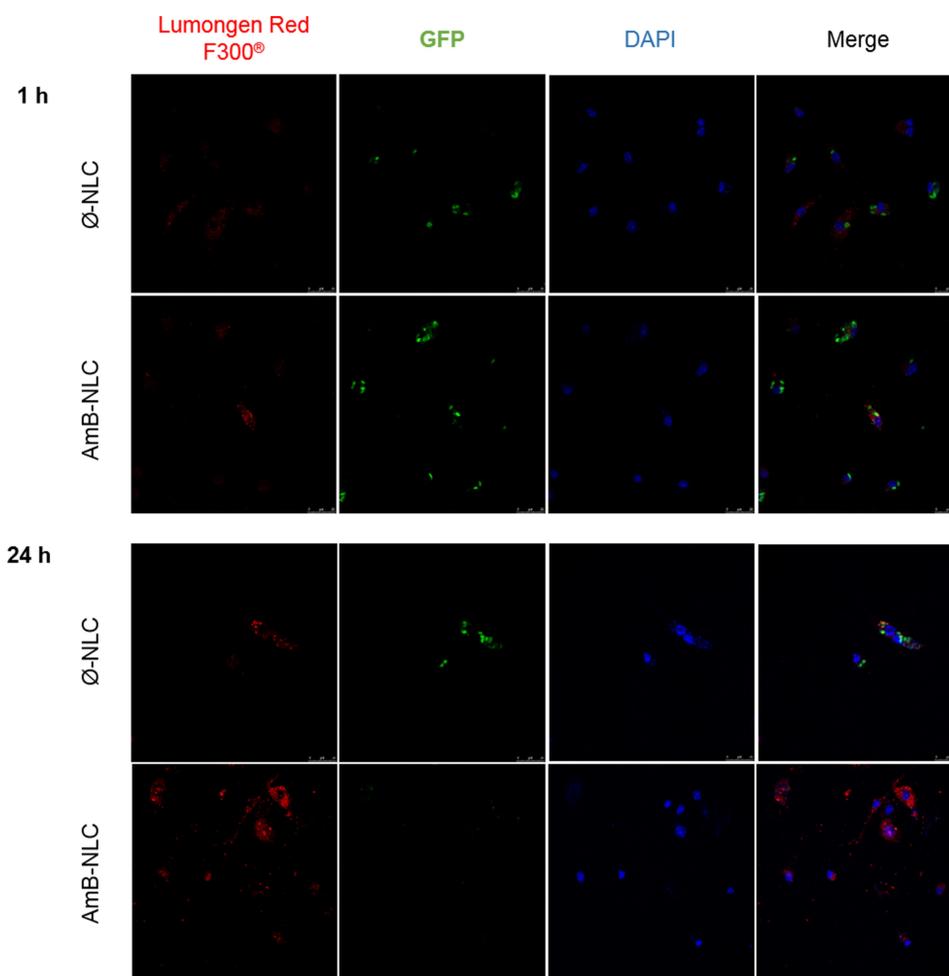
Nanotechnology-based stable drug delivery systems represent a key strategy in the search for more effective and less toxic leishmanicidal drugs. Here we investigated for the first time the leishmanicidal potential of nanostructured lipid carriers loaded with Amphotericin B (AmB-NLC), the most potent leishmanicidal drug currently commercially available, in *L. braziliensis* infection in vitro and in vivo.<sup>11</sup> Besides demonstrating promising effects in controlling infection both in vitro and in vivo, the manufacture of AmB-NLC in Brazil would also be more cost-effective than currently available technological formulations, eg, liposomal, which can cost as much as US\$ 400/ampoule (Ambisome<sup>®</sup>), thereby limiting treatment in poor countries.<sup>29</sup>

Physical analysis indicated that AmB-NLC presents a spherical shape, with a homogenous size and distribution in solution despite the obtained polydispersity index (PDI) value of  $0.44 \pm 0.02$  (results closer to 0 indicate greater homogeneity).<sup>30</sup> Since no filtration system was used to segregate particles of larger size, we considered the resulting PDI value to be satisfactory. In addition, other approaches on an industrial scale could be employed to decrease NLC-AmB PDI values. Particles with a non-spherical shape can suffer from low drug encapsulation efficiency, as well as deficiencies in particle transport and drug release, which can affect the biodistribution,



**Figure 3** Leishmanicidal effect of AmB-NLC on intracellular *L. braziliensis* viability. (A) Dose-dependent effect of AmB-NLC on intracellular *L. braziliensis* viability: macrophages were infected with *L. braziliensis* and treated with either AmB, AmB-D or AmB-NLC (250–3.9 ng/mL) for 48h. Leishmanicidal effects at IC<sub>50</sub> concentrations of different amphotericin B formulations: (B) Parasite burden; (C) Infection Index. Supplemental RPMI Medium (Medium) and empty carriers (Ø-NLC) were used as controls. Bars represent ± SEM of two or four experiments. Kruskal–Wallis nonparametric testing, followed by Dunn’s multiple comparison post-test, were used for comparisons between experimental groups, while the Mann–Whitney non-parametric t-test was used for comparisons between two groups (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.0001$ ).

**Abbreviations:** AmB, active compound of amphotericin B; AmB-D, deoxycholate amphotericin B; AmB-NLC, amphotericin B-loaded nanostructured lipid carrier; IC<sub>50</sub>, half-inhibitory concentration; RPMI, cell culture medium developed at Roswell Park Memorial Institute; SEM, standard error of the mean.



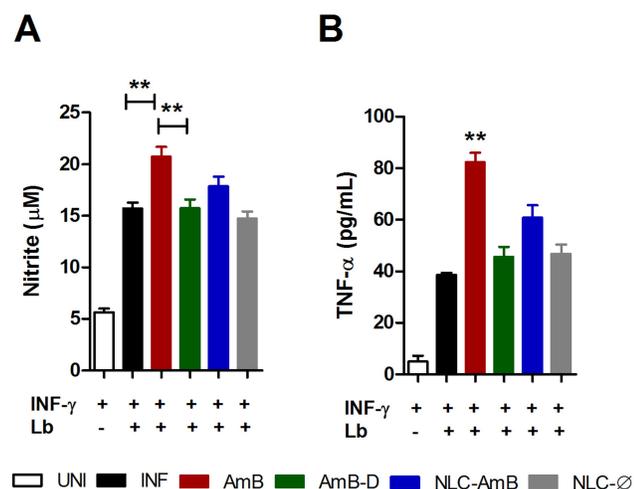
**Figure 4** Intracellular delivery of NLC. Confocal microscopy of GFP mutant *L. braziliensis*-infected macrophages treated with Ø-NLC or AmB-NLC at 4 µg/mL for 1 or 24 h. Blue: nuclei stained with DAPI; Green: GFP mutant *L. braziliensis*; Red: Lumongen Red F300® fluorochrome-containing NLCs.

**Abbreviations:** AmB-NLC, amphotericin B-loaded nanostructured lipid carrier; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride; GFP, green fluorescent protein; RPMI, cell culture medium developed at Roswell Park Memorial Institute; Ø-NLC, empty nanostructured lipid carrier.

pharmacokinetic and target-driven delivery properties.<sup>31</sup> Moreover, the small average size of AmB-NLC ( $242.0 \pm 18.3$  nm) is also pharmacokinetically advantageous, since this facilitates the transport of small particles through biological barriers and provides an increased microenvironment contact surface.<sup>32</sup> The Zeta potential, a measure of the electric potential of particles in a diffuse layer, of AmB-NLC ( $-42.5 \pm 1.5$  mV) was predictive of its stability in aqueous suspension, and indicates a reduced tendency to form agglomerates over the long term; ideal Zeta Potential values range between  $|30|$  and  $|60|$  mV.<sup>33</sup> Furthermore, AmB-NLC was designed with a unique and innovative phospholipid composition in order to be pH-sensitive, thereby conferring the ability to target infectious tissues. A previous study by our group showed that AmB-NLC presents controlled sustained release profile (up to

46 hours) at physiological pH (7.4), as well as faster disruption in acidic environments (pH 5), lending a target-driven release characteristic to this AmB delivery system. Moreover, the developed nanoformulation more efficiently protected AmB from degradation in acidic environments compared to a micellar formulation (AmB-D).<sup>16</sup> Considering that parasitophorous vacuoles, structures that allow parasites to survive and develop inside the host cell, are acidic compartments (pH 4.74 to 5.26), nanocarriers offering a stable, controlled and target drug release, such as AmB-NLC, hold promising potential for intracellular *Leishmania* control in acidified pH environments.<sup>34</sup>

Our evaluation of cytotoxicity in vitro indicated that AmB-NLC presents lower toxicity to macrophages than free AmB (raw material) or AmB-D (Unianf®). Tadini et al (2017) observed that AmB-NLC also had reduced



**Figure 5** Modulation of nitric oxide and TNF- $\alpha$  production by different amphotericin B formulations. *L. braziliensis*-infected macrophages were treated with respective IC<sub>50</sub> concentrations of AmB, AmB-D or AmB-NLC in the presence of IFN- $\gamma$  for 48 h. (A) TNF- $\alpha$  levels measured by ELISA (B) Nitric oxide production determined by nitrite levels through the Griess reaction. Bars represent means  $\pm$  SD of one representative experiment for TNF- $\alpha$  and means  $\pm$  SEM of four experiments for NO. Kruskal–Wallis nonparametric testing, followed by Dunn’s multiple comparison post-test (\*\*p<0.01).

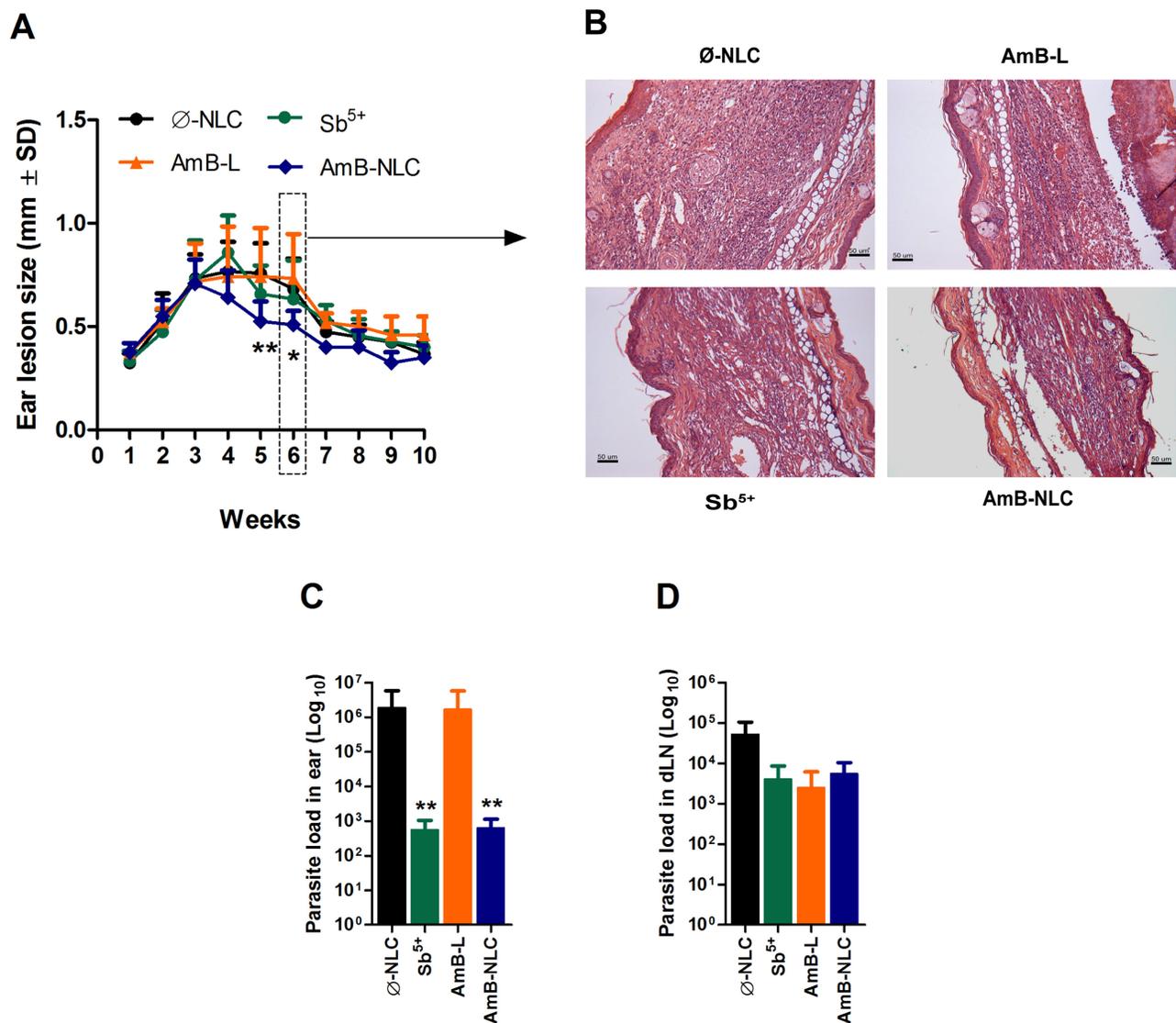
**Abbreviations:** AmB, active compound of amphotericin B; AmB-D, deoxycholate amphotericin B; AmB-NLC, amphotericin B-loaded nanostructured lipid carrier; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; INF, infected; NO, nitric oxide; SD, standard deviation; SEM, standard error of the mean; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; UNI, uninfected.

cytotoxic effects on L929 mouse fibroblasts after 24 h or 48 h treatment, in comparison to AmB and AmB-D. On the other hand, we found that *L. braziliensis*-infected macrophages exposed to AmB-NLC reduced the rate of infection similarly to AmB-D, as demonstrated by the comparable IC<sub>50</sub> values obtained for both compounds. This result seems promising, given that clinically approved AmB lipid formulations generally require higher concentrations provide efficacy comparable to AmB-D in vitro.<sup>35,36</sup> AmB is known to reduce parasite viability at low concentrations and presents 10-fold greater affinity for ergosterol in parasite cell membranes than cholesterol in mammalian cells.<sup>37,38</sup> It follows that the controlled release profile of AmB-NLC could reduce the levels of available free AmB over time, which could lessen toxic effects on host cells, while still effectively controlling infection. In addition, the intracellular delivery of fluorochromic-associated NLCs was found to be efficient even at the earliest treatment time (1h). Rapid AmB-NLC uptake by macrophages should lead to reduced drug accumulation in healthy tissues, thereby increasing therapeutic efficacy, reducing toxicity and preventing side effects.<sup>39</sup>

The main mechanisms of action suggested for AmB against parasites are its binding to ergosterol and the

formation of pores in the cell membrane, which would allow the passage of electrolytes, such as K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, leading to cell death.<sup>40,41</sup> In addition, the induction of oxidative burst and the modulation of immune response in host cells have also been proposed as alternative mechanisms.<sup>42–44</sup> Herein, our assessment of oxidative burst and immune response modulation through the evaluation of Nitric oxide (NO) and TNF- $\alpha$  production revealed that the IC<sub>50</sub> concentration of AmB-NLC did not significantly modulate either mediator. Thus, we conclude that NO and TNF- $\alpha$  do not participate in the leishmanicidal mechanism by which AmB-NLC acts in vitro, and rather suggests a direct effect on intracellular parasites. Indeed, the rapid uptake of NLCs by *L. braziliensis*-infected macrophages observed herein, associated with the faster disruption of AmB-NLC at acidic pH levels, may directly affect intracellular parasites. On the other hand, in contrast to AmB-D and AmB-NLC, free AmB was significantly induced the production of both NO and TNF- $\alpha$  in our in vitro assessments. AmB also presented the highest toxicity to host cells observed in our study. Several studies have suggested the production of inflammatory mediators, such as TNF- $\alpha$  and NO, as responsible for the toxicity observed in some amphotericin B formulations, which is not the case in AmB-L.<sup>45–52</sup> Thus, we believe that the free active compound of amphotericin B (AmB) likely presented greater bioavailability to host cells than either AmB-NLC or AmB-D, and thereby promoted not only the greatest leishmanicidal effect, but also the greatest toxicity to host cells.

To evaluate the potential leishmanicidal effect of AmB-NLC in vivo, we employed a standardized murine model capable of reproducing natural characteristics of this disease similar to that occurring in humans, ie, ulcerated skin lesions with regular, raised and well-delimited edges and granular bottom, as well as parasite dissemination to the lymphoid areas. To our knowledge, this is also the first time an experimental model, that closely mimics the natural infection aspects of cutaneous leishmaniasis, is used to evaluating NLC containing AmB. In this model, *Leishmania braziliensis* infection is self-healing in BALB/c mice. Lesions reach a peak size around the fifth or sixth weeks post-infection and gradually decrease in size until achieving complete cure, normally around the ninth week. Similarly, parasite load in the ear decreases from the sixth week onward.<sup>26</sup> In this context, an effective treatment should be capable of shortening healing time, ie, able to preclude lesion development and/or induce smaller lesions



**Figure 6** Intrapertoneal AmB-NLC treatment controls *L. braziliensis* infection. BALB/c mice infected with *L. braziliensis* were treated intraperitoneally three weeks later with Sb<sup>5+</sup> (Glucantime® 100 mg/Sb<sup>5+</sup>/kg/day, 5x a week), or AmB-L (Ambisome®), AmB-NLC or Ø-NLC (6 mg/kg/day, on alternating days over 2 weeks). (A) Lesion size development was monitored weekly; (B) Ear sections, obtained six weeks after infection, were analyzed by optical microscopy (200X magnification). Parasitic load in (C) infected ears and (D) draining lymph nodes. Bars represent mean ± SD of an experiment performed with 12 animals per group. Kruskal–Wallis nonparametric testing, followed by Dunn’s multiple comparison post-test (\*p < 0.05 and \*\*p < 0.01).

**Abbreviations:** AmB-L, liposomal amphotericin B; AmB-NLC, amphotericin B-loaded nanostructured lipid carrier; Sb<sup>5+</sup>, meglumine antimonate; SD, standard deviation; Ø-NLC, empty nanostructured lipid carrier.

compared to controls, as well as able to reduce tissue inflammation and parasite load at the peak of disease. Herein, all data obtained from the ear lesion size development and its dermal characterizes were in accordance with model described by Moura et al as well as to previous studies.<sup>26,27,53,54</sup> Intrapertoneal treatment with AmB-NLC was found to be the most effective in decreasing mouse ear lesion size. Although both AmB-NLC and Sb<sup>5+</sup> similarly reduced parasitic load and inflammatory cell infiltrate in infected ears, none of the treatments employed were able to reduce parasitic load in dLNs. Santos et al, in an

evaluation of the leishmanicidal effect of 17-AAG, an inhibitor of the HPS90 protein, similarly observed diminished lesion size and parasitic load at the infection site of *L. braziliensis*-infected mice, without observing alterations in parasite burden in the dLNs.<sup>54</sup> Likewise, Celes et al analyzed the efficacy of diethyl dithiocarbamate (DETC)-containing bacterial cellulose membranes and found no decreases in dLN parasitic load, despite demonstrating leishmanicidal action at the site of infection.<sup>27</sup> Falcão et al suggested that parasite persistence within the dLNs of *L. braziliensis*-infected BALB/c mice may be due to

presence of the IL-10-secreting CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> subset of T regulatory cells, which reduces the frequency of effector T cells.<sup>55</sup> The role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells in suppressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells was also shown to inhibit the elimination of *Leishmania* major in the skin of C57BL/6 mice, via mechanisms both dependent on and independent of IL-10.<sup>56</sup> It has been suggested that the persistence of pathogens, such as *Leishmania*, in the host may provide beneficial immunity to the host, and could also be a reflection of both host and parasite co-evolutionary survival strategies.<sup>56</sup>

Considering that current treatment options for cutaneous leishmaniasis are limited by cost, host toxicity and an increasing number of refractory cases, it is our sincere hope that AmB-NLC may not only increase the therapeutic index of leishmaniasis treatment, but also encourage future scientific study towards the provision of low-cost stable drug delivery systems.

## Conclusion

The results herein demonstrate for the first time the efficacy of AmB-NLC in promoting the in vitro and in vivo clearance of intracellular *L. braziliensis* parasites, the main etiological agent of cutaneous leishmaniasis in Brazil. The developed nanoformulation presented pharmacokinetic advantages, including a nanometric size, spherical shape and Zeta potential suggestive of high stability. Moreover, the unique pH-sensitive phospholipid composition indicates that AmB-NLC may be an innovative cost-effective drug delivery system. The observed clearance of intracellular *L. braziliensis* parasites in vitro by AmB-NLC, in the absence of either TNF- $\alpha$  or nitric oxide production at the IC<sub>50</sub> concentration, may be related to more rapid disruption of AmB-NLC in acidic environments, including the parasitophorous vacuoles of *Leishmania* species. Moreover, the rapid AmB-NLC uptake by macrophages, as well as the controlled release profile at physiological pH levels, may have led to the lack of observed cytotoxicity in AmB-NLC-treated cells as compared to AmB and AmB-D. The in vivo evaluation, which employed a murine model capable of reproducing natural characteristics of cutaneous leishmaniasis in humans, demonstrated the efficacy of AmB-NLC in reducing both lesion size and parasite load in the ears of treated animals. Considering the high toxicity associated with conventional administration of amphotericin B (AmB-D), as well as the high cost of its less toxic liposomal formulation (AmB-L), our results represent a promising new formulation, with demonstrated safety

and a cheaper cost than current commercially available formulations of amphotericin B. Our results suggest that the presently described novel AmB-NLC delivery system represents a promising nanoformulation that warrants further investigation in the treatment of cutaneous leishmaniasis.

## Acknowledgments

The authors thank Andreza Souza for technical and logistics support, Valdomiro Moitinho, MSc, for his assistance in vivo experimentation and Dr. Claudio Figueira for technical assistance with confocal microscopy. The authors would like to thank Andris K. Walter for English Language revision and manuscript copyediting assistance. The authors are grateful to Apis Flora Indl. Coml. Ltda. For the facilities. This study was supported in part by the following financial grants and the intramural research program from FIOCRUZ (VMB), FAPESP Grant fellowships (2015/15948-5, 2016/10145-4, 2016/10345-3, 2016/11116-8 and 2017/22888-4) (FMO) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001. AAB, CIO and VMB are senior scientist fellows at the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). JRS is supported by a scholarship from CAPES. PSSM holds a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). ALM has a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). None of the funders played any role in study design, data collection or analysis, the decision to publish, or in the preparation of the manuscript.

## Author Contributions

All authors made substantial contributions to the study's conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; took part in drafting the article or revising it critically for important intellectual content; gave final approval of the version to be published; and agree to be accountable for all aspects of the work. These authors equally contributed to the work: Jéssica Rebouças-Silva and Maraine Catarina Tadini. These senior authors equally contributed to the work: Franciane Marquele-Oliveira and Valéria M Borges.

## Disclosure

The authors declare that they do not have any commercial associations that might pose a conflict of interest. The authors report no conflicts of interest for this work.

## References

- World Health Organization. Leishmaniasis. Leishmaniasis; Published 2020. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Accessed May 13, 2020.
- Ramírez JL, Guevara P. Persistent infections by *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997;92(3):333–338. doi:10.1590/S0074-02761997000300006
- Boaventura VS, Cafe V, Costa J, et al. Short report: concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(2):267–269. doi:10.4269/ajtmh.2006.75.267
- De LEB, Porto C, Da MJOC, Sampaio RNR. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana \*. *An Bras Dermatol*. 2007;82(2):111–124. doi:10.1590/S0365-05962007000200002
- Romero GAS, De Farias Guerra MV, Paes MG, De Oliveira Macêdo V. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(5):456–465. doi:10.4269/ajtmh.2001.65.456
- Almeida RP, Brito J, Machado PL, et al. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(1):79–81. doi:10.4269/ajtmh.2005.73.79
- Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, et al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis*. 2008;46(2):223–231. doi:10.1086/524042
- Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(12):1–24. doi:10.1371/journal.pntd.0006052
- Silva SC, Guimarães LH, Silva JA, et al. Molecular epidemiology and in vitro evidence suggest that *Leishmania braziliensis* strain helps determine antimony response among American tegumentary leishmaniasis patients. *Acta Trop*. 2018;178:34–39. doi:10.1016/j.actatropica.2017.10.010
- Taslimi Y, Zahedifard F, Rafati S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. *Parasitology*. 2016;145(4):497–507. doi:10.1017/S003118201600216X
- Cohen B. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. *Int J Pharm*. 1998;162(12):95–106. doi:10.1016/S0378-5173(97)00417-1
- Bekersky I, Fielding RM, Buell D, Lawrence I. Lipid-based amphotericin B formulations: from animals to man. *Pharm Sci Technol Today*. 1999;2(6):230–236. doi:10.1016/S1461-5347(99)00160-1
- Ministério da Saúde B. Orientações para uso racional do medicamento anfotericina B lipossomal; Published 2014. Available from: <https://www.saude.gov.br/artigos/955-saude-de-a-a-z/leishmaniose-visceral/14190-orientacoes-para-uso-razional-do-medicamento-anfotericina-b-lipossomal>. Accessed September 29, 2020.
- Saupe A, et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) – structural investigations on two different carrier systems. *Biomed Mater Eng*. 2005;15(5):393–402.
- Pardeshi C, Rajput P, Belgamwar V, et al. Solid lipid based nanocarriers: an overview. *Acta Pharm*. 2012;62(4):433–472. doi:10.2478/v10007-012-0040-z
- Tadini MC, de Freitas Pinheiro AM, Carrão DB, et al. Assessments of nanostructured lipid carriers loaded with amphotericin b: a proposal for increased stability and safety for infectious diseases. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;145:576–585. doi:10.1016/j.jpba.2017.06.034
- de Carvalho RF, Ribeiro IF, Miranda-Vilela AL, et al. Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA-DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. *Exp Parasitol*. 2013;135(2):217–222. doi:10.1016/j.exppara.2013.07.008
- Palma E, Pasqua A, Gagliardi A, Britti D, Fresta M, Cosco D. Antileishmanial activity of amphotericin B-loaded-PLGA nanoparticles: an overview. *Materials*. 2018;11(7):1167. doi:10.3390/ma11071167
- Lanza JS, Pomel S, Loiseau PM, Frézard F. Recent advances in amphotericin B delivery strategies for the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Drug Deliv*. 2019;16(10):1063–1079. doi:10.1080/17425247.2019.1659243
- Abu Ammar A, Nasereddin A, Erekat S, et al. Amphotericin B-loaded nanoparticles for local treatment of cutaneous leishmaniasis. *Drug Deliv Transl Res*. 2019;9(1):76–84. doi:10.1007/s13346-018-00603-0
- Gasco MR. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. Inventor: Maria R. Gasco. US5250236. Filled: Aug. 2, 1991. Date of Patent: Oct. 5, 1993.
- Petersen ALDOA, Campos TA, Santos Dantas DAD, et al. Encapsulation of the HSP-90 chaperone inhibitor 17-AAG in stable liposome allow increasing the therapeutic index as assessed, in vitro, on *Leishmania (L.) amazonensis* amastigotes-hosted in mouse CBA macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8(AUG):1–14. doi:10.3389/fcimb.2018.00303
- European Medicines AE. *Guideline on Bioanalytical Method Validation Guideline on Bioanalytical Method Validation Table of Contents*. 44. United Kingdom, 2011;1–23.
- Brasil MDS. *Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar*. 2017.
- Sharma R, Silveira-Mattos PS, Ferreira VC, et al. Generation and characterization of a dual-reporter transgenic leishmania *braziliensis* line expressing eGFP and luciferase. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;9(January):1–10. doi:10.3389/fcimb.2019.00468
- De Moura TR, Novais FO, Oliveira F, et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *leishmania braziliensis*. *Infect Immun*. 2005;73(9):5827–5834. doi:10.1128/IAI.73.9.5827
- Celes FS, Trovatti E, Khouri R, et al. DETC-based bacterial cellulose bio-curatives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Sci Rep*. 2016;6:38330. doi:10.1038/srep38330
- Titus RG, Marchand M, Boon TLJ. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol*. 1985;7(5):545–555. doi:10.1111/j.1365-3024.1985.tb00098.x
- Ambisome. [homepage on the Internet]. Paraná: consulta Remédios; Published 2020. Available from: <https://consultaremedios.com.br/ambisome/p>. Accessed July 3, 2020.
- Das S, Chaudhury A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12(1):13–15. doi:10.1208/s12249-010-9563-0
- Khosa A, Reddi S, Saha RN. Biomedicine & pharmacotherapy nanos-structured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomed Pharmacother*. 2018;103(April):598–613. doi:10.1016/j.biopha.2018.04.055
- Khan AA, Mudassir J, Mohtar N, Darwis Y. Advanced drug delivery to the lymphatic system: lipid-based nanoformulations. *Int J Nanomed*. 2013;8:2733–2744. doi:10.2147/IJN.S41521
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*. 2003;24(23):4283–4300. doi:10.1016/S0142-9612(03)00331-4
- Antoine JC, Prima E, Jouanne C, Bongrand P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis* infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect Immun*. 1990;58(3(3)):779–787. doi:10.1128/IAI.58.3.779-787.1990
- Hanson LH, Stevens DA. Comparison of antifungal activity of amphotericin B deoxycholate suspension with that of amphotericin B cholesteryl sulfate colloidal dispersion. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36(2):486–488. doi:10.1128/AAC.36.2.486
- Johnson EM, Ojwang JO, Szekely A, Wallace TL, Warnock DW. Comparison of in vitro antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(6):1412–1416. doi:10.1128/AAC.42.6.1412
- Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*. 2003;11(6):272–279. doi:10.1016/S0966-842X(03)00117-3

38. Matsumori N, Tahara K, Yamamoto H, et al. Direct interaction between amphotericin B and ergosterol in lipid bilayers as revealed by 2H NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc.* 2009;131(33):11855–11860. doi:10.1021/ja9033473
39. Bruni N, Stella B, Giraudo L, Della Pepa C, Gastaldi D, Dosio F. Nanostructured delivery systems with improved leishmanicidal activity: A critical review. *Int J Nanomed.* 2017;12:5289–5311. doi:10.2147/IJN.S140363
40. Gale EF. The release of potassium ions from *Candida albicans* in the presence of polyene antibiotics. *J Gen Microbiol.* 1974;80(2):451–465. doi:10.1099/00221287-80-2-451
41. Sen YT, Ou KL, Peng PW, et al. Quantifying membrane permeability of amphotericin B ion channels in single living cells. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2013;1828(8):1794–1801. doi:10.1016/j.bbmem.2013.03.021
42. Sokol-Anderson ML, Brajtburg J, Medoff G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J Infect Dis.* 1986;154(1):76–83. doi:10.1093/infdis/154.1.76
43. Mesa-arango AC, Scorzoni L, Zaragoza O. It only takes one to do many jobs: amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front Immunol.* 2012;3:1–10. doi:10.3389/fmicb.2012.00286
44. Mesa-Arango AC, Trevijano-Contador N, Román E, et al. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(11):6627–6638. doi:10.1128/AAC.03570-14
45. Gigliotti F, Shenep JL, Lott LTD. Induction of prostaglandin synthesis as the mechanism responsible for the chills and fever produced by infusing amphotericin B. *Send to J Infect Dis.* 1987;156(5):784–789. doi:10.1093/infdis/156.5.784
46. John KS, Chia Edward J, Manus M. In vitro tumor necrosis factor induction assay for analysis of febrile toxicity associated with amphotericin b preparations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(5):906–908. doi:10.1128/AAC.34.5.906
47. Arning M, Kliche K, Wehmeier A. Infusion-related toxicity of three different amphotericin B formulations and its relation to cytokine plasma levels. *Mycoses.* 1995;465:459–465. doi:10.1111/j.1439-0507.1995.tb00020.x
48. Sau K, Mambula SS, Latz E, Henneke P, Golenbock DT, Levitz SM. The antifungal drug amphotericin b promotes inflammatory cytokine release by a toll-like receptor- and CD14-dependent mechanism \*. *J Biol Chem.* 2003;278(39):37561–37568. doi:10.1074/jbc.M306137200
49. Majumder N, Ganguly S, Ghosh AK, Kundu S, Banerjee A, Saha S. Chlorogenic acid acts upon *Leishmania donovani* arresting cell cycle and modulating cytokines and nitric oxide in vitro. *Parasite Immunol.* 2020;42(6):1–12. doi:10.1111/pim.12719
50. Ries F, Alflen A, Lopez PA, et al. Antifungal drugs influence neutrophil effector functions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(6):1–17. doi:10.1128/AAC.02409-18
51. Kawabe K, Takano K, Moriyama M, Nakamura Y. Amphotericin B increases transglutaminase 2 expression associated with upregulation of endocytotic activity in mouse microglial cell line BV-2. *Neurochem Res.* 2017;42(5):1488–1495. doi:10.1007/s11064-017-2205-0
52. Rogers PD, Kramer RE, Chapman SW, Cleary JD. Amphotericin B – induced interleukin-1 b expression in human monocytic cells is calcium and calmodulin dependent. *J Infect Dis.* 1999;180(May):1259–1266. doi:10.1086/315004
53. Khouri R, Novais F, Santana G, et al. DETC induces *Leishmania* parasite killing in human invitro and murine in vivo models: A promising therapeutic alternative in leishmaniasis. *PLoS One.* 2010;5(12):8–9. doi:10.1371/journal.pone.0014394
54. Santos DM, Petersen ALOA, Celes FS, Borges VM, Veras PST, de Oliveira CI. Chemotherapeutic potential of 17-AAG against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(10):e3275. doi:10.1371/journal.pntd.0003275
55. Falcão SC, De MTR, Clarêncio J, Brodskyn C, Barral A, De OCI. The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. *Int J Parasitol.* 2012;42:771–780. doi:10.1016/j.ijpara.2012.05.006
56. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S. CD4 1 CD25 1 regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature.* 2002;420(6915):520–527. doi:10.1038/nature01199.1.

## International Journal of Nanomedicine

Dovepress

### Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

## 5 HIPÓTESE

O extrato glicólico de Própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> controla a infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. amazonensis*.

### 5.1 OBJETIVOS

#### 5.1.1 Objetivo geral

Avaliar o controle da infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. amazonensis* pelo extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> como potencial candidato para o tratamento aditivo da Leishmaniose Cutânea Localizada.

#### 5.1.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a citotoxicidade do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> em cultura de macrófagos não infectados;
2. Testar o efeito do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> na infecção de macrófagos com *L. amazonensis*;
3. Avaliar o efeito do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> na expressão das enzimas HO-1, arginase, ornitina descarboxilase, iNOS e COX-2 por macrófagos infectados com *L. amazonensis*;
4. Avaliar o efeito do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> na produção de citocinas e mediadores inflamatórios por macrófagos infectados com *L. amazonensis*;
5. Identificar vias de sinalização celular deflagrados pelo extrato de própolis EPP-AF verde na infecção *in vitro* por *L. amazonensis*;
6. Avaliar a capacidade do controle da infecção do tratamento tópico com gel de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> em modelo experimental utilizando camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.

## 6 MANUSCRITO II

### **Leishmanicidal and Immunomodulatory Properties of Brazilian Green Propolis Extract (EPP-AF<sup>®</sup>) and Gel in pre-clinical model**

O trabalho avalia de forma *in vitro* e *in vivo* as propriedades leishmanicida e imunomoduladora de um extrato de própolis verde padronizado (EPP-AF<sup>®</sup>) ou de uma formulação em gel em modelo de infecção por *Leishmania amazonensis*.

#### **Resumo:**

A própolis é um composto natural amplamente utilizado na medicina popular devido à sua gama de efeitos biológicos, incluindo atividade contra agentes infecciosos. Entretanto, os principais mecanismos celulares pelos quais a própolis exerce seus efeitos biológicos permanecem não esclarecidos. Aqui, avaliamos as propriedades leishmanicida e imunomoduladora de um Extrato de Própolis Padronizado (EPP-AF<sup>®</sup>) de forma *in vitro* e *in vivo*, utilizando modelo de infecção por *L. amazonensis*. As análises *in vitro* revelaram a capacidade do EPP-AF<sup>®</sup> em reduzir o índice de infecção de macrófagos infectados, bem como os níveis de IL-1 $\beta$ , Óxido Nítrico e Prostaglandina E2, enquanto mostrou-se capaz de aumentar o Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  por macrófagos infectados. Análises por western blotting revelaram a capacidade do EPP-AF<sup>®</sup> em induzir as expressões das enzimas Heme Oxigenase-1 e COX-2, bem como de induzir a fosforilação de ERK-1/2 em macrófagos infectados e não infectados. A inibição farmacológica de ERK1/2 afetou significativamente a produção do Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ , sem alterar a carga parasitária. Análises *in vivo* mostraram a eficácia do tratamento tópico com gel de EPP-AF<sup>®</sup> isoladamente ou em terapia combinada com antimônio pentavalente na redução de lesões na orelha de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Análises multivariadas mostraram a capacidade do tratamento tópico com própolis em alterar o perfil de resposta imune celular apresentado pelos linfonodos drenantes, bem como o perfil de citocinas liberadas localmente e sistemicamente. Em conjunto, esses resultados reforçam o efeito leishmanicida e imunomodulador da própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> e abrem uma nova perspectiva sobre a possibilidade de utilização da própolis como tratamento adjuvante na terapia da Leishmaniose Cutânea.

O artigo referente a este trabalho encontra-se em construção.

## INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um conjunto de doenças com aspectos clínicos heterogêneos e importante diversidade epidemiológica. São causadas por parasitos do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), transmitidos ao homem através da picada das fêmeas infectadas dos vetores flebotomíneos. Estão inseridas entre as dez principais Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), devido à sua importância para a saúde pública mundial, atingindo, principalmente, países pobres no Sudeste Asiático, África Oriental e América Latina (WHO/PAHO, 2021).

O atual arsenal terapêutico para o tratamento das leishmanioses é ultrapassado e apresenta sérias limitações, tais como: alto custo para os cofres públicos, alta toxicidade, uso parenteral da maioria dos medicamentos, o que os tornam poucos acessíveis devido à necessidade de locomoção dos pacientes até uma unidade de tratamento. Além disso, há um crescente aumento nos relatos de casos de falha terapêutica e resistência dos parasitos (ROMERO et al, 2001; CARNIELLI et al, 2019; KOSAKA et al, 2020; KAKOOEI et al, 2020; SILVA et al, 2021).

A própolis é uma substância resinosa e balsâmica elaborada pelas abelhas a partir de resinas de broto, botões florais e outras partes de tecidos vegetais. No Brasil, devido à grande diversidade de espécies vegetais visitadas pelas abelhas, ocorre uma elevada variação de seus princípios ativos. Ao todo, já foram descritos 14 tipos de própolis no território brasileiro, classificados de acordo com a sua origem botânica, propriedades físico-químicas e geolocalização (PARK et al, 2002; DAUGSCH et al, 2008; FERREIRA et al, 2017). Dentre todos os tipos conhecidos, a própolis verde brasileira é um dos mais comercializados e estudados do mundo. Possui como principais componentes compostos fenólicos, como ácido p-cumárico, ácido fenílico, ácido cafeico, kaempferol, quercetina e o Artepillin C, sendo este último considerado como marcador de própolis verde (SANTOS et al, 2019).

O Extrato de Própolis Padronizado da Apis Flora (EPP-AF<sup>®</sup>) destaca-se dos demais extratos de própolis por ser um extrato de própolis verde brasileira cuja composição química e propriedades biológicas foram determinadas juntamente com sua reprodutibilidade de lote a lote, o que o torna único e cujos estudos não podem ser aplicados ou traduzidos para outros tipos de extratos de própolis. Diversos efeitos biológicos já foram relatados para o EPP-AF<sup>®</sup>, tais como antiúlcera, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e, recentemente, um estudo

clínico mostrou os benefícios do tratamento adjuvante com própolis para a recuperação de pacientes acometidos por COVID-19 hospitalizados, apresentando impacto na redução do tempo de internação (BARUD et al., 2013; BERRETTA et al., 2012, 2013; DINIZ et al., 2020; HORI et al., 2013; MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2019; SILVEIRA et al., 2021).

Estudos têm demonstrado o efeito leishmanicida de diferentes extratos da própolis tanto *in vitro* como *in vivo* (DEVEQUI-NUNES et al, 2018; REGUEIRA-NETO et al, 2018; CALVACANTE et al, 2021). Anteriormente, nosso grupo demonstrou a ação leishmanicida e imunomodulatória de três diferentes extratos de própolis verde (EPP-AF<sup>®</sup>) na infecção *in vitro* por *L. braziliensis* ou diretamente sobre as formas promastigotas deste parasito (REBOUCAS-SILVA et al, 2017). Nesse estudo, expandimos o conhecimento gerado no nosso trabalho anterior avaliando o extrato de própolis verde brasileiro EPP-AF<sup>®</sup> no contexto da infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. amazonensis*. É importante ressaltar que esta espécie é o outro principal agente etiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil e está associada à leishmaniose difusa, uma forma rara e de difícil tratamento da LC. O presente estudo investigou a capacidade do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> em modular os principais marcadores inflamatórios relacionados ao controle imunológico da infecção por *L. amazonensis in vitro*, bem como influenciar o desfecho da doença em camundongos tratados topicamente com uma formulação em gel de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> a 3.6% (p / v).

## MATERIAS E MÉTODOS

### Obtenção do extrato glicólico de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup>

Nesse estudo foi utilizado o Extrato de Própolis Padronizado - Apis Flora<sup>®</sup> (EPP-AF<sup>®</sup>) glicólico. Para os ensaios *in vitro* foi utilizado o extrato glicólico a 11% de própolis p/v. Nos ensaios *in vivo*, foi avaliada o gel de própolis de liberação imediata (3,6% p/v de própolis), com seu gel sem adição de própolis como controle (Base). Todas as formulações de própolis foram fornecidas pela empresa Apis Flora Indl. Coml. Ltda. em parceria com Andresa Berretta (Apis Flora). O extrato e o gel de própolis foram obtidos após criterioso estudo da matéria-prima proveniente de diferentes regiões do Brasil e a padronização resultante desse estudo, conforme Berretta et al. 2012 (BERRETTA et al, 2012). Abaixo segue os dados de padronização do

extrato alcoólico de partida para a obtenção das formulações (extrato e gel) utilizadas neste estudo:

**Tabela 1.** HPLC/DAD: quantificação de substâncias bioativas do extrato de própolis (n=3 ± SD).

Biomarcador da Própolis	Concentração ± SD (mg/g)
Artepilin C	13,149±1,647
4,5 Dicafeoilquínico	7,039±0,074
Drupanina	5,460±0,123
3,5 Dicafeoilquínico	4,163±0,006
Ácido p-cumárico	3,786±0,027
Galangina	2,797±0,188
Aromadendrina	1,422±0,016
Bacarina	1,422±0,264
Crise	0,825±0,025
Ácido cafeico	0,685±0,028
Total de Bioativos	40,747±2,4

**Tabela 2.** HPLC/DAD: quantificação de substâncias bioativas do extrato de própolis utilizado no gel carbopol (n=3  $\pm$  SD).

Biomarcador da Própolis	Concentração $\pm$ SD (mg/g)
Artepilin C	2,630 $\pm$ 0,1
4,5 Dicafeoilquínico	0,959 $\pm$ 0,06
Drupanina	0,750 $\pm$ 0,02
3,5 Dicafeoilquínico	0,574 $\pm$ 0,02
Ácido p-cumárico	0,496 $\pm$ 0,01
Galangina	0,479 $\pm$ 0,01
Bacarina	0,378 $\pm$ 0,01
Aromadendrina	0,208 $\pm$ 0,006
Crise	0,125 $\pm$ 0,004
Ácido cafeico	0,098 $\pm$ 0,003
Total de Bioativos	<b>6,697 <math>\pm</math> 0,3</b>

### Parasitas e Camundongos

Neste estudo, foi utilizada a cepa de *Leishmania amazonensis* (MHOM/Br88/Ba-125). As promastigotas foram cultivadas a 26°C, em meio Schneider suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de penicilina, estreptomicina e glutamina. Os camundongos BALB/c (*Mus musculus*), foram obtidos do Biotério IGM/FIOCRUZ e mantidos em condições livre de patógenos, de acordo com o CEUA licença número 005/2020 - IGM/FIOCRUZ.

## **Obtenção de MDMO**

Camundongos Balb/c foram anestesiados por via intravenosa por injeção de dose letal de tiopental sódico (100 mg/kg), seguido de deslocamento cervical para confirmação da morte. Após a eutanásia, o abdômen e as patas do camundongo foram lavados com álcool 70%. Foi feita uma incisão na linha média do abdômen e após isso a pele foi puxada, para expor os músculos das patas posteriores. As patas foram removidas com tesoura cirúrgica e a tíbia e o fêmur de cada pata então dissecados. Os ossos foram lavados com álcool 70% e foi realizada a lavagem interna do fêmur e tíbia com o meio de cultura. As células obtidas foram cultivadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, em meio RPMI suplementado com 20% de SBF, 30% de sobrenadante de fibroblastos L929 e 1% de penicilina-estreptomicina-glutamina e incubadas por 7 dias para diferenciação em macrófagos.

## **Avaliação da viabilidade de macrófagos tratados com o EPP-AF<sup>®</sup>**

MDMO, obtidos como acima descrito, foram plaqueados na densidade de  $1 \times 10^5$ /poço em placas de cultura de 96 poços e incubados por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de aderência, os macrófagos foram tratados com o EPP-AF<sup>®</sup> em diferentes concentrações (200 – 3.2 µg/mL) e incubados por 48h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Meio RPMI, suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina-estreptomicina-glutamina foi utilizado como controle de 100% de viabilidade, enquanto Triton X-100 (2% v/v) foi utilizado como controle positivo de morte celular. Em seguida, os sobrenadantes das células foram incubados por 30min (a temperatura ambiente e protegido da luz) com o kit de citotoxicidade de Lactato Desidrogenase (LDH) (Roche) e as células foram incubadas por 4h com meio de cultura contendo 10% de sal de Resazurina de sódio (Sigma). A absorbância para o ensaio de LDH foi lida a 490 nm e para o ensaio de redução de Resazurina de sódio foi lida a 570 e 600 nm, utilizando-se espectrofotômetro SPECTRA Max 190.

### **Avaliação da viabilidade intracelular de *L. amazonensis***

MDMO foram plaqueados na densidade de  $1 \times 10^5$ /poço e deixados *overnight* a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, para total aderência. Posteriormente, as células foram infectadas com *L. amazonensis* na proporção 10:1 (*Leishmania*:macrófagos), por 4h. Em seguida, as culturas de macrófagos foram lavadas 2x com salina, para remover os parasitos não internalizados, e tratados com o EPP-AF<sup>®</sup> a diferentes concentrações (25 - 3.12 µg/mL) por 48h, à 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Meio RPMI suplementado foi utilizado como controle. Após o tempo de tratamento, o meio foi trocado para o meio Schneider suplementado e as culturas celulares foram incubadas em estufa B.O.D por 6 dias a 26°C. A contagem dos parasitos viáveis foi realizada por microscopia óptica utilizando-se a Câmara de Neubauer. Em ensaio paralelo, MDMO foram plaqueados na densidade de  $3 \times 10^5$ /poço sob lamínulas de vidro, dispostas em placa de 24 poços. Após o tempo de aderência, as células foram infectadas e tratadas como acima descrito. Posteriormente, as lamínulas foram coradas com hematoxilina e eosina para o cálculo do índice de infecção (porcentagem de células infectadas x número médio de amastigotas por célula), determinado por contagens aleatórias de 200 células/campo em cada lamínula de vidro sob microscopia óptica.

### **Avaliação do efeito imunomodulatório do EPP-AF<sup>®</sup> em macrófagos infectados por *L. amazonensis***

MDMO ( $5 \times 10^5$ /poço) foram estimulados ou não com IFN- $\gamma$  (100 ng/mL) *overnight* e, posteriormente, infectados com *L. amazonensis* por 4h. Após a infecção, a cultura foi lavada 3x para remover os parasitos não internalizados e a estimulação de IFN- $\gamma$  foi reaplicada juntamente com o EPP-AF<sup>®</sup> a 25µg/mL. Após 48 horas de tratamento, os sobrenadantes foram coletados e o extrato celular foi feito utilizando o tampão de lise RIPA (50 mM de Tris-HCl pH 7.4; 150 mM de NaCl; 1 mM de EDTA; 1% de NP-40 e 0.25 % de Na-deoxicolato) acrescido de inibidor de proteases (Thermo Fisher). Os sobrenadantes e extratos celulares foram armazenados a -20°C para posterior análise.

### **Avaliação do efeito da inibição das enzimas COX-2 e HO-1 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e tratados com o EPP-AF®**

A densidade de  $1 \times 10^5$  de macrófagos foi infectada com *L. amazonensis* ou/e pré-tratada com  $1 \mu\text{M}$  do inibidor de COX-2, NS-398 (Cayman) ou  $10 \mu\text{M}$  do inibidor da enzima HO-1, SnPP (Sigma) por 1h. Posteriormente, as culturas de células foram tratadas com  $25 \mu\text{g/mL}$  do EPP-AF® juntamente com os inibidores. Após 48 horas de tratamento, os sobrenadantes de cultura foram aspirados e o meio de cultura foi trocado pelo meio Schneider e incubado por seis dias em estufa a  $26^\circ\text{C}$ . As promastigotas viáveis, recuperadas no sobrenadante das culturas, foram contadas por microscopia óptica de luz. Em ensaio semelhante,  $3 \times 10^5$  de macrófagos foram cultivados sob lamínulas de vidro e, após o tempo de tratamento, as lamínulas foram coletadas e coradas com H&E para determinação do número de amastigotas por célula e células infectadas. Paralelamente, a densidade de  $5 \times 10^5$  de macrófagos foi infectada e tratada, conforme descrito acima, e os sobrenadantes foram recolhidos após 48h de tratamento. O extrato celular e os sobrenadantes foram coletados e armazenados para ensaio subsequente.

### **Avaliação da ativação da via ERK 1/2 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e tratados com o EPP-AF®**

MDMO ( $5 \times 10^5$ /poço) foram infectados ou não com *L. amazonensis* por 4h. Após a infecção, a cultura foi lavada 3x para remover os parasitos não internalizados e aplicou-se o tratamento com o EPP-AF® a  $25 \mu\text{g/mL}$  por 15, 30 e 45 min. Posteriormente, o extrato celular foi feito utilizando o tampão de lise RIPA (50 mM de Tris-HCl pH 7.4; 150 mM de NaCl; 1 mM de EDTA; 1% de NP-40 e 0.25 % de na-deoxicolato) acrescido de inibidor de proteases (Thermo Fisher). Os extratos celulares foram armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  para posterior análise. Paralelamente, a densidade de  $5 \times 10^5$  de macrófagos foi infectada e tratada, conforme descrito acima, e os sobrenadantes foram recolhidos após 48h de tratamento. O extrato celular e os sobrenadantes foram coletados e armazenados para ensaio subsequente.

## **Avaliação do efeito imunomodulador do tratamento com EPP-AF<sup>®</sup> em macrófagos infectados por *L. amazonensis***

A densidade de  $5 \times 10^5$  de macrófagos foi primada *overnight* com IFN- $\gamma$  (100U/mL) e infectada com *L. amazonensis* por 4h. Após a infecção, a cultura foi lavada 3x para remover os parasitos não internalizados e realizou-se o pré-tratamento com 50  $\mu$ M do inibidor da via ERK 1/2, PD98059 por 1h. Posteriormente, o estímulo de IFN- $\gamma$  foi reaplicado juntamente com 25 $\mu$ g/mL do EPP-AF<sup>®</sup> e o inibidor PD98059 por 48h. Macrófagos não estimulados foram utilizados como controle. Finalmente, os sobrenadantes das culturas foram aspirados e armazenados para posterior análise.

### **Ensaio de Griess, ELISA e Multiplex**

A quantificação dos níveis de óxido nítrico foi realizada através da determinação dos níveis de nitrito no sobrenadante fresco das culturas celulares, utilizando o método de Griess. A presença das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, e TNF- $\alpha$  foi determinada por ensaio multiplex, utilizando kit MILLIPLEX<sup>®</sup> baseado na tecnologia Luminex<sup>®</sup> xMAP<sup>®</sup> (Merck) obtido comercialmente. Já os níveis do mediador lipídico PGE<sub>2</sub> foram determinados empregando-se kits de ELISA (Cayman). Todos os procedimentos foram realizados conforme instruções dos fabricantes. Os limites de detecção para os mediadores foram estabelecidos pelo fabricante: NO (0.19  $\mu$ M); IFN- $\gamma$  (1.5 pg/mL), IL-10 (5.6 pg/mL), IL-12p70 (12.9 pg/mL), IL-13 (32.1 pg/mL), IL-17 (18.6 pg/mL), IL-1 $\beta$  (3.3 pg/mL), IL-4 (0.4 pg/mL), IL-6 (3.3 pg/mL), TNF- $\alpha$  (1.3 pg/mL) e PGE<sub>2</sub> (9.5 pg/mL).

### **Western Blot**

A indução de COX-2, iNOS, HO-1, Arginase, ODC, ERK1/2 fosforilada e ERK 1/2 total foi determinada por western blotting. O extrato proteico de MDMO primados ou não com IFN- $\gamma$ , infectados com *L. amazonensis* e tratados com o EPP-AF<sup>®</sup>, como acima relatado, foi separado por SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de nitrocelulose, e então incubados com anticorpos anti COX-2, iNOS, HO-1, Arginase 1, ODC, ERK1/2 fosforilada,

ERK 1/2 total ou  $\beta$ -actina. As bandas foram detectadas usando um Image Quant LAS 4010 (GE Healthcare). Análise *in vivo*

### **Avaliação do efeito do tratamento tópico com gel EPP-AF<sup>®</sup> em camundongos infectados com *L. amazonensis***

Camundongos BALB/c, fêmeas, 6-8 semanas de idade, foram obtidos do biotério do IGM. Os camundongos foram desafiados com 10 uL de solução fisiológica contendo  $10^6$  de promastigotas de *L. amazonensis* na derme da orelha esquerda, utilizando uma agulha de calibre 30 G (BD Ultra-fine II<sup>®</sup>). Três semanas após a infecção, os animais foram divididos em 3 grupos experimentais com n=10: i) controle não tratado; ii) base do gel e iii) gel EPP-AF<sup>®</sup>. O tratamento tópico foi realizado aplicando diariamente, com auxílio de algodão odontológico, quantidade de gel suficiente para cobrir a área da lesão. O desenvolvimento das lesões foi acompanhado semanalmente, durante 12 semanas, utilizando um paquímetro analógico (Kroeplin).

### **Avaliação do sinergismo entre o tratamento tópico com gel EPP-AF<sup>®</sup> e o Antimonial pentavalente**

Os animais foram infectados, como acima descrito, e divididos em cinco grupos experimentais (com n= 15 animais/grupo): i) não tratado; ii) base do gel; iii) antimonial pentavalente (Glucantime<sup>®</sup>) (50mg/Sb<sup>5+</sup>/Kg/dia); iv) gel EPP-AF<sup>®</sup>; v) Glucantime<sup>®</sup> + gel EPP-AF<sup>®</sup>. Os tratamentos foram realizados após três semanas de infecção. O tratamento tópico com própolis foi realizado conforme já descrito, enquanto o tratamento com o antimonial pentavalente foi realizado de forma intraperitoneal, 5x por semana por um período de cinco semanas, de acordo com Celes e colaboradores (2016). O desenvolvimento das lesões foi acompanhado semanalmente, durante 10 semanas, utilizando um paquímetro analógico (Kroeplin).

### **Determinação da carga parasitária dos camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com gel EPP-AF®**

Ao término dos experimentos, a carga parasitária foi quantificada por meio da técnica de diluição limitante (TITUS et al., 1985). As suspensões de células do linfonodo de drenagem e da orelha infectada foram preparadas assepticamente após a eutanásia dos animais. Foram feitas diluições seriadas das células, e estas foram distribuídas em placas de 96 poços contendo meio Schneider suplementado. A carga parasitária foi determinada por meio da mais alta diluição na qual o parasito foi capaz de crescer após 2 semanas de incubação em estufa a 24°C.

### **Avaliação da resposta imune celular dos camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com gel EPP-AF®**

A resposta imune celular dos camundongos infectados e tratados com o gel de própolis verde EPP-AF® foi analisada no linfonodo de drenagem. As suspensões de células do linfonodo foram reestimuladas *in vitro* com promastigotas de *L. amazonensis* (proporção 4:1) por 24h. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados para análise posterior da produção de citocinas e mediadores lipídicos.

### **Avaliação do efeito imunomodulador *in vivo* de camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com gel EPP-AF®**

Para a avaliação do efeito imunomodulador do gel EPP-AF®, o soro e as orelhas infectadas foram coletados. A coleta de sangue dos animais foi realizada por punção cardíaca, utilizando tubo sem anticoagulante. Após a coleta, o sangue foi deixado em repouso por 6h a temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugado e armazenado a -80°C. Em paralelo, as orelhas infectadas de parte dos animais de cada grupo experimental foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, o material coletado foi macerado em cadinho com nitrogênio líquido e o macerado resultante foi solubilizado com tampão de extração proteica (T-PER™ *Tissue Protein Extraction Reagent*), acrescido de inibidores de protease (todos da Thermo Fisher). Em seguida, o material foi centrifugado e o sobrenadante

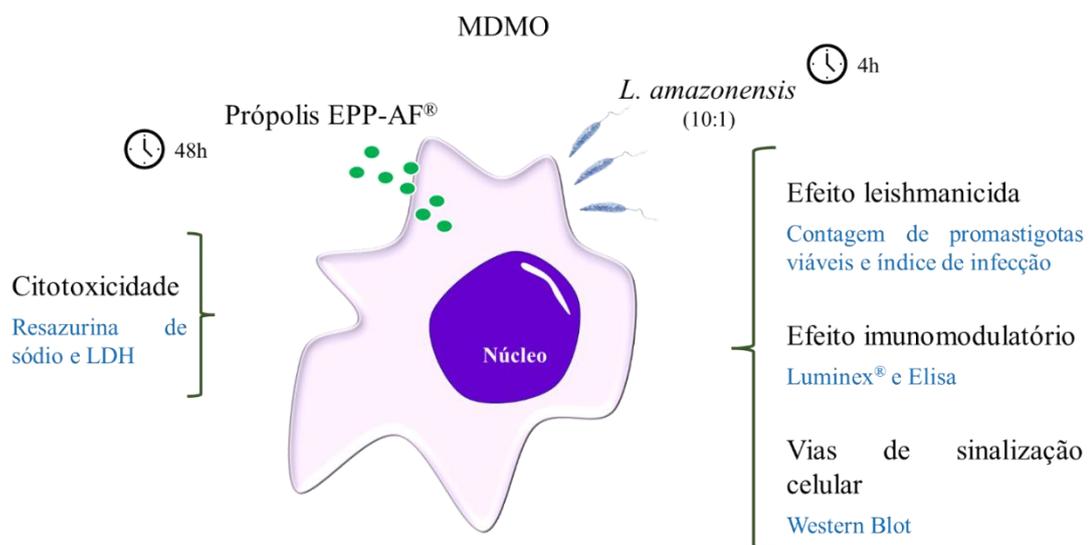
coletado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A produção de citocinas e mediadores lipídicos foi analisada conforme acima descrito.

### Análise Estatística

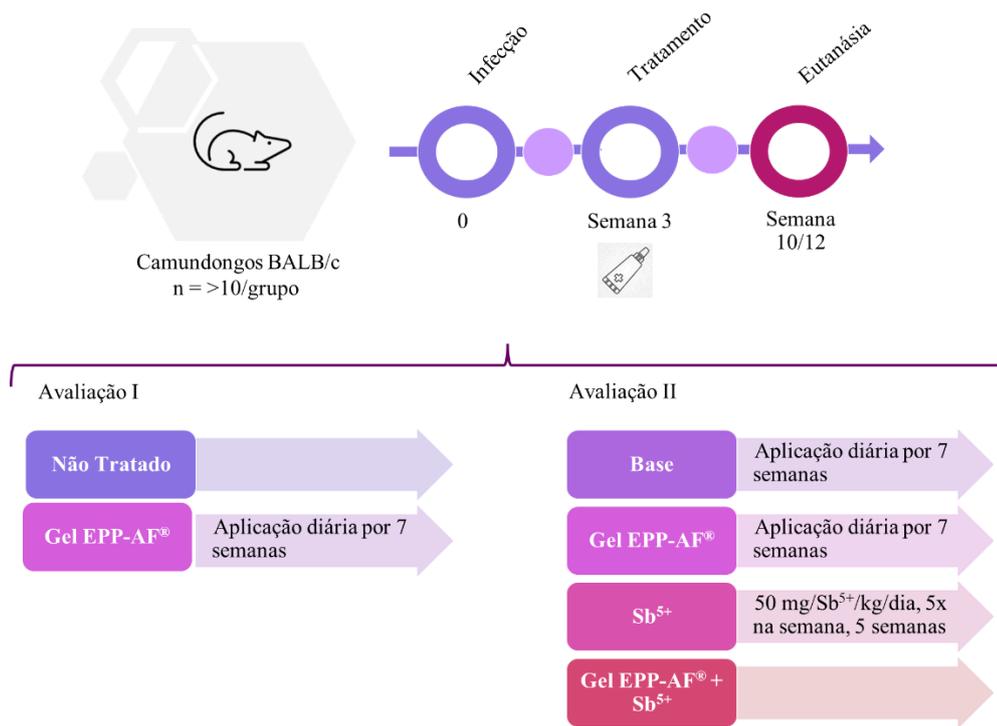
Os resultados obtidos foram avaliados quanto às diferenças estatísticas utilizando diferentes testes. Para múltiplas comparações foi utilizado Kruskal-Wallis e para comparações entre dois grupos foi realizado o Teste de Mann-Whitney, com intervalo de confiança de 95%, sendo os valores considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0.05$ . As análises foram realizadas utilizando o GraphPad V. 8.0 (Prism Software, EUA).

### Delineamento experimental

Parte I: Avaliação do Extrato de Própolis verde EPP-AF® na infecção *in vitro* por *L. amazonensis*



Parte II: Avaliação do Gel de Própolis verde EPP-AF® em modelo experimental



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Parte I

#### Avaliação do efeito citotóxico do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup>

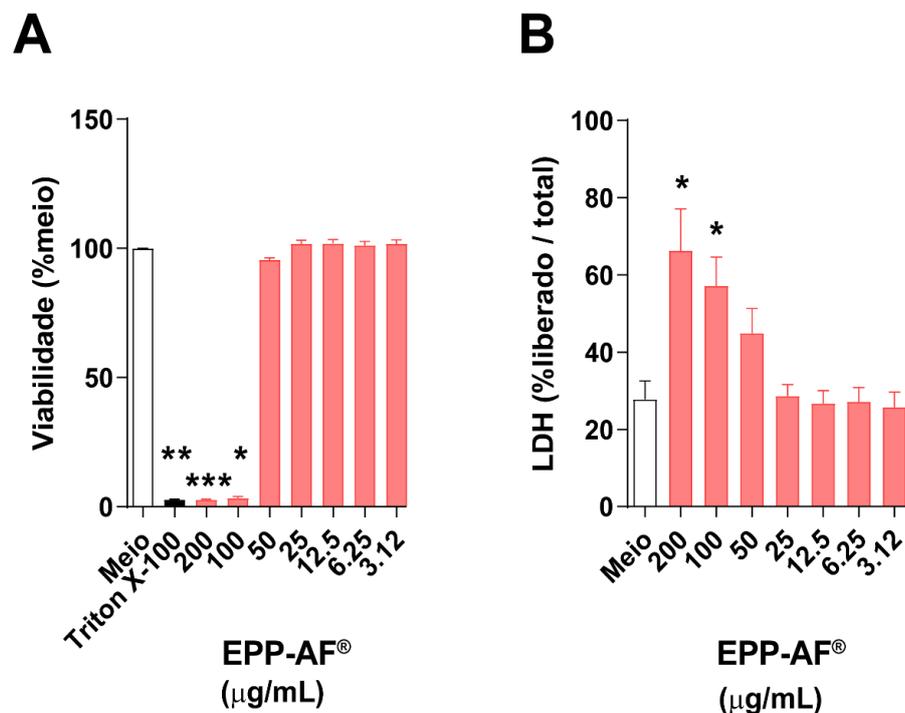
O efeito citotóxico do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> foi avaliado em MDMO empregando duas técnicas distintas: o ensaio de redução de Resazurina de sódio – ensaio colorimétrico que tem por princípio a redução intracelular da resazurina em resorufina, por meio de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial ou enzimas microssomais em células viáveis, ou seja, é uma técnica baseada no metabolismo celular ((PRÄBST et al., 2017) - e o ensaio da liberação da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) – ensaio colorimétrico que avalia a presença da enzima citoplasmática Lactato desidrogenase no meio extracelular em células que sofreram danos na membrana plasmática (KABAKOV; GABAI, 2018).

Após 48h de tratamento com o EPP-AF<sup>®</sup>, observou-se significativa redução > 90% na viabilidade celular (\*p < 0.05 e \*\*\*p < 0.0001) nas concentrações superiores a 100 µg/mL (Figura 5A). Maior liberação da enzima LDH também foi observado nas culturas de células tratadas com concentrações superiores a 50 µg/mL (\*p < 0.05), o que sugere dano na membrana celular (Figura 5B). Resultados semelhantes foram obtidos empregando diferentes

tipos celulares tratados com extratos de própolis de diferentes regiões geográficas. Bueno-Silva e colaboradores (2015) observaram, após tratamento de 48h com extrato de própolis vermelha brasileira, redução significativa na viabilidade de macrófagos RAW 264.7 a partir de 80  $\mu\text{g/mL}$ . Similarmente, ensaios com linhagens de fibroblastos demonstraram significativa citotoxicidade em concentrações superiores a 80  $\mu\text{g/mL}$  de própolis verde brasileira (SUREK et al., 2021) e a partir de 100  $\mu\text{g/mL}$  para própolis polonesa (WEZGOWIEC et al., 2020). Além disso, significativa redução na viabilidade de células epiteliais foi observada a partir de 60  $\mu\text{g/mL}$  de extrato de própolis oriundo da Malásia (MOHAMED et al., 2020).

De uma forma geral, a própolis apresenta moderada a baixa citotoxicidade na maioria dos trabalhos científicos. Entretanto, deve-se considerar que diferentes tipos de própolis, bem como diferentes métodos de extração e solventes utilizados nesse processo e diferentes linhagens celulares empregados, podem levar às variações nesses achados. Além do mais, neste trabalho, utilizamos um Extrato de Própolis Padronizado (EPP-AF<sup>®</sup>), cuja composição química e efeitos biológicos são reprodutíveis lote a lote, tornando-o distinto dos demais extratos de própolis.

A partir desses resultados, estabeleceu-se a concentração abaixo de 25  $\mu\text{g/mL}$  como segura para a realização dos demais ensaios.



**Figura 5: Citotoxicidade do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup>.** MDMO foram tratados com diferentes concentrações de EPP-AF<sup>®</sup> (200 - 3.12 µg/mL) por 48h e a citotoxicidade foi demonstrada por ensaio de (A) Resazurina de sódio e (B) LDH total liberado após 48h de tratamento. Barras representam ±SD de um experimento realizado em quintuplicata, representativo de quatro experimentos independentes. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foram utilizados para múltiplas comparações (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.0001).

### **Avaliação do efeito leishmanicida do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> na infecção *in vitro* por *L. amazonenses***

A ação leishmanicida da própolis já vem sendo demonstrada pela comunidade científica (CAVALCANTE et al., 2021; DEVEQUI-NUNES et al., 2018; REGUEIRA-NETO et al., 2018). Em trabalhos anteriores, nosso grupo demonstrou a capacidade de três extratos de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> em reduzir a viabilidade das formas promastigotas axênicas e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, no qual o extrato glicólico de própolis verde mostrou-se mais potente (REBOUCAS-SILVA et al, 2017). Dessa forma, no atual estudo, avaliamos mais profundamente o efeito leishmanicida do EPP-AF<sup>®</sup> frente à infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. amazonensis*, espécie relacionada com resposta imune voltada para a produção de mediadores inflamatórios envolvidas com a resposta do tipo Th2, bem como a lesões crônicas, necróticas e altamente parasitadas em modelos murinos de LC (ARANDA-SOUZA et al., 2018; DE ARAÚJO et al., 2014).

Assim, MDMO foram infectados com *L. amazonensis* e tratados por 48h com diferentes concentrações do EPP-AF<sup>®</sup> (25 - 3.12 µg/mL). Após seis dias de troca de meio, a contagem de promastigotas viáveis recuperadas no sobrenadantes das culturas celulares revelou uma redução significativa de aproximadamente 89% no número de promastigotas viáveis (p < 0.01) (Figura 6A), bem como uma redução de 79% no índice de infecção de MDMO tratados com 25 µg/mL do extrato EPP-AF<sup>®</sup> (p < 0.05) (Figura 6B). As fotografias representativas mostram macrófagos intensamente infectados nas culturas tratadas apenas com meio de cultura, enquanto uma redução de amastigotas por célula e células infectadas é observado nas culturas expostas ao extrato EPP-AF<sup>®</sup> a 25 µg/mL (Figura 6C).

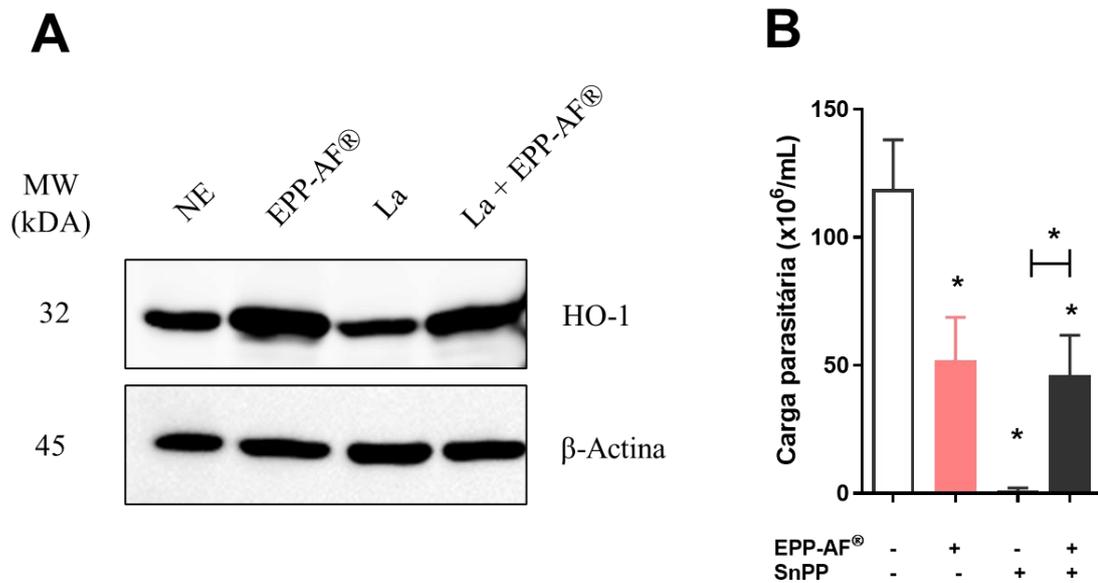


óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (EROs) e TNF- $\alpha$  (LUZ et al., 2012; MALTA-SANTOS et al., 2017; SILVA et al., 2020).

Levando em consideração as propriedades antioxidante e anti-inflamatória já descritas para diversos tipos de própolis, neste trabalho, avaliamos a capacidade do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> em induzir HO-1 por células infectadas por *Leishmania amazonensis*. As análises de western blotting mostraram que o tratamento com EPP-AF<sup>®</sup> foi capaz de induzir a expressão da enzima HO-1 por macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis* (Figura 7A). A fim de confirmar a indução de HO-1 observada no ensaio de western blotting, macrófagos infectados foram previamente tratados com o inibidor da HO-1, estanho protoporfirina IX (SnPP), e posteriormente tratados ou não com o EPP-AF<sup>®</sup> a 25  $\mu$ g/mL. A contagem do número de promastigotas viáveis, recuperadas no sobrenadante das culturas celulares previamente expostas ao inibidor SnPP, corrobora com a já descrita ação da HO-1 sobre a manutenção da sobrevivência do parasito intracelular. Assim, células expostas ao inibidor SnPP apresentaram significativa redução do número de promastigotas viáveis ( $p < 0.05$ ). Ademais, na presença do EPP-AF<sup>®</sup>, o efeito leishmanicida da inibição da atividade da HO-1 pelo SnPP é completamente revertido ( $p < 0.05$ ), sem, contudo, apresentar diferença estatística em relação às células tratadas apenas com o EPP-AF<sup>®</sup> (Figura 7B).

Embora vários trabalhos venham demonstrando de forma concisa que a indução de HO-1 está associada à sobrevivência de parasitos *Leishmania*, estudos com extratos ou compostos naturais que apresentam atividade leishmanicida demonstram a capacidade desses compostos em induzir a expressão do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), um fator de transcrição responsável pela regulação do equilíbrio redox celular do hospedeiro, bem como maior expressão de HO-1. Maiores níveis de Nrf2 e HO-1 levaria a uma maior expressão da proteína de armazenamento de ferro, a ferritina, a qual se ligaria ao ferro lábil (importante nutriente para o metabolismo e sobrevivência de parasitos intracelulares), reduzindo assim sua disponibilidade em macrófagos infectados (CATANEO et al., 2019; MIRANDA-SAPLA et al., 2019; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018). Assim, a modulação dos níveis de ferro disponíveis para o parasito, pode ser um potencial mecanismo de eliminação de *Leishmania* por estes compostos naturais.

Dessa forma, os resultados sugerem que o extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> induz a expressão de HO-1 por macrófagos infectados ou não por *L. amazonensis*, sem, contudo, favorecer a sobrevivência intracelular do parasito.



**Figura 7: Extrato de própolis verde EPP-AF® induz expressão de HO-1 em macrófagos infectados por *L. amazonensis*.** MDMO foram infectados com *L. amazonensis* e tratados com o extrato de própolis verde EPP-AF® a 25 µg/mL, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Após 48h de tratamento, o extrato celular foi coletado para avaliar por western blotting os níveis proteicos de (A) HO-1. Anticorpo anti-β-Actina foi utilizado como controle endógeno. Em ensaio paralelo, após 48h de tratamento, o meio de cultura foi trocado por Schneider e a (B) contagem de promastigotas viáveis na presença ou não do inibidor da heme oxigenase estanho protoporfirina (SnPP) e/ou própolis foi realizada após 6 dias de troca de meio. Barras representam ±SD de um experimento realizado em quintuplicata, representativo de três experimentos independentes. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foram utilizados para múltiplas comparações e o teste de Mann-Whitney para comparar dois grupos (\*p < 0.05). La: *Leishmania amazonensis*; NE: Não Estimulado e EPP-AF®: Extrato de própolis verde a 25 µg/mL.

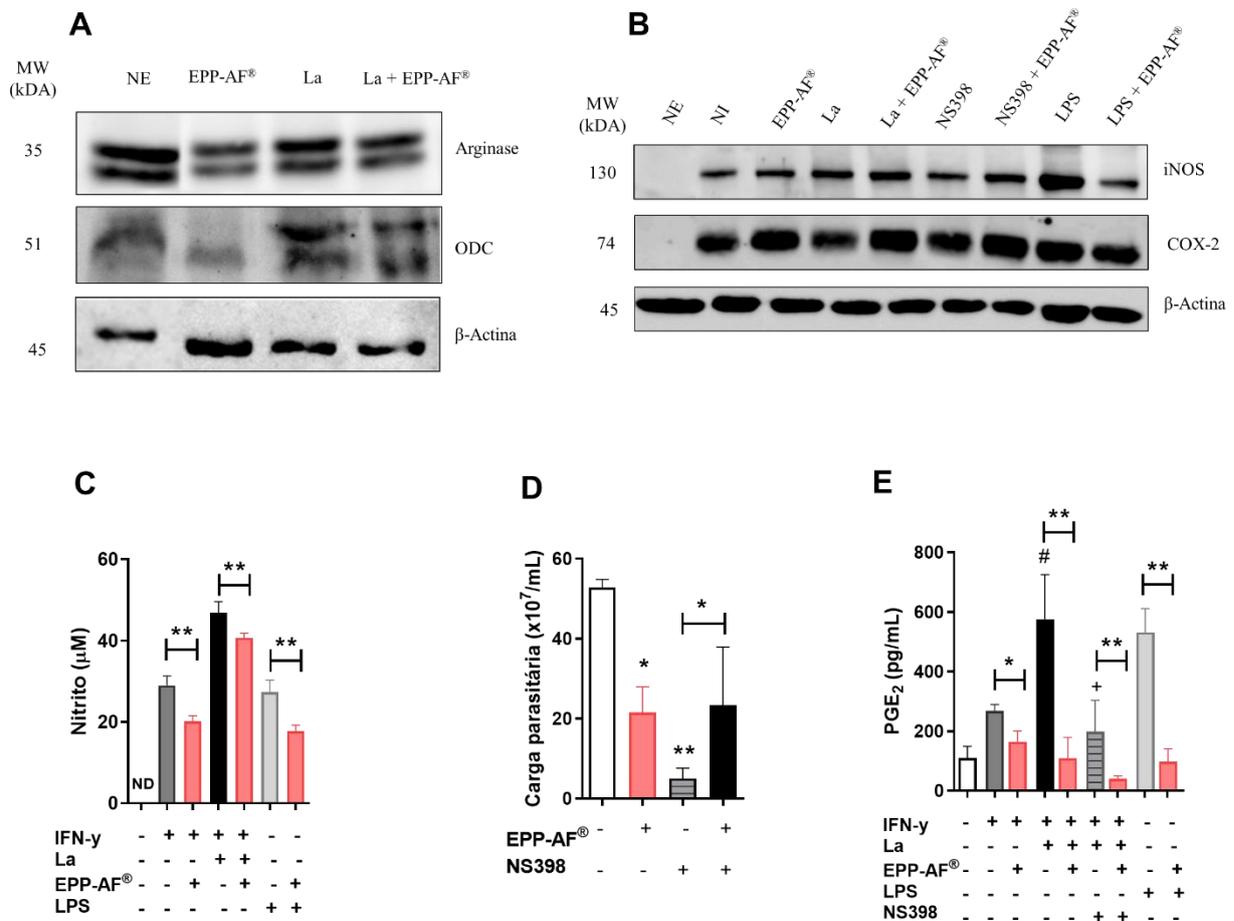
### Efeito do extrato de própolis verde EPP-AF® na expressão das enzimas arginase I, ODC, iNOS e COX-2, e na produção de mediadores NO e PGE<sub>2</sub> em macrófagos infectados por *L. amazonensis*

A arginase I é uma enzima que, na presença das citocinas IL-4, IL-10, IL-13 e TGF-β, catalisa o aminoácido L-arginina em ureia e L-ornitina, o substrato usado pela enzima ornitina descarboxilase (ODC) para produzir poliaminas (DA SILVA; FLOETER-WINTER, 2014). Estudos mostram a associação entre a expressão de arginase I e das poliaminas com a replicação e favorecimento da sobrevivência do parasito *Leishmania*, relacionando-se a diferentes formas clínicas da Leishmaniose Cutânea (FRANÇA-COSTA et al., 2015; MALTA-SANTOS et al., 2020). Assim, a inibição dessas vias tornou-se importante alvo terapêutico para tratamento da Leishmaniose (GARCIA et al., 2021; MAQUIAVELI et al., 2017). Contudo, a L-arginina também é o precursor para a síntese de óxido nítrico (NO), um importante mediador

microbicida. Dessa forma, a enzima iNOS, induzida em macrófagos por endotoxinas e citocinas inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-12, compete com a arginase I pela L-arginina, o que, além de constituir uma importante regulação para a atividade da iNOS, é utilizada como mecanismo de evasão da resposta imune pelo parasito *Leishmania* (DA SILVA; FLOETER-WINTER, 2014).

Neste estudo, nossos dados preliminares indicam que o tratamento *in vitro* com o EPP-AF<sup>®</sup> não possui efeito sobre a expressão de ambas as enzimas arginase I e ODC (Figura 8A). Além disso, o tratamento com o EPP-AF<sup>®</sup> apenas mostrou-se capaz de modular a expressão da enzima iNOS quando na presença de lipopolissacarídeo (LPS), condição na qual reduz a expressão desta enzima (Figura 8B). Por outro lado, o tratamento com o EPP-AF<sup>®</sup> reduziu de forma significativa os níveis de nitrito tanto por células não infectadas e expostas ao LPS, quanto por células não infectadas e primadas com IFN- $\gamma$  ou ainda por células infectadas com *L. amazonensis* ( $p < 0.01$ ) (Figura 8C). De fato, estudos já mostram a capacidade de diferentes extratos de própolis e seus componentes majoritários em reduzir os níveis de NO em diversos modelos inflamatórios, como na presença de LPS, ou em células irradiadas por raios ultravioletas B ou ainda em células oriundas de pacientes celíacos (ALANAZI et al., 2020; MEDJEBER et al., 2018; YOSHINO et al., 2021).

Esse bloco de resultados sugere que a ação leishmanicida do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> não está relacionada à modulação da via iNOS / NO. Contudo, mais investigações devem ser realizadas para esclarecer a atividade dessas enzimas nesse contexto.



**Figura 8: Tratamento com extrato de Própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> modula a via das enzimas iNOS e COX-2, sem impacto na via da argina 1.** MDMs foram infectados com *L. amazonensis* e tratados com o extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> a 25  $\mu$ g/mL, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Após 48h de tratamento, o extrato celular foi coletado para avaliar por Western Blotting os níveis proteicos das enzimas (A) Arginase e ornitina descarboxilase (ODC), (B) iNOS e COX-2. Anticorpo anti- $\beta$ -Actina foi utilizado como controle endógeno. Os níveis de (C) nitrito e (E) PGE<sub>2</sub> foram quantificados no sobrenadante das culturas celulares. Em ensaio paralelo, o meio de cultura foi trocado por meio Schneider após 48h de tratamento e a (D) contagem das promastigotas viáveis na presença ou não do inibidor da COX-2 (NS-398) e/ou própolis EPP-AF<sup>®</sup> foi realizada após seis dias. Barras representam  $\pm$ SD de um experimento realizado em quintuplicata, representativo de três ou um experimentos independentes. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foram utilizados para múltiplas comparações (\* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ ; # $p < 0.05$  na comparação da condição não infectado (barra cinza claro) versus infectado (barra preta) e + $p < 0.05$  na comparação da condição exposta ao NS398 versus célula infectada dos níveis de PGE<sub>2</sub> (D). Os limites de detecção de cada mediador foram definidos em *Materiais e Métodos*. La: *Leishmania amazonensis*; NE: Não Estimulado; NI: Não Infectado e EPP-AF<sup>®</sup>: Extrato de própolis verde a 25  $\mu$ g/mL.

Ademais, evidências sugerem que a ativação de iNOS e a consequente produção de NO pode ser regulada pela produção da Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) por macrófagos infectados por *Leishmania* sp (VENTURIN et al., 2020). A PGE<sub>2</sub> é um mediador lipídico biossintetizado a partir da ativação da enzima COX-2 por estímulos inflamatórios, como a presença de LPS, ou citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-2, ou ainda por hormônios e fatores de crescimento (LEES et

al., 2022; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998). Esse mediador lipídico possui diversas funções biológicas, e no contexto de leishmaniose, está associado à sobrevivência do parasito (LONARDONI et al., 1994; VENTURIN et al., 2020). Assim, investigamos o papel da COX-2 / PGE<sub>2</sub> no tratamento *in vitro* com o extrato EPP-AF<sup>®</sup> em células infectadas com *L. amazonensis*. As análises por western blotting mostraram que o EPP-AF<sup>®</sup> foi capaz de aumentar a expressão da enzima COX-2 tanto em células não infectadas quanto em células infectadas com *L. amazonensis* (Figura 8B). Ademais, o tratamento de macrófagos infectados por *L. amazonensis* com NS398, inibidor seletivo da atividade da COX-2, reduziu de forma significativa o número de promastigotas viáveis recuperadas no sobrenadante das culturas celulares ( $p < 0.01$ ) (Figura 8D). Entretanto, ao adicionar o EPP-AF<sup>®</sup> às culturas previamente incubadas com NS398, o efeito do inibidor é revertido ( $p < 0.05$ ). Nossos resultados corroboram com o observado por Araújo-Santos e colaboradores (2014) sobre o efeito da inibição farmacológica de COX-2 pelo NS398 na infecção *in vivo* por *L. infantum*, condição na qual houve redução da carga parasitária.

Apesar dos indícios de que o EPP-AF<sup>®</sup> induz a expressão de COX-2 *in vitro*, ao analisar os níveis da PGE<sub>2</sub>, observamos que o tratamento com o EPP-AF<sup>®</sup> reduz significativamente os níveis desse mediador, tanto por células não infectadas e expostas ao LPS, quanto por células não infectadas e primadas com IFN- $\gamma$  ou ainda por células infectadas com *L. amazonensis* ( $p < 0.01$ ). Interessantemente, o tratamento de células infectadas com o extrato de própolis parece potencializar a ação do inibidor NS398 na redução dos níveis de PGE<sub>2</sub> ( $p < 0.01$ ) (Figura 8E). Esses dados sugerem que, apesar do EPP-AF<sup>®</sup> induzir maior expressão de COX-2, a atividade desta enzima parece estar inibida, dado a capacidade do EPP-AF<sup>®</sup> em reduzir os níveis de PGE<sub>2</sub> e potencializar o efeito do inibidor NS398 na redução dos níveis desse mediador lipídico. Análises *in silico* demonstraram a capacidade de um extrato de própolis uruguaia ou de seus principais compostos fenólicos em inibir as enzimas COX-1 e COX-2 (PAULINO et al., 2016), enquanto redução dos níveis de PGE<sub>2</sub> foi observado nos sobrenadantes de macrófagos expostos ao LPS ou ao ácido araquidônico e tratados com própolis (ROSSI et al., 2002). Assim, são necessárias mais avaliações sobre o efeito do inibidor NS398 na infecção *in vitro* por *L. amazonensis* e o possível efeito antagonista da própolis EPP-AF<sup>®</sup> nesse contexto.

De acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia o efeito do tratamento com extrato de própolis na expressão das enzimas arginase I e ODC, além da produção da PGE<sub>2</sub> na infecção por *Leishmania*. Assim, enquanto o tratamento com EPP-AF<sup>®</sup>

em macrófagos infectados por *L. amazonensis* parece não influenciar a expressão das enzimas arginase 1e ODC, por outro lado, mostra-se capaz de modular a expressão e atividade da iNOS e COX-2, assim como reduzir os níveis de NO e PGE<sub>2</sub>.

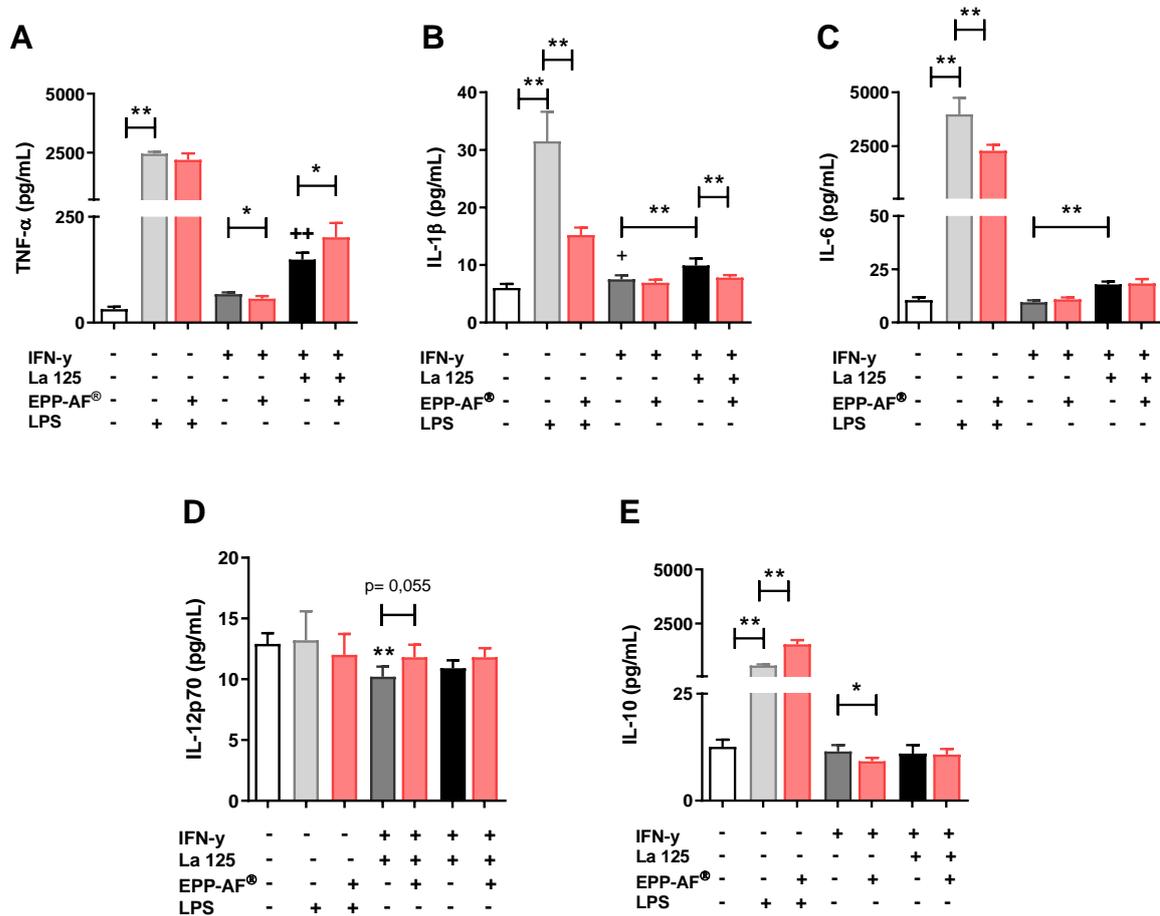
### **Efeito imunomodulador do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> na infecção de *in vitro* por *L. amazonensis***

O efeito do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> sobre a produção de citocinas foi avaliado no sobrenadante de macrófagos primados com IFN- $\gamma$  e infectados ou não com *L. amazonensis*. Neste estudo, o EPP-AF<sup>®</sup> aumentou de forma significativa os níveis de TNF- $\alpha$ , ao passo que reduziu de forma significativa a produção da citocina inflamatória IL-1 $\beta$  produzidos por células infectadas com *L. amazonensis* (Figuras 9A e 9B, respectivamente). Nenhuma diferença estatística foi observada para a produção de IL-6 (Figura 9C), IL-12p70 (Figura 9D) e IL-10 (Figura 9E) por macrófagos infectados e tratados com própolis. Ademais, o extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> também se mostrou capaz de modular o perfil de produção de citocinas por macrófagos não infectados e expostos ao LPS, ao reduzir os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  (Figura 9B) e IL-6 (Figura 9C), além de aumentar a produção da citocina regulatória IL-10 (Figura 9E).

A Leishmaniose Cutânea é caracterizada por um intenso e descontrolado processo inflamatório, o que, além de não eliminar completamente o parasito, leva à destruição tecidual. A eliminação de parasitos *Leishmania* e o controle da progressão da doença dependem do delicado equilíbrio entre as respostas inflamatória e anti-inflamatória. Uma resposta Th1 sustentada, caracterizada pela presença de mediadores pró-inflamatórios IL-12, IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , NO e EROs, além da modulação de mediadores anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e PGs, e mediadores lipídicos pró-resolução (resolvinas, lipoxinas, protectinas e maresinas), promovem a ativação dos macrófagos, com conseqüente controle da carga parasitária, e ativam processos de resolução da inflamação e reparo tecidual, levando a cura clínica (ABDOLI et al., 2017; BUCKLEY et al., 2014).

Este estudo corrobora com a literatura científica acerca do efeito imunomodulador da própolis (CONTE et al., 2021; DA SILVA et al., 2016; DOS SANTOS THOMAZELLI et al., 2017; TOUZANI et al., 2019), o qual foi aqui demonstrado em diferentes contextos inflamatórios. A modulação de TNF- $\alpha$  pode representar um potencial via de controle do

parasito intracelular exercido pelo EPP-AF<sup>®</sup>, uma vez que esta citocina desempenha um importante papel no controle da infecção por *Leishmania*, sendo capaz de influenciar o desfecho clínico (RODRIGUES et al., 2021; TARAGHIAN et al., 2021).



**Figura 9: Efeito imunomodulador *in vitro* do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup>.** MDMO, previamente primados *overnight* como 100U/mL de IFN-γ, foram expostos ao LPS (50 μg/mL) ou infectados com *L. amazonensis* e tratados com o extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> a 25 μg/mL. Após 48 h de tratamento, os sobrenadantes foram coletados e os níveis das citocinas (A) TNF-α; (B) IL-1β; (C) IL-6; (D) IL-12p70 e (E) IL-10 foram avaliados por ensaio multiplex, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Barras representam ±SD de um experimento realizado em quintuplicata. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foram utilizados para múltiplas comparações e o teste de Mann-Whitney para comparações entre dois grupos (\*p < 0.05 e \*\*p < 0.01 e #p < 0.05 ##p < 0.01 na comparação da condição não infectado (barra cinza escuro) versus infectado (barra preta) dos níveis de d TNF-α (A) e IL-1β (B). Os limites de detecção de cada mediador foram definidos em *Materiais e Métodos*.

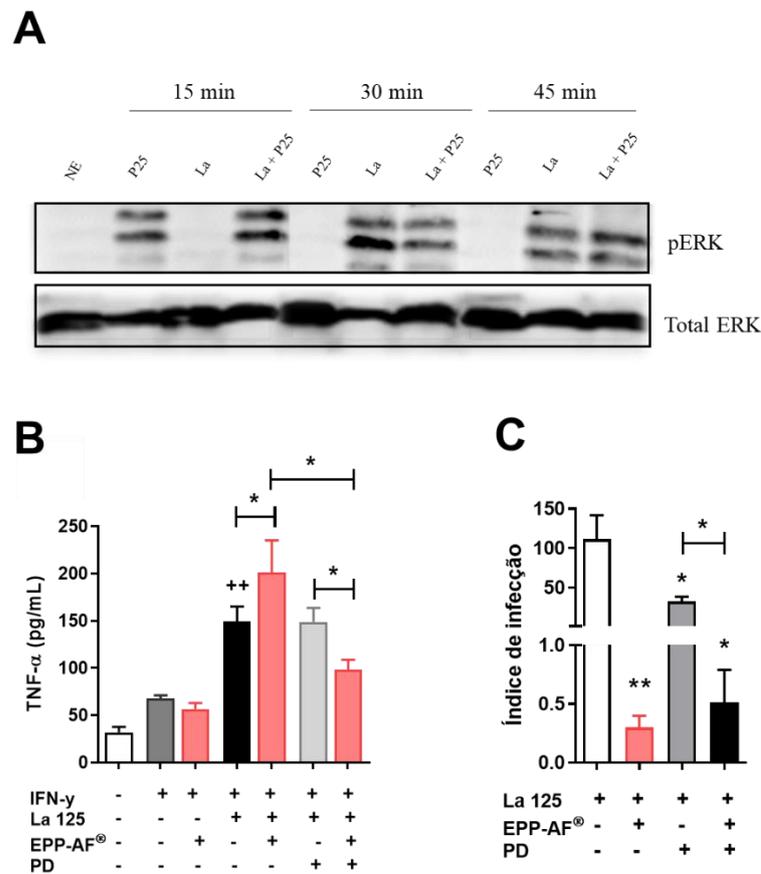
### **Ativação da via ERK 1/2 em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e tratados com o extrato de própolis verde EPP-AF®**

As quinases 1/2 reguladas por sinal extracelular (ERK 1/2) pertencem à família da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). ERK 1/2 regulam a sinalização celular envolvida em processos celulares básicos, como proliferação e diferenciação celular, em condições normais e patológicas (GUO et al., 2020). Nossos achados sugerem que o tratamento com o extrato de própolis verde EPP-AF® é capaz de ativar a via ERK 1/2 em macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis*, já após 15 min de tratamento. Após 30 minutos de tratamento, só é possível detectar a expressão de ERK 1/2 fosforilada na infecção por *L. amazonensis*, na presença ou não do EPP-AF®, mantendo-se estável até 45 min pós-tratamento (Figura 10A). Estudos mostram a capacidade da *Leishmania amazonensis* em manipular a fosforilação de ERK 1/2 do hospedeiro e, assim, promover sua própria sobrevivência (BOGGIATTO et al., 2009, 2014; YANG et al., 2007).

Posteriormente, avaliamos se a inibição farmacológica de ERK 1/2, com o inibidor PD98059, é capaz de influenciar nos níveis de citocinas e mediadores inflamatórios produzidos por macrófagos após tratamento com o EPP-AF®. Na presença do inibidor PD98059, observou-se redução estatisticamente significativa dos níveis de TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ) nas células infectados por *L. amazonensis* e tratadas com o EPP-AF® (Figura 10B). Uma vez que o tratamento com o EPP-AF® em células infectadas mostrou-se capaz de aumentar significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  (Figuras 9A), os dados de mensuração desta citocina na presença do inibidor de ERK 1/2 é interessante e abre perspectiva para mais avaliações. Ademais, evidências sugerem que ERK 1/2 desempenham um papel importante na regulação da produção de citocinas, como TNF- $\alpha$ , por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, além de sua associação com a indução de Nrf2, que pode induzir a expressão de genes antioxidantes, como a enzima HO-1 (DE MENEZES et al., 2019; HOFFMEYER et al., 1999; RUTAULT et al., 2001; SABIO; DAVIS, 2014). Ademais, a indução da expressão de COX-2 foi associada à via de sinalização ERK 1/2 em células estromais de endometriose humana, bem como em câncer de células colorretais (ELDER et al., 2002; HUANG et al., 2013). Assim, a via ERK 1/2 pode estar envolvida no aumento da expressão de COX-2 e HO-1 por células tratadas com o EPP-AF®. Dessa forma, avaliamos se a prévia inibição da via ERK 1/2 também exerceria influência no efeito leishmanicida do EPP-AF®. Como mostrado na Figura 10C, nenhuma diferença

estatística foi observada na redução do índice de infecção das culturas celulares tratadas apenas com o EPP-AF<sup>®</sup> quando comparada ao mesmo tratamento na presença do inibidor PD98059.

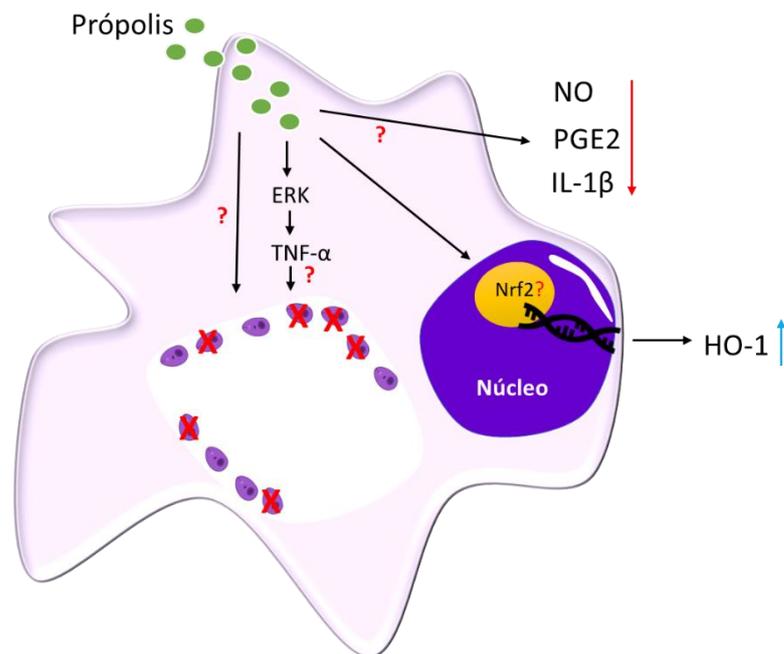
Nossos dados sugerem que o tratamento *in vitro* com o EPP-AF<sup>®</sup> ativa a via ERK 1/2, que por sua vez parece estar associada à produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos infectados por *L. amazonensis* e tratados com o EPP-AF<sup>®</sup>, sem, contudo, apresentar relevância na redução da viabilidade intracelular de *L. amazonensis*. Neste contexto, o papel de TNF- $\alpha$  no efeito leishmanicida do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> necessita ser melhor investigado



**Figura 10: Tratamento com extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> ativa ERK 1/2 em macrófagos.** MDMO foram infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados com o extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> a 25  $\mu$ g/mL por 15, 30 ou 45 min. Após cada tempo de tratamento, os extratos celulares foram coletados e analisados por Western Blotting para a avaliação dos níveis proteicos de (A) ERK 1/2 fosforilado (pERK) e total (Total ERK). Anticorpo anti- $\beta$ -Actina foi utilizado como controle endógeno. (B) Níveis de TNF- $\alpha$  e (C) índice de infecção obtidos sob as mesmas condições, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Barras representam  $\pm$ SD de um experimento realizado em quintuplicata. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foram utilizados para múltiplas comparações e o teste de Mann-Whitney para comparações entre dois grupos (\* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$  e # $p < 0.05$  na comparação da condição não infectado (barra cinza escuro) versus infectado (barra preta) dos níveis de de TNF- $\alpha$  (C). La: *Leishmania amazonensis*; NE: Não Estimulado; PD: PD98059 e EPP-AF<sup>®</sup>: Extrato de própolis verde a 25  $\mu$ g/mL.

## Conclusão Parte I

Demonstramos aqui o potencial leishmanicida e imunomodulador do extrato de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> em macrófagos infectados por *L. amazonensis*. O tratamento *in vitro* com o EPP-AF<sup>®</sup> foi capaz de modular a produção de mediadores em diferentes contextos inflamatórios, bem como ativar a via de sinalização celular ERK 1/2. A habilidade do extrato de própolis em reduzir mediadores inflamatórios como NO e IL-1 $\beta$ , além de reduzir os níveis de PGE<sub>2</sub> (associada ao favorecimento da infecção), ao passo que aumenta a expressão da enzima antioxidante HO-1 e os níveis da citocina inflamatória TNF- $\alpha$  (importante no controle da carga parasitária), sugere seu potencial em orquestrar uma resposta imune inata efetora e equilibrada, interessante para o tratamento da Leishmaniose Cutânea, condição associada a intenso processo inflamatório. A Figura 11 resume os principais achados.

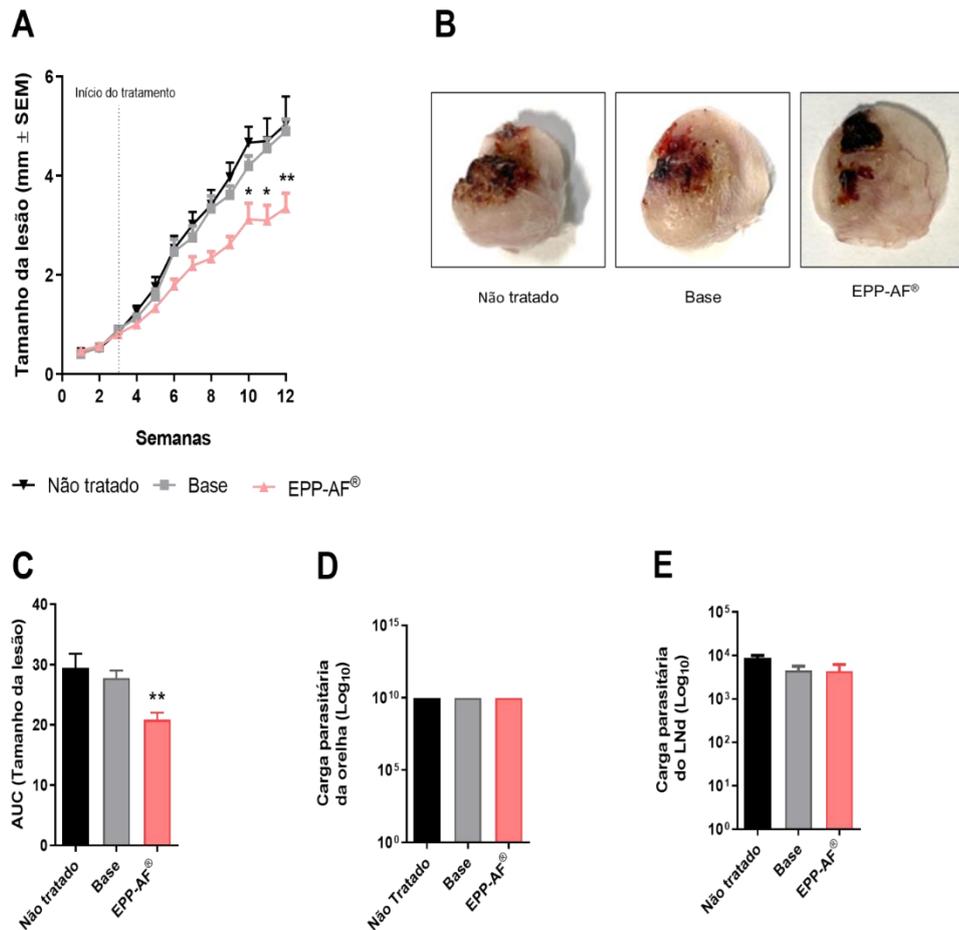


**Figura 11: Efeito imunomodulador do extrato glicólico de Própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> em macrófagos infectados por *L. amazonensis*.** O tratamento com o extrato glicólico de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> em células infectadas com *L. amazonensis* leva a fosforilação de ERK 1/2, que foi, em parte, associado à produção de TNF- $\alpha$ . Contudo, o papel da citocina TNF- $\alpha$  no efeito leishmanicida da própolis não foi esclarecido. Por outro lado, o tratamento com própolis foi capaz de reduzir os níveis de NO, PGE<sub>2</sub> e IL-1 $\beta$ , por mecanismos não esclarecidos. Ademais, o aumento da produção de HO-1 também foi observado. O efeito da própolis sobre a ativação de Nrf2, neste contexto, não foi investigado. Finalmente, o efeito leishmanicida da própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> em células infectadas também pode ser associado a um efeito direto no parasito intracelular.

## Parte II

### **Avaliação do tratamento tópico com gel de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> na infecção de camundongos com *L. amazonensis***

Devido aos resultados promissores obtidos *in vitro*, realizou-se a avaliação da eficácia do tratamento tópico com gel de própolis verde, proveniente do mesmo extrato glicólico EPP-AF<sup>®</sup> utilizado nas avaliações *in vitro*, em modelo experimental de infecção por *L. amazonensis*. Assim, camundongos BALB/c foram inoculados na derme da orelha com promastigotas de *L. amazonensis* em fase infectiva e, após três semanas, tratados diariamente de forma tópica com gel EPP-AF<sup>®</sup> a 3.6% (p / v). Após sete semanas de tratamento (décima semana pós infecção), observou-se que o tratamento com EPP-AF<sup>®</sup> foi capaz de reduzir de forma significativa o tamanho da lesão dos animais ( $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ ), como demonstrado através da curva de progressão da lesão (Figura 12A) e pelo cálculo da área sobre a curva (Figura 12C). As fotografias representativas das orelhas infectadas de cada grupo experimental (Figura 12B) mostram que os animais tratados com o gel EPP-AF<sup>®</sup> apresentaram redução do edema e menor área de ulceração. Contudo, não foi observado nenhum efeito na redução das cargas parasitárias da orelha (sítio de infecção e tratamento) bem como do linfonodo drenante (Figuras 12D e 12E, respectivamente). Como já esperado, a Base do gel (gel sem adição de EPP-AF<sup>®</sup>), utilizado aqui como controle de veículo farmacêutico, não apresentou efeito sobre o tamanho da lesão (Figura 12).



**Figura 12: Efeito *in vivo* do tratamento tópico com gel de própolis verde EPP-AF® na infecção por *L. amazonensis*** Camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e tratados diariamente com gel de própolis verde EPP-AF®, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. O desenvolvimento da lesão (**A**) foi avaliado semanalmente utilizando paquímetro analógico. Ao final da 12ª semana de infecção, os animais foram eutanasiados e as orelhas fotografadas (**B**). Em (**C**) é mostrada a análise da área sob a curva do desenvolvimento da lesão. As cargas parasitárias (**D**) da orelha e do (**E**) linfonodo drenante foram avaliadas por diluição limitante. Barras representam  $\pm$ SEM de um experimento representativo de três, utilizando 12 animais por grupo. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foram utilizados para múltiplas comparações (\* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ ). EPP-AF®: Extrato de própolis verde.

A infecção de camundongos BALB/c por *L. amazonensis* é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões progressivas e crônicas, altamente inflamatórias e parasitadas (DE OLIVEIRA & BARRAL-NETO, 2005). Devido ao perfil suscetível desta linhagem de camundongo à infecção por *L. amazonensis*, esta torna-se interessante para estudos de eficácia de novos candidatos à terapêutica da Leishmaniose Cutânea.

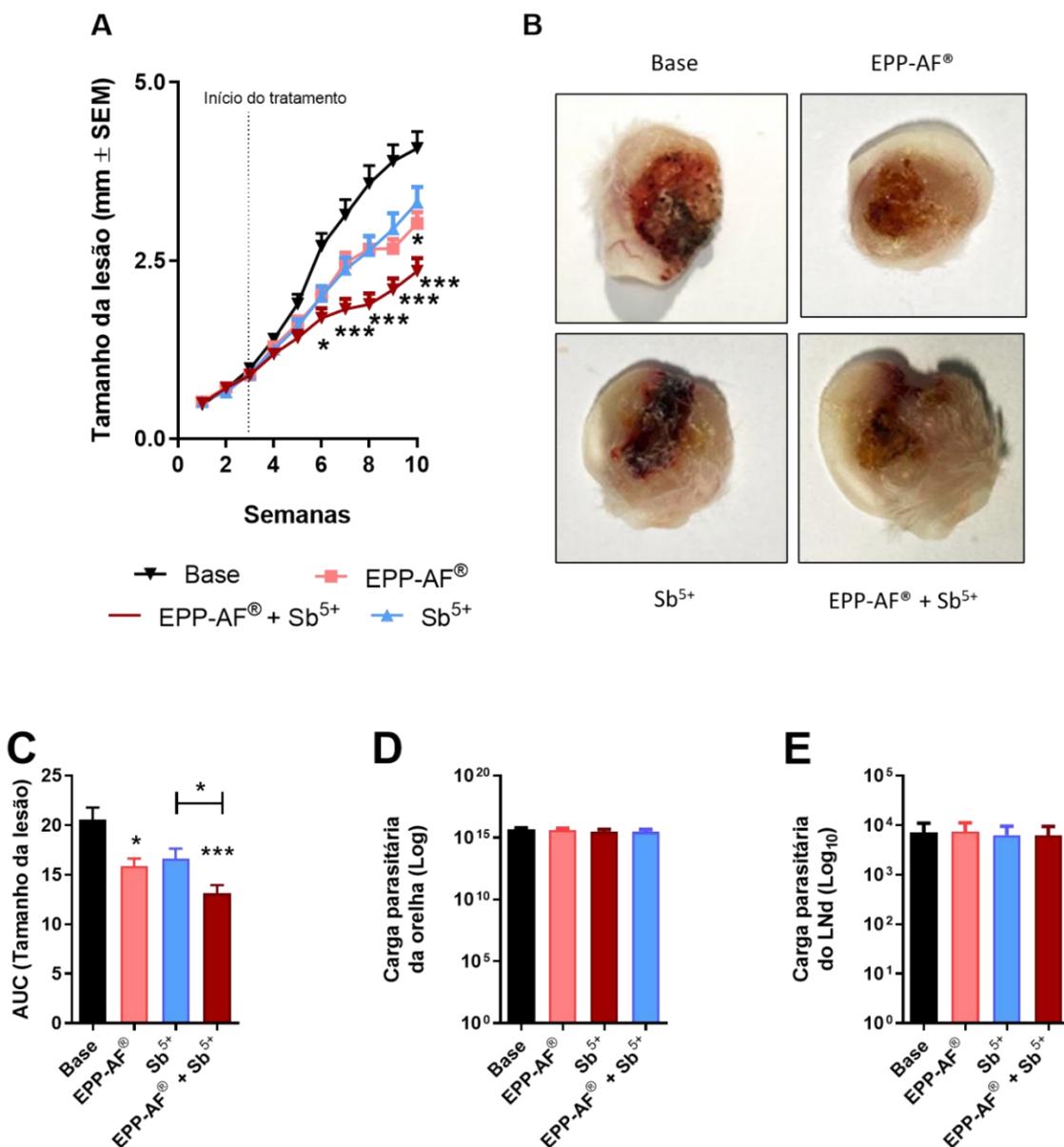
Nesse contexto, diferentes vias de administração de própolis já foram avaliadas em modelo experimental de infecção por *Leishmania*. Miranda e colaboradores (2015) obtiveram sucesso no tratamento de lesões em camundongos causadas por *L. amazonensis* utilizando

própolis de forma oral ou em associação com um doador de óxido nítrico. Ainda, a combinação das vias de administração oral e tópica de própolis apresentou aumento da eficácia na redução das lesões causadas por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c, obtendo melhor êxito que o tratamento com antimoniato de meglumina (PONTIN et al., 2008). Considerando que o extrato de própolis livre é comumente empregado nas avaliações em modelo experimental de leishmaniose, utilizar preparações farmacêuticas que oferecem maior estabilidade, ou com sistema de liberação controlado, ou ainda aumente a biodisponibilidade do composto vinculado, representa uma grande vantagem terapêutica. Aqui, utilizamos com sucesso um gel de carbopol 940 (polímero de poliacrilato reticulado de caráter aniônico, empregado como espessante), contendo extrato glicólico de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> a 3.6% (p / v) e com perfil de liberação gradual e prolongada de seus ativos, como uma formulação de própolis para teste pré-clínico em modelo de Leishmaniose Cutânea causada por *L. amazonensis*. O gel carbopol de EPP-AF<sup>®</sup> já foi empregado com sucesso em modelo pré-clínico de infecção vulvovaginal, apresentando ação antifúngica semelhante ao CMED e de clotrimazol e sem evidências de quaisquer sinais de inflamação nas mucosas avaliadas (BERRETTA et al., 2013).

#### **Avaliação da eficácia da associação do tratamento com gel de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> verde com o antimoniato de meglumina na infecção de camundongos com *L. amazonensis***

Uma vez demonstrada a eficácia do tratamento com o gel de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> na redução do tamanho de lesão de animais infectados com *L. amazonensis*, realizou-se novo ensaio pré-clínico para avaliar a eficácia da associação do tratamento com gel EPP-AF<sup>®</sup> com o antimoniato de meglumina (Sb<sup>5+</sup>), comercialmente disponível no Brasil como Glucantime<sup>®</sup>, medicamento de primeira escolha para tratamento das Leishmanioses. O acompanhamento semanal do desenvolvimento das lesões mostrou a eficácia do tratamento combinado do gel EPP-AF<sup>®</sup> com o antimoniato de meglumina (EPP-AF<sup>®</sup> + Sb<sup>5+</sup>) em reduzir de forma significativa as lesões dos animais a partir da sexta semana pós infecção (terceira semana de tratamento) ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ ) (Figura 13A). Por outro lado, o tratamento apenas com o antimoniato de meglumina (Sb<sup>5+</sup>) não apresentou diferença estatística na redução da lesão dos camundongos. Nesse contexto, o grupo experimental tratado apenas com o gel EPP-AF<sup>®</sup> (EPP-AF<sup>®</sup>) apresentou pequena, porém estatisticamente significativa, redução do tamanho da lesão na décima semana pós-infecção (sétima semana de tratamento) ( $p < 0.05$ ),

corroborando ao observado anteriormente (Figura 12A). O controle não tratado foi realizado utilizando-se a Base do gel (gel sem adição EPP-AF<sup>®</sup>) no mesmo esquema terapêutico dos demais tratamentos, uma vez que se mostrou inerte na avaliação anterior (Figura 12). As fotografias representativas das orelhas infectadas de cada grupo experimental (Figura 13B) mostram que os animais tratados com todos os esquemas terapêuticos apresentaram algum grau de redução do edema e/ou menor extensão de áreas ulceradas em relação ao grupo experimental que recebeu apenas o tratamento com a Base. Mais uma vez, nenhum tratamento foi capaz de reduzir a carga parasitária da orelha nem do linfonodo drenante (Figura 13D e 13E, respectivamente).



**Figura 13: Efeito sinérgico do tratamento tóxico com gel de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> em associação com antimoniato de meglumina na infecção *in vivo* por *L. amazonensis*** Camundongos BABL/c foram infectados na derme da orelha com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e tratados diariamente com gel de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup>, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. O desenvolvimento da lesão (A) foi avaliado semanalmente utilizando paquímetro analógico. Ao final da 12<sup>a</sup> semana de infecção, os animais foram eutanasiados e as orelhas fotografadas (B). Em (C) é mostrada a análise da área sob a curva do desenvolvimento da lesão. As cargas parasitárias (D) da orelha e do (E) linfonodo drenante foram avaliadas por diluição limitante. Barras representam  $\pm$ SEM de um pool de três experimentos realizados utilizando ao menos 10 animais por grupo. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foram utilizados para múltiplas comparações e teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.0001). EPP-AF<sup>®</sup>: Gel de própolis verde; Sb<sup>5+</sup>: antimoniato de meglumina.

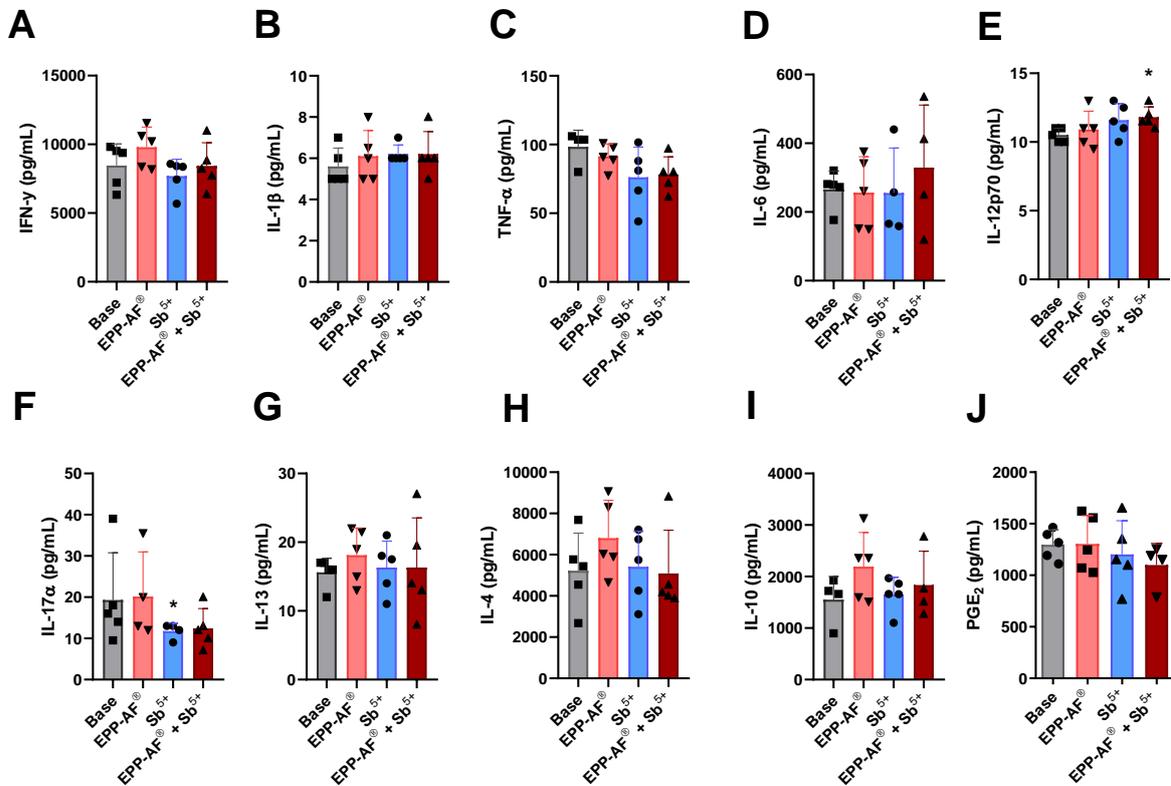
Nossos dados sugerem que o tratamento tóxico com gel de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> sozinho ou, principalmente, em combinação com antimoniato de meglumina é capaz de reduzir o tamanho da lesão dos animais tratados, apesar de não ser capaz de controlar a infecção *in vivo* por *L. amazonensis*. O tratamento com EPP-AF<sup>®</sup> ou com sua associação com o antimoniato de meglumina, utilizando diferentes vias de administração, também se mostrou mais eficaz que o tratamento com o antimoniato de meglumina na redução do tamanho das lesões e/ou da carga parasitária de camundongos, infectados por diferentes espécies de *Leishmania* causadoras de Leishmaniose Cutânea, tais como *L. amazonensis*, *L. major* ou *L. braziliensis* (DA SILVA et al., 2015; NILFOROUSHZADEH et al., 2008; PONTIN et al., 2008). A significativa redução do tamanho de lesão de animais tratados com o gel EPP-AF<sup>®</sup> sem, contudo, apresentar efeito na redução da carga parasitária do sítio de infecção e tratamento (orelha), sugere a modulação de vias anti-inflamatórias no tecido afetado.

### **Modulação da produção de mediadores inflamatórios após tratamento tóxico com gel de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> ou em associação com o antimoniato de meglumina**

A fim de investigar possíveis vias envolvidas na redução da lesão de animais infectados com *L. amazonensis* e tratados com gel EPP-AF<sup>®</sup> sozinho (EPP-AF<sup>®</sup>) ou com a associação do tratamento com gel EPP-AF<sup>®</sup> + antimoniato de meglumina (EPP-AF<sup>®</sup> + Sb<sup>5+</sup>), a presença de mediadores inflamatórios foi avaliada nos sobrenadantes das culturas celulares dos linfonodos recuperados e estimulados *ex vivo* com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (Figura 14), bem como no extrato da orelha (sítio de infecção e tratamento) (Figuras 15) e no soro (Figuras 16) dos grupos experimentais já no estágio tardio da infecção (décima semana).

A associação dos tratamentos com gel EPP-AF<sup>®</sup> + antimoniato de meglumina (EPP-AF<sup>®</sup> + Sb<sup>5+</sup>) mostrou-se capaz de aumentar os níveis da citocina IL-12p70 por células de

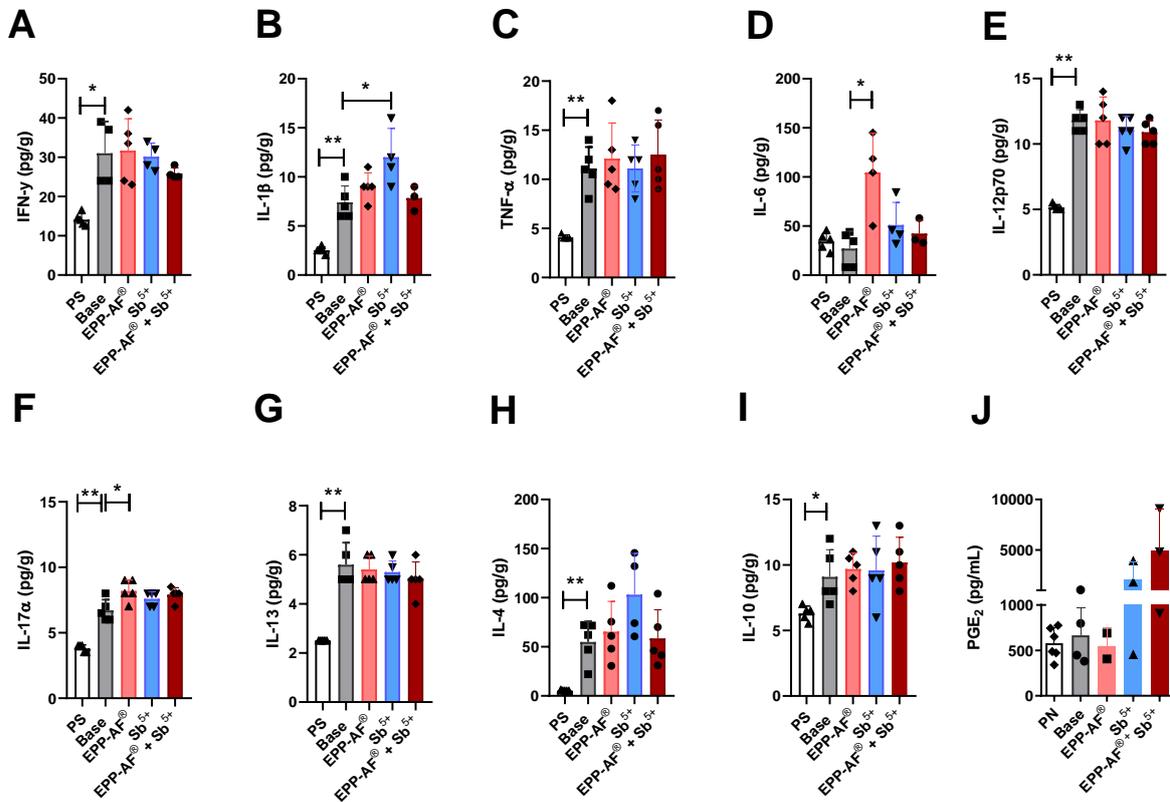
linfonodos estimuladas *ex vivo* com *L. amazonensis* (Figura 14E). Ademais, o tratamento com antimoniato de meglumina ( $Sb^{5+}$ ) reduziu os níveis de IL-17 $\alpha$  (Figura 14F).



**Figura 14: Resposta imune celular de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e tratados de forma tópica com gel de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup>.** Camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha com *L. amazonensis* e tratados diariamente com gel de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> sozinho (EPP-AF<sup>®</sup>), com antimoniato de meglumina ( $Sb^{5+}$ ) ou com a associação do gel de própolis + antimoniato de meglumina (EPP-AF<sup>®</sup> +  $Sb^{5+}$ ). A Base do gel foi utilizada como controle não tratado. Os linfonodos drenantes dos animais foram coletados após sete semanas de tratamento e estimulado de forma *ex vivo* com promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. A presença dos mediadores inflamatórios foi determinada após 48h de estímulo por meio de ensaio multiplex. Barras representam  $\pm$ SD de um experimento realizado com 5 animais por grupo. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foram utilizados para múltiplas comparações e teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos (\* $p < 0.05$ ). Os limites de detecção de cada mediador foram definidos em *Materiais e Métodos*.

Ao analisar os mediadores produzidos localmente no sítio de infecção e tratamento (orelha), observa-se que a infecção de camundongos BALB/c por *L. amazonensis* possui a capacidade de induzir a produção de uma variedade de mediadores envolvidos no processo inflamatório e controle da infecção por *Leishmania* (Figura 15). Com relação aos esquemas terapêuticos empregados, observou-se que o tratamento com gel EPP-AF<sup>®</sup> sozinho (EPP-AF<sup>®</sup>) aumentou significativamente a produção de IL-6 e IL-17 $\alpha$  (Figuras 15D e 15F, respectivamente). Por outro lado, o tratamento com antimoniato de meglumina ( $Sb^{5+}$ ) apenas

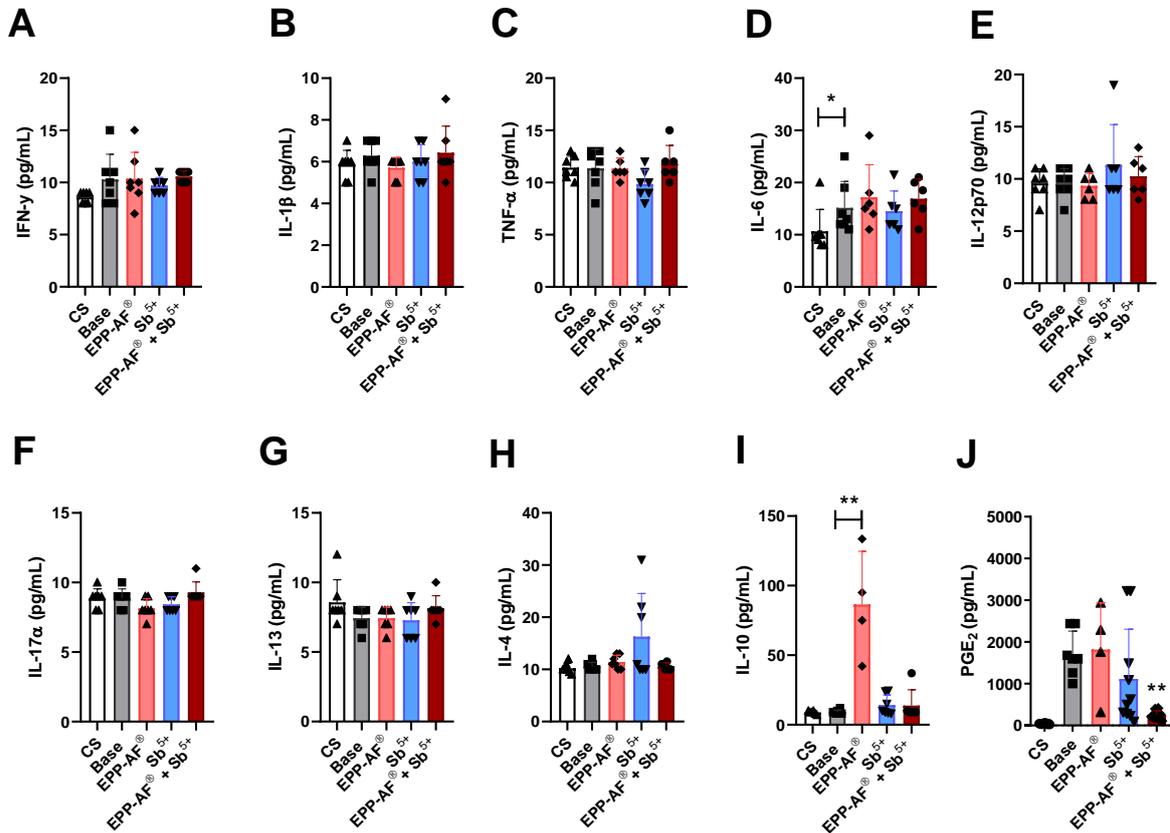
foi capaz de aumentar a produção de IL-1 $\beta$  (Figura 15B). Nenhuma diferença estatística foi observada no tratamento combinado EPP-AF<sup>®</sup> + Sb<sup>5+</sup>.



**Figura 15: Produção de mediadores inflamatórios por orelhas de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e tratados de forma tópica com gel de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup>.** Camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha com *L. amazonensis* e tratados diariamente com gel de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> sozinho (EPP-AF<sup>®</sup>), com antimoniato de meglumina (Sb<sup>5+</sup>) ou com a associação do gel de própolis EPP-AF<sup>®</sup>+ antimoniato de meglumina (EPP-AF<sup>®</sup> + Sb<sup>5+</sup>). A Base do gel foi utilizada como controle não tratado. Orelhas de animais não infectados foram utilizadas como controle de pele sadia (PS). Após sete semanas de tratamento, as orelhas dos animais foram coletadas e maceradas em nitrogênio líquido para obtenção do extrato celular, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. A presença dos mediadores inflamatórios foi determinada após 48h de estímulo por meio de ensaio multiplex. Barras representam  $\pm$ SD de um experimento realizado com 5 animais por grupo. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foram utilizados para múltiplas comparações e teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). Os limites de detecção de cada analito foi definido em *Materiais e Métodos*.

Finalmente, a análise de mediadores encontrados sistemicamente (soro) revelou que nos estágios tardios da infecção de camundongos BALB/c por *L. amazonensis* apenas é possível detectar o aumento dos níveis circulantes de IL-6 (Figura 16D). Nesse sentido, o tratamento com gel EPP-AF<sup>®</sup> induziu maiores níveis de IL-10 (Figura 16I), enquanto o tratamento combinado do gel EPP-AF<sup>®</sup> + antimoniato de meglumina (EPP-AF<sup>®</sup> + Sb<sup>5+</sup>) reduziu

significativamente os níveis da PGE<sub>2</sub> (Figura 16J), o que corrobora em parte com nossos achados *in vitro* para esse mediador lipídico (Figura 8F).



**Figura 16: Efeito do tratamento tópico com gel de própolis verde EPP-AF® nos níveis de mediadores inflamatórios circulantes de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*.** Camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha com *L. amazonensis* e tratados diariamente com gel de própolis verde EPP-AF® sozinho (EPP-AF®), com antimoníato de meglumina (Sb<sup>5+</sup>) ou com a associação do gel de própolis EPP-AF® + antimoníato de meglumina (EPP-AF® + Sb<sup>5+</sup>). A Base do gel foi utilizada como controle não tratado. Após sete semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados por punção cardíaca e os níveis dos mediadores inflamatórios foram mensurados no soro dos animais. Soro de animais não infectados foram utilizados como controle sadio (CS). Barras representam  $\pm$ SD de um experimento realizado com 7 animais por grupo. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foram utilizados para múltiplas comparações e teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos (\* $p < 0.05$ , \*\* e  $p < 0.01$ ). Os limites de detecção de cada mediador foram definidos em *Materiais e Métodos*.

Apesar dos dados imunológicos indicarem que o tratamento tópico com o EPP-AF® sozinho ou combinado ao antimoníato de meglumina não altera o perfil inflamatório dos animais, observamos redução significativa no tamanho da lesão, não acompanhado de redução da carga parasitária do sítio de infecção. Uma justificativa para isto seria o tempo tardio utilizado para as análises (10 semanas após a infecção), o que poderia ser solucionado ao realizar

uma cinética de avaliação de produção de mediadores em diferentes tempos de infecção e tratamento. Nesse sentido, trabalhos já mostram a capacidade de diferentes extratos de própolis e seus principais constituintes químicos em induzir a cicatrização de lesões. Romana-Souza e colaboradores (2018) observaram a eficácia do ácido cafeico em promover a cicatrização de úlceras de pressão em modelo experimental, no qual diferenças na modulação de iNOS, NO, TNF- $\alpha$ , e NF $\kappa$ B foram observadas em tempo mais inicial de análise comparada ao tempo tardio. O tratamento combinado com própolis e um complexo de rutênio doador de óxido nítrico também foi eficaz em reduzir a lesão de animais infectados com *L. amazonensis*, através da modulação dos níveis de NO, IL-10, TGF- $\beta$  e recrutamento celular, todos observados após 30 dias de tratamento (MIRANDA et al., 2015).

## **Conclusão Parte II**

Nesta segunda parte do trabalho, o tratamento com um gel de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> foi capaz de reduzir o tamanho das lesões de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, evento não associado à redução da carga parasitária ou à modulação de mediadores inflamatórios produzidos por linfonodos estimulados *ex vivo*, localmente na orelha, ou ainda produzidos sistemicamente (soro).

Neste capítulo, demonstramos o potencial de um extrato de própolis verde ou uma formulação em gel, ambos oriundos de um extrato padronizado (EPP-AF<sup>®</sup>) em reduzir a carga parasitária enquanto modula importantes vias e mediadores inflamatórios celulares *in vitro*. A combinação de importantes fatores, como padronização, reprodutibilidade, atividades biológicas comprovadas *in vivo* e *in vitro* permitem que o EPP-AF<sup>®</sup> seja considerado para o desenvolvimento de um potencial novo produto farmacêutico adjuvante para o tratamento da LC.

## 7 HIPÓTESE

As lignanas Iangambina e Epi-Iangambina controlam a infecção *in vitro* por *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*.

### 7.1 OBJETIVOS

#### 7.1.1 Objetivo geral

Avaliar o controle da infecção *in vitro* por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* das lignanas Iangambina e Epi-Iangambina como candidatos promissores para o tratamento aditivo da Leishmaniose Cutânea Localizada.

#### 7.1.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a citotoxicidade dos compostos Iangambina e Epi-Iangambina em cultura de macrófagos não infectados;
2. Testar o efeito dos compostos Iangambina e Epi-Iangambina na infecção de macrófagos por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*;
3. Avaliar a capacidade imunomodulatória dos compostos Iangambina ou Epi-iangambina em células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*.

## 8 MANUSCRITO III

### **Efeito leishmanicida e imunomodulatório das lignanas Iangambina e Epi-Iangambina isoladas de *Ocotea fasciculata* (Nees) Mez**

O trabalho avalia a eficácia de duas lignanas isoladas das folhas de *Ocotea fasciculata* (Nees) Mez, popularmente conhecida como Louro de Cheiro, no controle da infecção *in vitro* por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, agentes etiológicos da leishmaniose cutânea no Brasil.

#### **Resumo:**

A Iangambina e a Epi-Iangambina são as principais lignanas encontradas no Louro-de-Cheiro (*Ocotea fasciculata* (Nees) Mez), árvore nativa da floresta atlântica do nordeste brasileiro e amplamente utilizada na medicina popular. Neste trabalho, exploramos pela primeira vez os efeitos leishmanicida e imunomodulatório de ambas as lignanas na infecção *in vitro* por *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis*, agentes etiológicos da Leishmaniose Cutânea no Brasil. Observamos que ambas as lignanas, Iangambina e Epi-Iangambina, apresentaram efeito concentração-dependente na redução da viabilidade intracelular de ambas as espécies de *Leishmania* (IC<sub>50</sub> La: 43.9 ± 5 e 22.6 ± 4.9 μM, respectivamente; IC<sub>50</sub> Lb: 76 ± 17 e 74.4 ± 9.8 μM, respectivamente). Entretanto, a Epi-iangambina mostrou-se mais seletiva e eficaz frente à infecção *in vitro* por *L. amazonensis*. Por outro lado, as lignanas foram capazes de modular de forma distinta a produção de mediadores e citocinas produzidos por macrófagos infectados por ambas as espécies de *Leishmania* avaliadas, ao reduzir os níveis de mediadores pró-inflamatórios, como NO, PGE<sub>2</sub>, IL-6 e TNF-α, enquanto apenas a Iangambina mostrou-se capaz de aumentar a produção de IL-10 por macrófagos infectados por *L. braziliensis*. Assim, esse trabalho fomenta novos estudos na triagem de compostos naturais bioativos para desenvolvimento de novas opções terapêuticas para tratamento da Leishmaniose Cutânea.

O artigo referente a esse trabalho está em construção.

## INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses infecto-parasitárias causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e transmitidas ao homem através de vetores flebotomíneos. A Leishmaniose Cutânea (LC) é a forma mais comum da doença. De acordo com a OMS, em 2019, mais de 87% dos novos casos de LC ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã (República Islâmica do), Iraque, Líbia, Paquistão, Síria e Tunísia (WHO, 2021). A LC pode produzir múltiplas úlceras na pele com formato redondo ou ovalado, bordas proeminentes, eritematosas e de fundo granuloso, ou ainda comprometer regiões da mucosa nasofaríngea, o que pode levar à desfiguração do sujeito acometido (BRASIL, 2017). No Brasil, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* são os principais agentes etiológicos da LC (MOREIRA et al., 2020).

As drogas de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ) desde 1945 (LIMA et al., 2007). Na ocorrência de falha terapêutica ou impossibilidade de uso dos antimoniais são empregadas uma das drogas de segunda escolha, como a Anfotericina B, Pentamidina<sup>®</sup>, Paromomicina<sup>®</sup> ou Miltefosina<sup>®</sup>. Entretanto, o tratamento com esses fármacos possui sérias desvantagens, como alto custo, efeitos tóxicos e crescentes relatos de falha terapêutica. Assim, é urgente o desenvolvimento de novos tratamentos, eficazes, mais seguros e acessíveis.

A iangambina e seu isômero a epi-iangambina são as principais lignanas encontradas em *Ocotea fasciculata* (Nees) Mez (também conhecida como *Ocotea duckei* Vatti-mo-Gil), árvore nativa da floresta Atlântica do nordeste brasileiro e conhecida popularmente como louro-de-cheiro ou louro-canela.

Várias propriedades farmacológicas vêm sendo atribuídas à iangambina, tais como: antagonista do receptor de ativação plaquetária (PAF) e analgésico (CASTRO-FARIA-NETO et al., 1995; JESUS-MORAIS, 2000), antialérgico (SERRA et al., 1997), analgésico (ALMEIDA et al, 1995), ação protetora contra problemas cardiovasculares e choque anafilático (TIBIRIÇÁ et al, 1996; RIBEIRO et al, 1996; ARAÚJO et al, 2001; ARAÚJO et al, 2014), bem como atividade antitumoral em células colorretais (HAUSSOT et al, 2003) e em células da linhagem tumoral KB (BALA et al, 2015). Estudos também vêm relatando efeito leishmanicida da iangambina sobre as formas promastigotas (MONTE NETO et al, 2007 e 2011), sobre as formas amastigotas intracelulares e em modelo *in vivo* de leishmaniose cutânea (PENHA et al,

2010). Entretanto, até a presente data, não são conhecidos estudos avaliando as propriedades leishmanicidas e imunomodulatórias da epi-iangambina.

Nesse estudo, avaliamos o efeito leishmanicida e imunomodulatório da iangambina e epi-iangambina na infecção de macrófagos por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, principais agentes etiológicos da leishmaniose cutânea localizada no Brasil.

## **MATERIAS E MÉTODOS**

### **Obtenção da Iangambina e Epi-iangambina**

A Iangambina e seu isômero, a Epi-iangambina, foram obtidos em colaboração com a pesquisadora Andresa Beretta da Apis Flora Ind. e Come. Ltda, de Ribeirão Preto, SP, Brasil e Franciane Marquele de Oliveira do Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação, ELEVE Ciência, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

### **Parasitas e Camundongos**

Neste estudo, foram utilizadas as cepas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/Br88/Ba-125) e de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788). As promastigotas foram cultivadas a 26°C, em meio Schneider suplementado com 10% (*L. amazonensis*) ou 20% (*L. braziliensis*) de soro bovino fetal (SBF) e 1% de penicilina, estreptomicina e glutamina. Os camundongos BALB/c (*Mus musculus*), foram obtidos do Biotério IGM/FIOCRUZ e mantidos em condições livre de patógenos, de acordo com o CEUA licença número 005/2020 - IGM/FIOCRUZ.

### **Obtenção de MDMO**

Camundongos Balb/c foram anestesiados por via intravenosa por injeção de dose letal de tiopental sódico (100 mg/kg), seguido de deslocamento cervical para confirmação da morte. Após a eutanásia, o abdômen e as patas do camundongo foram lavados com álcool 70%. Foi feita uma incisão na linha média do abdômen e após isso a pele foi puxada, para expor os músculos das patas posteriores. As patas foram removidas com tesoura cirúrgica e a tíbia e o fêmur de cada pata então dissecados. Os ossos foram lavados com álcool 70% e foi realizada a

lavagem interna do fêmur e tíbia com o meio de cultura. As células obtidas foram cultivadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, em meio RPMI suplementado com 20% de SBF, 30% de sobrenadante de fibroblastos L929 e 1% de penicilina-estreptomicina-glutamina e incubadas por 7 dias para diferenciação em macrófagos.

### **Avaliação da viabilidade de macrófagos tratados com Iangambina e Epi-Iangambina**

MDMO, obtidos como acima descrito, foram plaqueados na densidade de  $1 \times 10^5$ /poço em placas de cultura de 96 poços e incubados por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de aderência, os macrófagos foram tratados com os compostos Iangambina e Epi-Iangambina em diferentes concentrações (1000 – 15.6 µM) e incubados por 48h à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Meio RPMI, suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina-estreptomicina-glutamina foi utilizado como controle de 100% de viabilidade, enquanto DMSO (~ 0,1% v/v) foi utilizado como controle do veículo de diluição dos compostos. Em seguida, os sobrenadantes das células foram incubados por 30min (a temperatura ambiente e protegido da luz) com o kit de citotoxicidade de Lactato Desidrogenase (LDH) (Roche) e as células foram incubadas por 4h com meio de cultura contendo 10% de sal de Resazurina de sódio (Sigma). A absorbância para o ensaio de LDH foi lida a 490 nm e para o ensaio de redução de Resazurina de sódio foi lida a 570 e 600 nm, utilizando-se espectrofotômetro SPECTRA Max 190.

### **Avaliação da viabilidade intracelular de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis***

MDMO foram plaqueados na densidade de  $1 \times 10^5$ /poço e deixados *overnight* a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, para total aderência. Posteriormente, as células foram infectadas com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* na proporção 10:1 (*Leishmania*: macrófagos), por 4h ou 24h, respectivamente. Em seguida, as culturas de macrófagos foram lavadas 3x com salina, para remover os parasitos não internalizados, e tratados com os compostos Iangambina e Epi-Iangambina em diferentes concentrações (50 - 200 µM) por 48h, à 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Meio RPMI suplementado foi utilizado como controle. Após o tempo de tratamento, o meio foi trocado para o meio Schneider suplementado e as culturas celulares foram incubadas em estufa B.O.D por 6 dias a 26°C. A contagem dos parasitos viáveis foi realizada por microscopia óptica utilizando-se a Câmara de Neubauer.

## **Avaliação do efeito imunomodulatório dos compostos Iangambina e Epi-Iangambina em macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis***

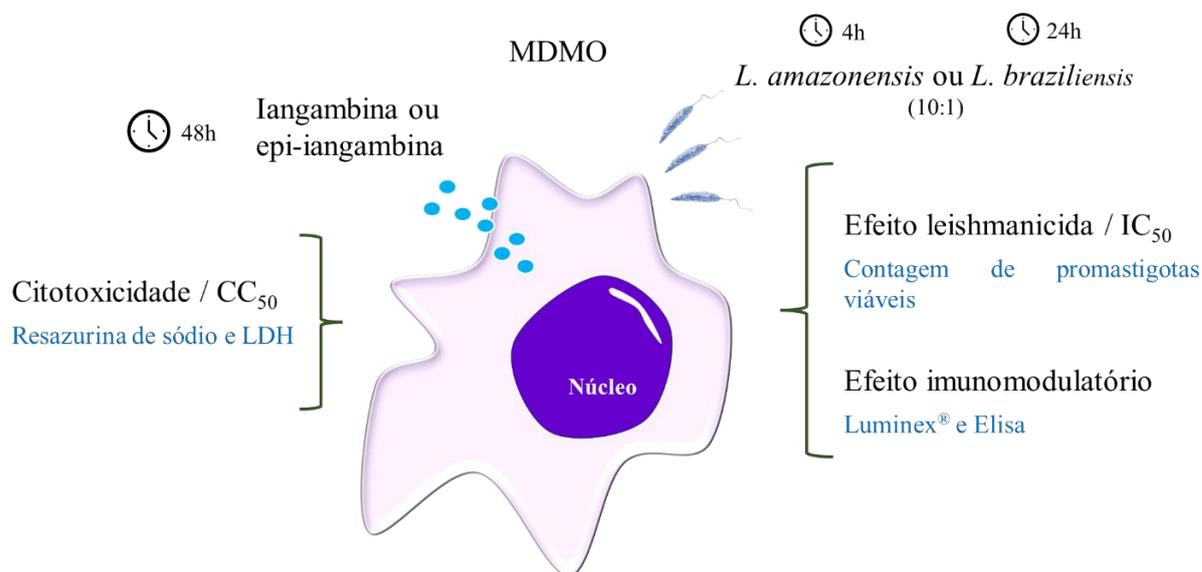
MDMO ( $5 \times 10^5$ /poço) foram estimulados com IFN- $\gamma$  (100U/mL) *overnight* e, posteriormente, infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* por 4h e 24h, respectivamente. Após a infecção, a cultura foi lavada 3x para remover os parasitos não internalizados e o estímulo de IFN- $\gamma$  foi reaplicado juntamente com 100  $\mu$ M dos compostos Iangambina e Epi-Iangambina. Macrófagos não tratados foram utilizados como controles. Após 48 horas de tratamento, os sobrenadantes de cultura foram aspirados, e os níveis das citocinas IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12p70 foram determinados por ensaio multiplex, utilizando kit MILLIPLEX<sup>®</sup>, baseado na tecnologia Luminex<sup>®</sup> xMAP<sup>®</sup>. Os níveis de óxido nítrico foram avaliados através da determinação dos níveis de nitrito no sobrenadante das culturas celulares, utilizando o método de Griess. Já os níveis de PGE<sub>2</sub> foram avaliados por ensaio Elisa, conforme instruções do fabricante. Os limites de detecção para os mediadores foram estabelecidos pelo fabricante: NO (0.19  $\mu$ M); IL-10 (5.6 pg/mL), IL-12p70 (12.9 pg/mL), IL-1 $\beta$  (3.3 pg/mL), IL-6 (3.3 pg/mL), TNF- $\alpha$  (1.3 pg/mL) e PGE<sub>2</sub> (9.5 pg/mL).

### **Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram avaliados quanto às diferenças estatísticas utilizando diferentes testes. Para múltiplas comparações foi utilizado Kruskal-Wallis e para comparações entre dois grupos foi realizado o Teste t de Student, com intervalo de confiança de 95%, sendo os valores considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0.05$ . A concentração de inibição média (IC<sub>50</sub>) sobre a viabilidade intracelular do parasito e a concentração de citotoxicidade capaz de reduzir em 50% da viabilidade celular (CC<sub>50</sub>) foram determinadas a partir de regressão sigmoidal das curvas de concentração-resposta. O índice de seletividade (IS) foi calculado como a razão entre o CC<sub>50</sub> do MDMOs não infectados / IC<sub>50</sub> para o parasito intracelular. As análises foram realizadas utilizando o GraphPad V. 8.0 (Prism Software, EUA). Uma análise de cluster hierárquica usando o método de Ward foi realizada para testar se os níveis de citocinas poderiam diferenciar as condições de células infectadas com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* e tratadas ou não com os compostos iangambina ou epi-iangambina. Os valores médios dos mediadores (Log10) medidos nos sobrenadantes após 48h de tratamento

(conforme acima descrito) foram calculados para cada condição de tratamento *in vitro*. Os *heatmaps* foram construídos usando JMP Pro V. 13.0.0.

## Delineamento experimental



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

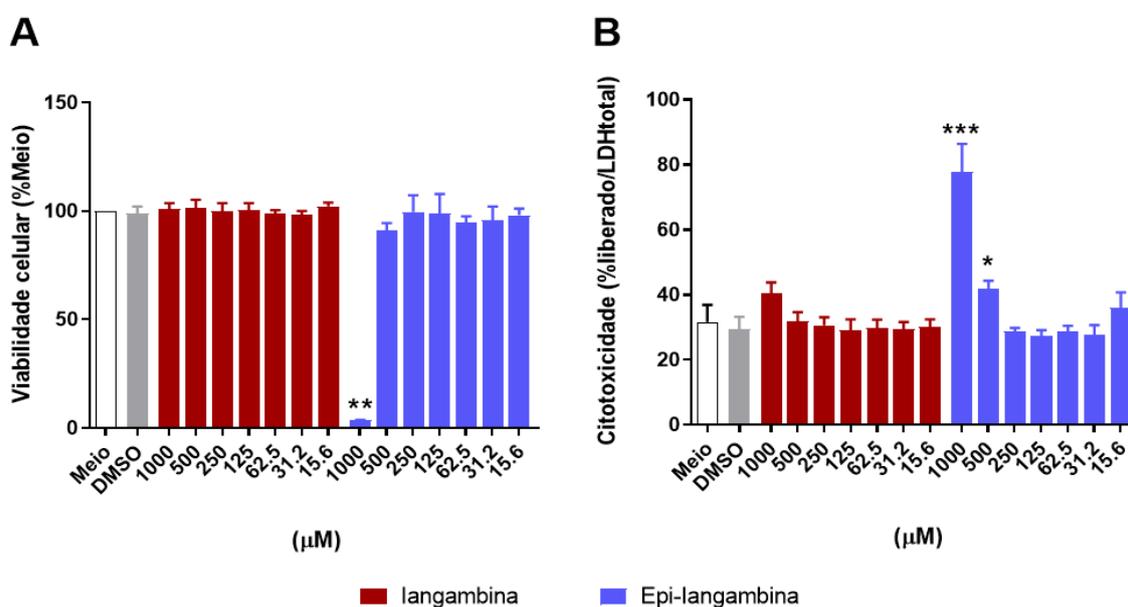
### Citotoxicidade das lignanas Iangambina e Epi-iangambina

O potencial efeito citotóxico da Iangambina e Epi-iangambina foi avaliado em MDMO empregando as técnicas de redução da resazurina de sódio e LDH. Em ambas as técnicas utilizadas, verificou-se que somente a Epi-Iangambina foi capaz de afetar significativamente a viabilidade celular nas maiores concentrações utilizadas (1000 e 500  $\mu\text{M}$ , isto é, 445 e 225  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), sendo a concentração de 1000  $\mu\text{M}$  capaz de reduzir em  $\sim 97\%$  a viabilidade das células avaliadas pelo ensaio de Resazurina de sódio ( $p < 0.01$ ) (Figura 17A) e induzir  $\sim 77\%$  a liberação de LDH ( $p < 0.0001$ ) (Figura 17B). Assim, o  $\text{CC}_{50}$  encontrado para a epi-iangambina foi de  $534 \pm 105 \mu\text{M}$ , Tabela 1. Como a iangambina não apresentou efeito citotóxico evidente em nossas análises, não foi possível calcular o  $\text{CC}_{50}$  para este composto.

Monte Neto e colaboradores (2008) avaliaram a citotoxicidade da iangambina sobre macrófagos murinos através dos ensaios de exclusão por *Trypan blue* e pelo ensaio

colorimétrico MTT, nos quais, após 24h de incubação com a lignana, foram observados valores de  $CC_{50}$  de 187  $\mu\text{g/mL}$  (383.8  $\mu\text{M}$ ) e 46.7  $\mu\text{g/mL}$  (504.3  $\mu\text{M}$ ), respectivamente. Em outro estudo avaliando ambas as lignanas, a epi-iangambina foi capaz de reduzir a viabilidade de fibroblastos murinos já com 24h de tratamento, nas concentrações de 160 e 320  $\mu\text{g/mL}$ . Ambas as lignanas reduziram a viabilidade celular a partir da concentração de 80  $\mu\text{g/mL}$  após 48h de tratamento, observado através da técnica de Alamar Blue (MARTINS et al., 2020). As diferenças nos resultados obtidos, apesar de se tratar dos mesmos compostos avaliados, podem estar relacionadas à técnica utilizada, bem como o tipo celular empregado.

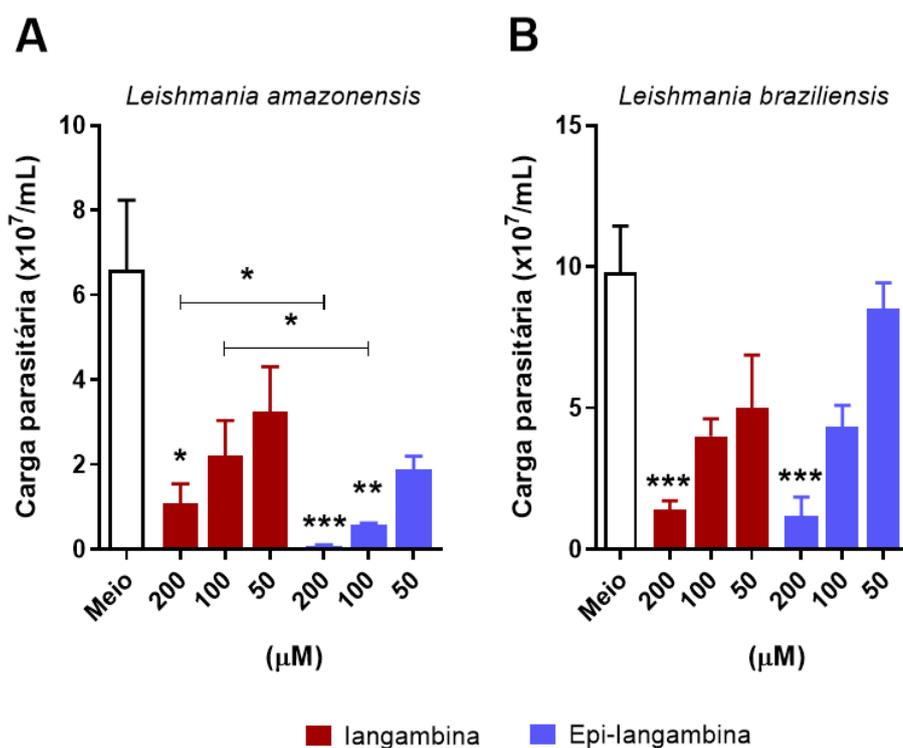
Nossos resultados sugerem que a epi-iangambina possui maior tendência a causar citotoxicidade comparada à iangambina, fato esse também observado por Martins e colaboradores (2020). Devido aos resultados acima relatados, determinou-se a faixa de concentração inferior a 250  $\mu\text{M}$  como segura para a realização dos seguintes ensaios *in vitro* envolvendo células mamíferas.



**Figura 17: Citotoxicidade de macrófagos tratados com diferentes concentrações dos compostos Iangambina e Epi-Iangambina (1000 - 15.6  $\mu\text{M}$ ), demonstrado por ensaio de (A) Resazurina de sódio e (B) LDH total liberado após 48h de tratamento.** Barras representam  $\pm$ SD de um experimento realizado em quintuplicata, representativo de três experimentos independentes. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foram utilizados para múltiplas comparações (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.0001$ ).

### Efeito das lignanas Iangambina e Epi-iangambina na viabilidade intracelular de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

O efeito leishmanicida das lignanas foi avaliado em MDMO infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* (Figura 18). Ambas as lignanas foram capazes de reduzir de forma concentração-dependente a viabilidade intracelular de ambas as espécies de *Leishmania* avaliadas. Entretanto, a epi-iangambina mostrou-se mais eficaz na redução da viabilidade intracelular de *L. amazonensis* comparado à iangambina nas concentrações de 200 e 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) (Figura 18A). Ainda nesse sentido, a epi-iangambina também se revelou mais potente frente à infecção por *L. amazonensis* comparada à infecção por *L. braziliensis* ( $p < 0.05$ ), demonstrado através da comparação dos valores de  $\text{IC}_{50}$  calculados para ambas as espécies (Tabela 3).



**Figura 18:** Efeito leishmanicida da iangambina e epi-iangambina sobre a viabilidade intracelular de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. MDMO foram infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* e tratados com diferentes concentrações dos compostos iangambina e epi-iangambina (200 - 50  $\mu\text{M}$ ) por 48h. A contagem de promastigotas viáveis de (A) *L. amazonensis* e (B) *L. braziliensis* recuperadas nos sobrenadantes das culturas foi realizada após seis dias de troca de meio de cultura, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Barras representam  $\pm\text{SD}$  de um experimento realizado em quintuplicata, representativo de quatro experimentos independentes. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foram utilizados para múltiplas comparações (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.0001$ ).

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo avaliando o efeito da epi-iangambina na redução da viabilidade intracelular de parasitos do gênero *Leishmania*. Ademais, também é o primeiro estudo avaliando o efeito da iangambina na viabilidade intracelular de espécies de *Leishmania* causadora da Leishmaniose Cutânea. Há apenas um estudo de dissertação de mestrado mostrando o efeito leishmanicida da iangambina (200 µg/mL) na redução do número de macrófagos infectados com *L. infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral no Brasil (PENHA et al, 2010).

A Tabela 3 sumariza os valores de CC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> e Índice de Seletividade (IS) para ambos os compostos. Nota-se que, em relação à infecção por *L. amazonensis*, a iangambina e epi-iangambina apresentaram valores de IC<sub>50</sub> de 43.9 ± 5 µM e 22.6 ± 4.9 µM, respectivamente, sendo que a epi-iangambina apresentou valor de IS de 23.6 para esta mesma espécie de *Leishmania*. Segundo Batista e colaboradores (2009), compostos que apresentam IC<sub>50</sub> entre 20 - 100 µM são considerados com moderada atividade. Além disso, compostos que apresentam IS > 10 são considerados como bioativos que merecem mais investigações (INDRAYANTO et al., 2021). Em relação à infecção por *L. braziliensis*, ambas as lignanas apresentaram moderada atividade, com valores semelhantes de IC<sub>50</sub> de 76 ± 17 µM (iangambina) e 74.4 ± 9.8 µM (epi-iangambina) e IS de 7.1 para a epi-iangambina. Como não foi possível determinar o CC<sub>50</sub> da iangambina dentro da faixa de concentração avaliada (Figura 17), conseqüentemente, também não foi possível calcular o IS para este composto. Isso sugere baixa citotoxicidade e alta seletividade para parasitos *Leishmania* em relação à célula hospedeira.

**Tabela 3.** IC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> e Índice de Seletividade (IS) dos compostos Iangambina e Epi-Iangambina.

Composto	<i>L. amazonensis</i> (amastigota intracelular) IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ± SEM <sup>b</sup> (µM)	<i>L. braziliensis</i> (amastigota intracelular) IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ± SEM <sup>b</sup> (µM)	Macrófago CC <sub>50</sub> <sup>c</sup> ± SEM (µM)	IS <sup>d</sup>	
				<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
Iangambina	43.9 ± 5 p=0.057	76 ± 17	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>
Epi-Iangambina	22.6 ± 4.9*	74.4 ± 9.8	534 ± 105	23.6	7.1

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>: Concentração Inibitória 50%: concentração *necessária para inibir* um processo biológico em 50%;

<sup>b</sup> SEM: erro padrão da média;

<sup>c</sup> CC<sub>50</sub>: Concentração Citotóxica 50%: concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%;

<sup>d</sup> IS: Índice de Seletividade. CC<sub>50</sub> do macrófago / IC<sub>50</sub> da amastigota intracelular.

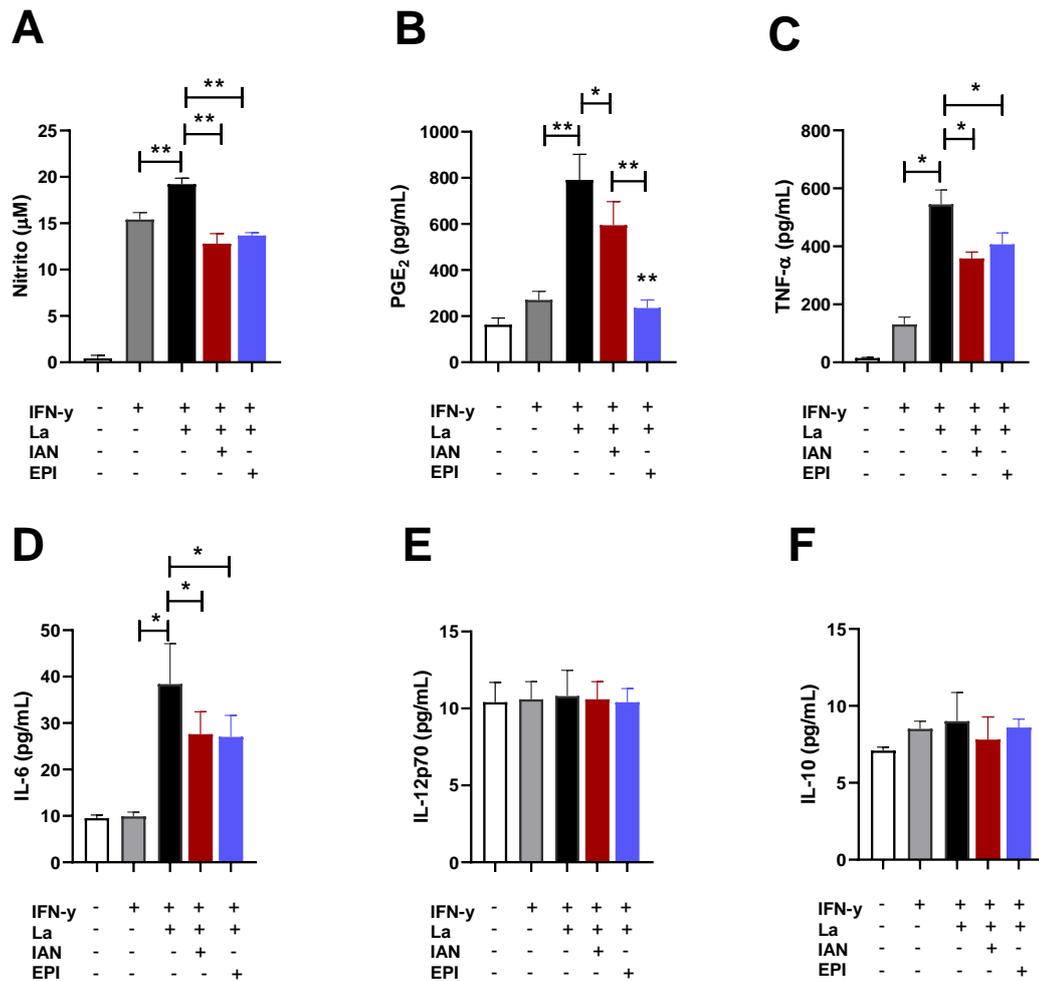
<sup>e</sup> ND: não detectado.

\*p<0.05: Teste t de Student comparando os valores de IC<sub>50</sub> da epi-iangambina para *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

Assim, esses dados indicam que a epi-iangambina é mais seletiva e eficaz na redução da viabilidade intracelular de *L. amazonensis*, comparada à infecção por *L. braziliensis*. Contudo, ao comparar ambas as lignanas, a iangambina mostrou-se menos citotóxica para a célula hospedeira, o que sugere maior seletividade deste composto no *killing* da forma intracelular de ambas as espécies de *Leishmania* avaliadas. Isso torna as lignanas iangambina e epi-iangambina candidatas promissoras para futuras avaliações pré-clínicas para tratamento da LC.

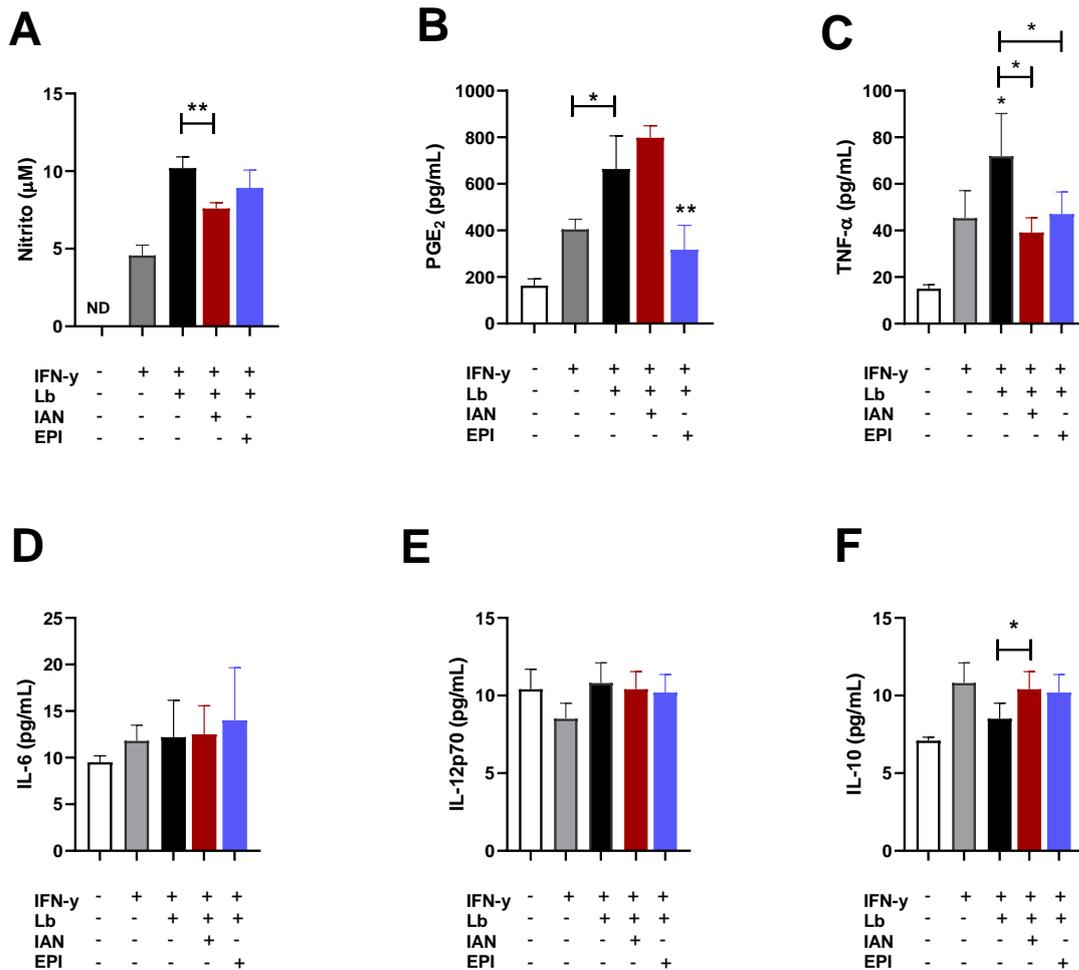
### **Efeito imunomodulatório das lignanas Iangambina e Epi-iangambina**

O efeito imunomodulatório das lignanas iangambina e epi-iangambina foi avaliado nos sobrenadantes de macrófagos previamente estimulados com IFN- $\gamma$ , infectados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* e tratados com as lignanas a 100  $\mu$ M por 48 h, conforme descrito em Materiais e Métodos. Em relação a infecção *in vitro* por *L. amazonensis*, o tratamento com ambas as lignanas foi capaz de reduzir de forma semelhante a produção de óxido nítrico (NO) (p< 0.01), TNF- $\alpha$  (p< 0.05) e IL-6 (p< 0.05) nas células infectadas, enquanto nenhuma diferença estatística foi observada na produção de IL-12p70 e IL-10 (Figura 19). Em relação a PGE<sub>2</sub>, apesar de ambas as lignanas reduzirem de forma significativa os níveis desse mediador (p< 0.05 e 0.01, respectivamente), a epi-iangambina mostrou-se mais potente na redução dos níveis desse mediador lipídico quando comparada a iangambina (p< 0.01) (Figura 19B).



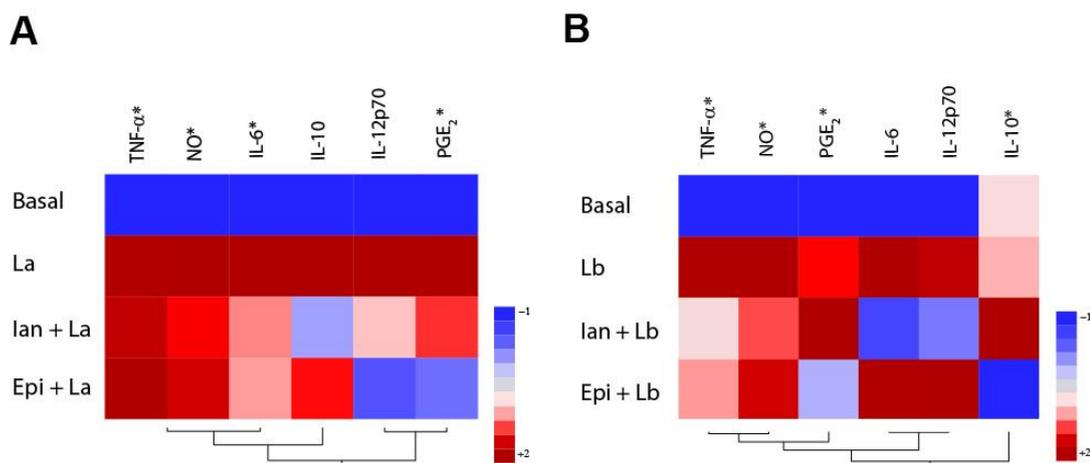
**Figura 19: Efeito imunomodulatório da iangambina e epi-iangambina sobre macrófagos infectados por *L. amazonensis*.** Os mediadores foram analisados nos sobrenadantes das culturas de MDMO previamente estimulados com IFN- $\gamma$ , infectados com *L. amazonensis* e tratados com os compostos iangambina e epi-iangambina (100  $\mu\text{M}$ ) por 48h, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Barras representam  $\pm\text{SD}$  de um experimento realizado em quintuplicata. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foram utilizados para múltiplas comparações e teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre dois grupos (\* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ ). Os limites de detecção de cada mediador foram definidos em *Materiais e Métodos*.

Já com relação a infecção *in vitro* por *L. braziliensis*, observou-se que ambas as lignanas foram capazes de reduzir de forma significativa os níveis de TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ). Entretanto, apenas a iangambina foi capaz de reduzir de forma significativa os níveis de NO ( $p < 0.01$ ), bem como aumentar a produção de IL-10 ( $p < 0.05$ ) por macrófagos infectados. Mais uma vez, a epi-iangambina mostrou-se mais potente em reduzir os níveis de PGE<sub>2</sub>, tanto em relação ao controle infectado ( $p < 0.01$ ) quanto em relação a iangambina ( $p < 0.05$ ), sendo que para esta última não foi observado diferença estatística em relação ao controle infectado. Nenhuma lignana foi capaz de modular a produção de IL-6 e IL-12p70 (Figura 20).



**Figura 20: Efeito imunomodulatório da iangambina e epi-iangambina sobre macrófagos infectados por *L. braziliensis*.** Os mediadores foram analisados nos sobrenadantes das culturas de MDMO previamente estimulados com IFN- $\gamma$ , infectados com *L. braziliensis*, e tratados com os compostos iangambina e epi-iangambina (100  $\mu$ M) por 48h, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Barras representam  $\pm$ SD de um experimento realizado em quintuplicata. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foram utilizados para múltiplas comparações e teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre dois grupos (\* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ ). Os limites de detecção de cada mediador foram definidos em *Materiais e Métodos*.

O padrão da modulação de citocinas e mediadores inflamatórios produzidos por células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* e tratadas ou não com iangambina ou epi-iangambina foram ilustradas por meio de um *heatmap* (Figuras 21A e 21B). A análise do *heatmap* mostra que o tratamento das células infectadas com ambas lignanas é capaz de atenuar o perfil inflamatório através da modulação da produção de citocinas e mediadores inflamatórios.



**Figura 21: Mudança do perfil inflamatório apresentado por macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* e tratados com as lignanas iangambina e epi-iangambina.** Uma análise hierárquica de agrupamento (método de Ward) foi utilizada para avaliar se os níveis de citocinas poderiam diferenciar as condições de células infectadas com (A) *Leishmania amazonensis* ou (B) *Leishmania braziliensis*, tratadas ou não com iangambina ou epi-iangambina, conforme descrito em *Materiais e Métodos*. Asteriscos (\*) representam diferença estatística entre as lignanas em relação ao controle infectado (La ou Lb) no aumento ou redução da produção de mediadores.

A infecção humana pelas espécies *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* apresenta diferente espectro imunológico, onde a *L. amazonensis* possui a tendência em induzir formas clínicas associadas ao pólo anérgico da resposta imune celular do hospedeiro (Leishmaniose Difusa), enquanto a infecção por *L. braziliensis* conduz ao pólo de hipersensibilidade celular (Leishmaniose Mucocutânea). No meio do espectro imunológico, encontra-se a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) (SILVEIRA et al., 2009; SILVEIRA et al., 2004a). Nesse contexto, fica evidente que apenas uma resposta pró-inflamatória não é suficiente para controle da infecção e cura clínica, visto que exacerbada resposta inflamatória com reduzido níveis da citocina regulatória IL-10, é observada na Leishmaniose Mucocutânea, sem, contudo, haver cura da doença (RODRIGUES et al., 2014). Neste contexto, medicamentos e esquemas terapêuticos que possuam ação no controle parasitário ao passo que equilibrem as respostas pró e anti-inflamatórias são desejáveis para o controle dessa condição.

Neste contexto, as lignanas iangambina e epi-iangambina emergem como candidatas promissoras para futuras avaliações para desenvolvimento de novas opções farmacêuticas para tratamento da LC. Nossos dados sugerem que o mecanismo pelo qual ambas as lignanas exercem efeito no controle da infecção por *Leishmania* não está relacionado com a ativação do macrófago. Aqui, as lignanas foram capazes de reduzir a viabilidade intracelular de ambas as

espécies de *Leishmania* avaliadas enquanto reduz os níveis de importantes mediadores pró inflamatórios, como NO, IL-6 e TNF- $\alpha$ .

Apesar de várias propriedades farmacológicas já serem atribuídas a iangambina e, em menor extensão, a epi-iangambina, este é o primeiro estudo que mostra o efeito imunomodulador de ambas as lignanas na infecção de macrófagos por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*.

## **Conclusão**

As lignanas iangambina e epi-iangambina representam potenciais candidatas à terapêutica alternativa para Leishmaniose Cutânea (LC), uma vez que demonstraram efeito leishmanicida *in vitro* acompanhada da redução da resposta inflamatória de macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, agentes etiológicos da LC no Brasil.

## 9 DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que o alto custo, a baixa disponibilidade e a longa duração do tratamento da Leishmaniose são os principais fatores que aumentam a chance de resistência aos medicamentos em países subdesenvolvidos (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; RAJASEKARAN et al., 2015). Ainda, somado ao fato de não haver vacina eficaz para esta condição, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é crucial para o controle desta patologia. Nesse sentido, este estudo usa de ferramentas nanotecnológicas para desenvolver uma nova formulação de Anfotericina B, os Carreadores Lipídicos nanoestruturados com Anfotericina B (CLN-AnB), bem como avalia compostos oriundos da biodiversidade brasileira, Iangambina, Epi-Iangambina e Própolis verde EPP-AF<sup>®</sup>, como potenciais candidatos à terapêutica da leishmaniose.

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

Nesse contexto, os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados são uma abordagem promissora devido à alta capacidade de carregamento de drogas, perfil de liberação controlado dos fármacos veiculados, maior estabilidade e reduzido custo (MÜLLER et al., 2002). Nesse estudo, os CLN foram carregados com a anfotericina B (CLN-AnB), droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente (COHEN, 1998). Os CLN-AnB utilizados neste estudo foram desenvolvidos e caracterizados pelas Dr<sup>a</sup> Franciane Oliveira, Dr<sup>a</sup> Andresa Berretta e pela Msc Maraine Tadini, em uma parceria com duas empresas brasileiras Apis Flora Industrial e Comercial Ltda / Eleve Pesquisa & Desenvolvimento, com o objetivo de desenvolver uma formulação de AnB eficaz, segura e, principalmente, com custo mais acessível. Apesar de já existir formulações de anfotericina B com baixos efeitos tóxicos aprovados para uso clínico

(formulações lipídicas), o alto custo destas formulações ainda representa séria limitação não só na prática clínica, mas como também em estudos científicos (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Por outro lado, o custo do CLN-AnB é de aproximadamente R\$ 5,87 para produção/ampola, valor muito inferior aos R\$ 1.699,089/ampola do Ambisome<sup>®</sup>, produzido pela *Gilead Sciences*, companhia biofarmacêutica norte-americana (CMED, 2022). Assim, o reduzido custo do CLN-AnB pode aumentar o índice terapêutico das leishmanioses e contribuir para mais estudos científicos.

Nossas análises biológicas *in vitro* mostraram a rápida captação dos CLN-AnB por macrófagos infectados por *L. braziliensis* já em 1h após tratamento, assim como maior índice de seletividade em comparação à AnB livre e à formulação micelar de AnB em desoxicolato de sódio (AnB-D). A rápida captação pelos macrófagos reduziria o acúmulo do medicamento em tecidos normais e saudáveis, refletindo no aumento da eficácia, na redução da toxicidade e prevenção de possíveis efeitos colaterais (BRUNI et al., 2017). Além disso, esses achados podem estar relacionados tanto com o reduzido tamanho dos CLN-AnB ( $268 \pm 11.8$  nm) - o que facilitaria o transporte das através das barreiras biológicas, além de proporcionar maior superfície de contato com o microambiente (KHAN et al., 2013; TADINI et al., 2017) - bem como ao perfil de liberação controlado e sustentado em até 46h, tanto em pH 7.4 (fisiológico) quanto em pH 5 (ácido) (TADINI, et al, 2017). Considerando que o pH sugerido para os VPs de *Leishmania* está entre 4.74 e 5.26 (ANTOINE et al, 1990), nanocarreadores com perfil de liberação controlado e estável em pH acidificado, como os CLN-AnB, são promissores para controle intracelular do parasito e, portanto, para o tratamento das leishmanioses.

O principal mecanismo de ação sugerido para a anfotericina B é através da ligação ao ergosterol presente na membrana do parasito, o que levaria à formação de poros na membrana, permitindo a passagem de eletrólitos, como K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, causando morte celular. Entretanto, a indução do *burst* oxidativo e de efeitos imunomoduladores na célula hospedeira, são propostos como mecanismos alternativos, que complementaríamos a ação direta da AnB sobre a membrana do parasito (MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012). Contudo, apesar de considerado como mecanismo alternativo de controle da infecção, a indução de mediadores inflamatórios também está relacionada aos efeitos tóxicos agudos observados no uso clínico da AnB convencional, como febre, dor de cabeça, dor generalizada e náuseas (ARNING et al., 1995; GIGLIOTTI et al., 1987; HEURTAULT et al., 2003; JOHN et al., 1990; ROGERS et al., 1999). Por isso, investigamos a produção de óxido nítrico (NO) e

TNF- $\alpha$  por MDMO infectados com *L. braziliensis*. Nossos dados mostram que os CLN-AnB não são capazes de induzir produção de NO e TNF- $\alpha$  na concentração de IC<sub>50</sub>. Dessa forma, nossos dados *in vitro* sugerem que o controle da infecção pelos CLN-AnB está associado com ação direta sobre o parasito, corroborando com a já descrita característica da AnB em possuir efeito sobre o parasito em baixas concentrações.

No Brasil, a formulação lipídica de AnB, Ambisome<sup>®</sup> (AnB-L), foi aprovada pelo MS para o tratamento de pacientes com leishmaniose visceral pertencentes a grupos prioritários (BRASIL, 2014). Contudo, apesar de prévios relatos já apontarem eficácia de até 100% da AnB-L no tratamento de LCL (SOLOMON et al., 2013; WORTMANN et al., 2010) e LCM (AMATO et al., 2011; ROCIO et al., 2014; SAMPAIO; MARSDEN, 1997), o alto custo dessa formulação torna sua ampla utilização para tratamento das leishmanioses proibitiva. Nesse sentido, investigamos a eficácia do CLN-AnB na infecção de camundongos BALB/C por *L. braziliensis*, o qual reproduz aspectos da infecção natural, como a presença de uma lesão ulcerada e a disseminação do parasito para os linfonodos drenantes (DE MOURA et al., 2005). Observamos que o tratamento intraperitoneal com CLN-AnB foi mais eficaz na redução do tamanho da lesão, comparado ao tratamento com Sb<sup>5+</sup>, embora ambos os tratamentos com CLN-AnB quanto Sb<sup>5+</sup> reduziram de forma semelhante a carga parasitária e o infiltrado de células inflamatórias em orelhas infectadas. Nesse estudo, o Ambisome<sup>®</sup> não apresentou efeito na redução do tamanho da lesão, bem como na redução da carga parasitária do sítio de infecção. Assim, esses dados sugerem que o CLN-AnB é um candidato promissor para o tratamento da LC.

Apesar da busca por novas formulações de medicamentos empregando fármacos já aprovados para uso clínico, como a anfotericina B, constituir uma estratégia interessante por já partir de uma substância com propriedades físico-químicas e efeitos biológicos conhecidos, a triagem de bioativos a partir de compostos naturais ainda representa a fonte mais tradicional no desenvolvimento e design de medicamentos. Cerca de 65% dos 1.394 medicamentos baseados em pequenas moléculas e aprovados pela FDA e organizações semelhantes, entre os anos de 1981 e 2019, são derivados de produtos naturais ou inspirados neles (DARISIPUDI et al., 2011; NEWMAN et al., 2020). As razões para isso consistem na complexidade e diversidade estrutural das moléculas oriundas da natureza, comparado às moléculas sintetizadas. Além disso, moléculas naturais não existem por acaso na natureza, mas sim desempenhando papéis importantes no ecossistema e/ou nos processos fisiológicos do organismo de origem. Por isso,

geralmente têm alta afinidade de ligação em receptores específicos e sua ação biológica é frequentemente seletiva (ATANASOV et al., 2021; FEHER; SCHMIDT, 2003).

Nesse contexto, é importante ressaltar que o Brasil é detentor de uma das maiores biodiversidades do mundo, possuindo mais de 20% de todas as espécies do planeta, o que o torna uma fonte rica de compostos com atividade biológica (DARISIPUDI et al., 2011). Em função disso, o interesse em explorar a biodiversidade brasileira pela indústria farmacêutica e comunidade científica brasileiras, assim como estrangeiras, é crescente, sobretudo pela vasta utilização de compostos e extratos vegetais pela medicina popular. Assim, vale salientar e valorizar o papel e importância do conhecimento popular ou medicina popular como fonte de conhecimento e inspiração na triagem de bioativos e design de moléculas derivadas em todo o mundo. Cerca de 80% da população mundial faz uso da medicina popular/alternativa, utilizando plantas e compostos naturais para tratar doenças e distúrbios fisiológicos (IQBAL et al., 2017), e foi através dela que surgiram os primeiros estudos sobre os efeitos biológicos da própolis e do Louro de Cheiro, fonte das lignanas iangambina e epi-Iangambina.

A falta de controles de qualidade adequados, rotulagem inadequada e ausência de informações apropriadas ao paciente são sérias limitações para uso clínico e seguro de extratos e preparações naturais (RAYNOR et al., 2011). Além disso, tratando-se de própolis, a alta variabilidade da composição química observada no composto é uma barreira a ser vencida, problemática não observada na utilização de substância isoladas, como a iangambina e epi-iangambina. A composição química da própolis é influenciada por diversos fatores: clima, estação do ano, flora visitada pelas abelhas e localização geográfica, o que influencia diretamente no efeito biológico observado (MENEZES, 2005). Para solucionar essa adversidade, neste trabalho, utilizamos o extrato glicólico de própolis verde ou um gel desse extrato, ambos oriundos de um Extrato de Própolis Padronizado (EPP-AF<sup>®</sup>), produzido e caracterizado pela Apis Flora Ltda, o que o torna sua composição reprodutível lote-a-lote.

Apesar do efeito leishmanicida da própolis já ser bem relatado pela literatura científica, os prováveis mecanismos de ativação celular nesse contexto não são esclarecidos. Aqui, demonstramos por meio de ensaios *in vitro* a habilidade do extrato glicólico de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> em modular a produção de mediadores em diferentes contextos inflamatórios (estímulo por LPS ou IFN- $\gamma$  e na infecção por *L. amazonensis*). Observamos que o tratamento com EPP-AF<sup>®</sup> induz a expressão da enzima antioxidante HO-1, bem como aumenta os níveis

da citocina TNF- $\alpha$ , evento que foi associado em parte à ativação da via ERK 1/2, ao passo que reduz a produção de mediadores inflamatórios, NO, PGE<sub>2</sub> e IL-1 $\beta$ , por células infectadas. Nesse contexto, já foi relatado a associação da ativação da via ERK 1/2 com a indução da expressão de COX-2 e translocação de Nrf2, o que poderia explicar o aumento da expressão de COX-2 e HO-1 observados com o tratamento com o EPP-AF<sup>®</sup> (ELDER et al., 2002; HUANG et al., 2013; HOFFMEYER et al., 1999; RUTAULT et al., 2001; SABIO; DAVIS, 2014).

A capacidade da própolis EPP-AF<sup>®</sup> em modular distintamente a produção e/ou expressão de mediadores e enzimas em macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou apenas estimulados com LPS revela sua habilidade em modular diferentes vias de sinalização celular, por mecanismos não conhecidos. Nesse contexto, ambos os estímulos (por LPS ou infecção por *Leishmania*) podem alterar o perfil da resposta imune inata através modulação de receptores tipo Toll (TLR). O estímulo por LPS leva à produção de diversos mediadores inflamatórios, bem como à formação do inflamassoma, devido a sua ligação ao receptor tipo Toll-4, (PALSSON-MCDERMOTT & O'NEILL, 2004). Por outro lado, evidências sugerem a capacidade de diferentes espécies de *Leishmania* em modular os receptores tipo Toll-1, 2, 4 e 9, por mecanismos pouco conhecidos, levando ao controle parasitário ou ao favorecimento da infecção (BAMIGBOLA & ALI, 2022; LIMA et al., 2017; SILVEIRA et al., 2022). Nesse contexto, Búfalo e colaboradores (2013) mostraram a capacidade da própolis em reduzir a resposta inflamatória induzida por LPS através da inibição de NF $\kappa$ B, enquanto nenhum efeito foi observado na ativação a via ERK 1/2. Em outro estudo, a própolis mostrou-se capaz de reduzir a proliferação de células de câncer de mama através da inibição da sinalização via Toll-4 (CHANG et al., 2017). Ademais, o potencial da própolis EPP-AF<sup>®</sup> em inibir a formação do inflamassoma já foi demonstrado (HORI et al., 2013). Neste estudo, observamos que o tratamento com EPP-AF<sup>®</sup> em células infectadas ou expostas ao LPS reduz os níveis de IL-1 $\beta$ , citocina liberada após ativação do inflamassoma. Entretanto, a influência do tratamento com o EPP-AF<sup>®</sup> sobre os receptores do tipo Toll (TLR) e sua associação com o efeito leishmanicida e imunomodulador não foram avaliadas.

Nos ensaios *in vivo* observamos a eficácia do tratamento tópico com o gel EPP-AF<sup>®</sup> sozinho ou, principalmente, em associação com o antimoniato de meglumina em reduzir o tamanho da lesão de camundongos BALB/c infectados na orelha com *L. amazonensis*, em um modelo de LC altamente inflamatório e crônico. Apesar do tratamento com própolis não

apresentar efeito na carga parasitária, a redução da lesão *per se* nesse modelo experimental é um dado promissor, haja vista que o Ministério da Saúde do Brasil define como critério de cura para a LC a epitelização completa de todas as lesões e o desaparecimento de crosta, descamação, infiltração e eritema, sem mencionar redução de carga parasitária (BRASIL, 2017).

Seguindo a linha de triagem de compostos naturais com potencial leishmanicida, avaliamos a capacidade das lignanas iangambina e epi-iangambina frente à infecção *in vitro* pelos principais agentes etiológicos da Leishmaniose Cutânea no Brasil, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*. Lignanas são compostos polifenólicos oriundos do metabolismo secundário das plantas e envolvidos na proteção contra patógenos e radiação ultravioleta (CARMEN RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2019). São encontradas em diversos vegetais, assim como em alguns tipos de própolis, e vem ganhando interesse devido a propriedades farmacológicas, como anticâncer, antialérgica e analgésica (AGÜERO et al., 2011; TIVERON et al., 2022). A ianganbina é uma lignana considerada biomarcador para a *Ocotea fasciculata*, conhecida como Louro de Cheiro. Apesar de alguns estudos já demonstrarem algumas propriedades farmacológicas para essa lignana, pouco se sabe sobre os efeitos leishmanicida e imunomodulador da iangambina e de seu isômero a epi-iangambina. Levando em consideração a importância do estudo de isômeros para o desenvolvimento de medicamentos seguros e mais eficazes, neste estudo, contribuímos com a literatura científica acerca do efeito desses compostos frente à infecção *in vitro* de macrófagos pelas *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Assim, demonstramos pela primeira vez que o controle da infecção por ambas as espécies de *Leishmania* pelas lignanas não se dá via ativação macrofágica, pelo contrário, ambas as lignanas mostraram-se capazes de reduzir o perfil inflamatório apresentado pelas células infectadas, enquanto reduzem a viabilidade intracelular do parasito.

O controle da progressão da Leishmaniose Cutânea (LC) depende da indução de uma resposta imune do tipo Th1, com produção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$ , que levam à ativação de macrófagos. Os macrófagos ativados induzem a expressão da enzima iNOS que, por sua vez, catalisa a L-arginina em óxido nítrico (NO), um importante microbicida intracelular. Além disso, as células T CD8<sup>+</sup> contribuem no controle do LC por meio da atividade citotóxica e produção de citocinas (como IFN- $\gamma$ ). Por outro lado, a

suscetibilidade a LC está relacionada a uma resposta imune voltada para o tipo Th2 e T reguladoras que se caracteriza pela produção de citocinas anti-inflamatórias (como IL-10, IL-4 e IL-13). As citocinas Th2 induzem a via da arginase I e consequente biossíntese de poliaminas, que contribuem para a proliferação e persistência do parasita (ABDOLI, et al, 2017).

Embora a resposta Th1 contribua para o controle da infecção por *Leishmania*, principalmente por *L. major*, *L. mexicana* ou *Leishmania amazonensis*, assim como Leishmaniose Visceral causada por *L. donovani* ou *L. infantum*, respostas Th1 exacerbada podem levar aos danos teciduais graves observados na LC, principalmente em relação a LC causada por *L. braziliensis* (ABDOLI et al., 2017; BANERJEE et al., 2016; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017; GONZALEZ et al., 2020). As infecções por *L. braziliensis* são caracterizadas pela produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias como IFN $\gamma$ , TNF e IL-6 e apresentam níveis mais baixos de células Foxp3+ (linhagens reguladoras) e IL-10 do que aquelas infectadas por outras espécies de *Leishmania*, como a *L. amazonensis*, por exemplo, espécie que possui a tendência em desviar a resposta imune para o pólo anérgico (GONÇALVES-ALBUQUERQUE, et al, 2017). Assim, compostos que apresentem efeito leishmanicida, sem, contudo, induzir processos inflamatórios intensos, ao passo que estimula processos antioxidantes e/ou anti-inflamatórios que contribuam para um equilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatória, são interessantes na terapêutica da Leishmaniose Cutânea.

Neste estudo, nenhuma via de ativação celular foi associada ao efeito leishmanicida observado pelos CLN-AnB, extrato glicólico de própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> ou às lignanas iangambina e epi-iangambina. Contudo, não podemos descartar a hipótese de efeito direto no parasito pelos quatro compostos avaliados nesta tese. A anfotericina B é conhecida por possuir efeito no parasito em concentrações reduzidas, devido a sua afinidade pelo ergosterol do parasito, cerca de 10 vezes maior que pelo colesterol encontrado em células mamíferas (ODDS et al., 2003). Em estudo anterior, nosso grupo demonstrou a habilidade do extrato glicólico de própolis EPP-AF<sup>®</sup> em reduzir a viabilidade celular de promastigotas de *L. braziliensis*, levando a formas aberrantes do parasito após tratamento. Ainda, observou-se reduzido número de promastigotas recuperadas nos sobrenadantes das culturas celulares tratadas com o EPP-AF<sup>®</sup>, evento acompanhado pela redução da produção dos mediadores pró inflamatórios óxido nítrico, superóxido e TNF- $\alpha$ , e com aumento de IL-10 e TGF- $\beta$  (REBOUCAS-SILVA, et al, 2017). Além disso, Monte Neto e colaboradores (2007) demonstraram que a iangambina foi capaz de

reduzir a viabilidade de promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* em cultura axênica. Em suma, o efeito direto no parasito intracelular pelos compostos supracitados deve ser levado em consideração e necessita ser melhor investigado.

## 10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese investigou novas alternativas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose cutânea, patologia ainda endêmica em países subdesenvolvidos ou emergentes, como o Brasil, e que possui terapias ultrapassadas e pouco acessíveis. Por afetar, principalmente, comunidades em situação de vulnerabilidade econômica e com acesso limitado a unidades de saúde, acreditamos em duas principais estratégias para aumentar o índice terapêutico das leishmanioses: i) a oferta de tratamentos seguros, eficazes e baratos à toda população; e ii) o desenvolvimento de tratamentos de fácil administração, em comparação aos tratamentos parenterais atualmente empregados na terapia dessa doença, os quais obrigam os pacientes à se deslocarem até uma unidade de saúde com maior frequência.

Por ser o composto leishmanicida mais potente disponível na prática clínica, assim como um dos medicamentos mais tóxicos utilizados no tratamento antimicrobiano, a Anfotericina B é uma molécula que ainda desperta interesse na comunidade científica, mesmo após mais de 60 anos de sua descoberta. As formulações lipídicas dessa molécula possibilitaram a ampliação da sua indicação clínica para pacientes com diferentes perfis de saúde. Entretanto, é o seu alto custo que impede sua ampla utilização no tratamento de doenças como as leishmanioses. Nesse contexto, os CLN-AnB emergem como uma alternativa promissora ao Ambisome<sup>®</sup> - formulação lipossomal de Anfotericina B que apresenta altas taxas de eficácia frente a diferentes formas clínicas de leishmaniose, bem como reduzida toxicidade - por se mostrar eficaz nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, possuindo reduzido custo de produção. O reduzido custo produtivo dessa nova formulação somado ao fato de que os CLN-AnB seriam produzidos em território nacional, levaria também a um menor custo aquisitivo, além de fomentar a indústria farmacêutica nacional.

De forma semelhante, o estudo dos compostos naturais própolis verde EPP-AF<sup>®</sup> e das lignanas iangambina e epi-iangambina promove a valorização da biodiversidade brasileira na triagem de compostos e moléculas bioativas. Acreditamos que a importância do estudo desses compostos reside não apenas na possibilidade de desenvolvimento de novos tratamentos mais acessíveis economicamente aos governos e, como consequência, à toda população, mas como também fomentando mais investigações sobre os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito biológico apresentado, abrindo novas possibilidades de desenvolvimento de fármacos alvo-específicos.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLI, A.; MASPI, N.; GHAFARIFAR, F. **Wound healing in cutaneous leishmaniasis: A double edged sword of IL-10 and TGF- $\beta$ . Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** Elsevier Ltd, 1 abr. 2017.
- ALMEIDA, R. P. et al. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 1, p. 79–81, 2005.
- ALOTAIBI, A. et al. European propolis is highly active against trypanosomatids including *Crithidia fasciculata*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.
- AMALIA, E.; DIANTINI, A.; SUBARNAS, A. Water-soluble propolis and bee pollen of *Trigona* spp. From South Sulawesi Indonesia induce apoptosis in the human breast cancer MCF-7 cell line. **Oncology Letters**, v. 20, n. 5, 1 nov. 2020.
- AMATO, V. et al. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, n. 9, p. 1026–1034, 2009.
- AMATO V, AMATO J, NICODEMO A, UIP D, AMATO-NETO V, D. M. [Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isothionate]. **Ann Dermatol Venereol.**, v. 125, n. 8, p. 492–5, 1998.
- AMATO, V. S. et al. Short report: Can we use a lower dose of liposomal amphotericin B for the treatment of mucosal American leishmaniasis? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 5, p. 818–819, 2011.
- AMATO, V. S et al. [Treatment of american cutaneous leishmaniasis, with lesions in the mucosa, using pentamidine isethionate]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 29, n. 5, p. 477–81, 1996.
- ANAISSE, E. J. et al. Treatment of invasive fungal infections in renally impaired patients with amphotericin B colloidal dispersion. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 3, p. 606–11, 1998.
- ANTONIO, A. DA S. et al. Chemophenetic study of *Ocotea canaliculata* (Lauraceae) by UHPLC–HRMS and GNPS. **Natural Product Research**, v. 36, n. 4, p. 984–988, 2022.
- ANTONIO, A. S.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; WIEDEMANN, L. S. M. *Ocotea* complex: A metabolomic analysis of a lauraceae genus. **Phytochemistry**, v. 173, 1 maio 2020.
- ARANDA-SOUZA, M. Â. et al. In vitro effect of *Bothrops leucurus* lectin (BLL) against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* infection. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 431–439, 1 dez. 2018.
- ARAÚJO, I. G. A. et al. Calcium influx inhibition is involved in the hypotensive and vasorelaxant effects induced by yangambin. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6863–6876, 2014.

ARAÚJO, C. V. et al. Protective effects of yangambin on cardiovascular hyporeactivity to catecholamines in rats with endotoxin-induced shock. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 363, n. 3, p. 267–275, 2001.

ARAÚJO-SANTOS, T. et al. Prostaglandin E2/Leukotriene B4 balance induced by *Lutzomyia longipalpis* saliva favors *Leishmania infantum* infection. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, 2014.

ARNING, M.; KLICHE, K.; WEHMEIER, A. Infusion-related toxicity of three different amphotericin B formulations and its relation to cytokine plasma levels. **MYCOSES**, v. 465, p. 459–465, 1995.

ATANASOV, A. G. et al. **Natural products in drug discovery: advances and opportunities.** **Nature Reviews Drug Discovery** Nature Research, 1 mar. 2021.

BALA, M. et al. Validation of ethnomedicinal potential of *Tinospora cordifolia* for anticancer and immunomodulatory activities and quantification of bioactive molecules by HPTLC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 131–137, 4 dez. 2015.

BANERJEE, A. et al. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 37–41, 1 nov. 2016.

BARRAL-NETTO, M. et al. **Human-Leishmaniasis@cytokines.bahia.br** Cytokines in human leishmaniasis **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. [s.l: s.n.].

BARUD, H. D. S. et al. Antimicrobial Brazilian Propolis (EPP-AF) Containing Biocellulose Membranes as Promising Biomaterial for Skin Wound Healing. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2013, p. 703024, 2013.

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

BATISTA, R.; DE JESUS SILVA JÚNIOR, A.; DE OLIVEIRA, A. B. **Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicines. part II. non-alkaloidal natural products.** *Molecules*, ago. 2009.

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

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

BERRETTA, A. A. et al. Propolis standardized extract (EPP-AF®), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 1987, p. 512–521, 2012.

BERRETTA, A. A. et al. Evaluation of mucoadhesive gels with propolis (EPP-AF) in preclinical treatment of candidiasis vulvovaginal infection. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

BEZERRA, C. R. F. et al. Highly efficient antibiofilm and antifungal activity of green propolis against *Candida* species in dentistry materials. **PLoS ONE**, v. 15, n. 12 December, 1 dez..

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

BOGGIATTO, P. M. et al. Altered dendritic cell phenotype in response to *Leishmania amazonensis* amastigote infection is mediated by MAP kinase, ERK. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 5, p. 1818–1826, 2009.

BOGGIATTO, P. M. et al. Targeted extracellular signal-regulated kinase activation mediated by *Leishmania amazonensis* requires MP1 scaffold. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 4, p. 328–336, 2014.

BOUDOUROVA-KRASTEVA, G. et al. **Phenolics from brazilian propolis**. *naturforsch.* [s.l]: s.n.].

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Tegumentar (LT)**: português (Brasil). 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-tegumentar/leishmaniose-tegumentar>>. Acesso em: 28 maio. 2022.

\_\_\_\_\_. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2.ed. ed. Brasília: [s.n.].

\_\_\_\_\_. **Erratas manual 2014.**, 2014.

\_\_\_\_\_. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. [s.l]: [s.n.], [s.d].

\_\_\_\_\_. **Leishmaniose visceral**: recomendações clínicas para redução da letalidade. Brasília: [s.n.].

BRASIL. SECRETARIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Preços máximos de medicamentos por princípio ativo, para compras públicas preço fábrica (pf) e preço máximo de venda ao governo (PMVG)**. [Brasília?]: ANVISA, [s.d.]. Disponível em: <[https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/cmed/precos/arquivos/lista\\_conformidade\\_gov\\_2021\\_07\\_v1.pdf](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/cmed/precos/arquivos/lista_conformidade_gov_2021_07_v1.pdf)>.

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

BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SERHAN, C. N. **Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation**. *Immunity* Cell Press, 20 mar. 2014.

BUENO-SILVA, B. et al. Brazilian red propolis attenuates inflammatory signaling cascade in lipsoactivated macrophages. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2015.

CAMACHO, M. et al. Modification of prostanoid secretion in endothelial cells by amphotericin B acting synergistically with interleukin-1beta: possible explanation of proinflammatory effects. **The Journal of infectious diseases**, v. 190, n. 5, p. 1026–32, 2004.

CARVALHO, A. M.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Protection and Pathology in Leishmania braziliensis Infection. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 466, 14 abr. 2022.

CASTRO-FARIA-NETO, H. C. et al. Yangambin: A new naturally-occurring platelet-activating factor receptor antagonist: In vivo pharmacological studies. **Planta Medica**, v. 61, n. 2, p. 106–112, 1995.

CATANEO, A. H. D. et al. Quercetin promotes antipromastigote effect by increasing the ROS production and anti-amastigote by upregulating Nrf2/HO-1 expression, affecting iron availability. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 113, 1 maio 2019.

CAVALCANTE, G. M. et al. Leishmanicidal Activity of Propolis Collected in the Semi-arid Region of Brazil. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 1 jul. 2021.

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

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. et al. Review Article New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, n. 3, p. 235–242, 2015.

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

COHEN, B. E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, n. 1–2, p. 95–106, 1998.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; LEITE-SILVA, J.; MORGADO, F. N. **The binomial parasite-host immunity in the healing process and in reactivation of human Tegumentary leishmaniasis.** **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., 19 jun. 2018.

CONTE, F. L. et al. Propolis increases Foxp3 expression and lymphocyte proliferation in HIV-infected people: A randomized, double blind, parallel-group,

and placebo-controlled study. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 142, 1 out. 2021.

CORREIA, D. et al. Estudo comparativo entre antimoniató de meglumina, isotianato de pentamidina e sulfato de aminosidina, no tratamento de lesões cutâneas primárias causadas por Leishmania (Viannia) braziliensis TT - Comparative study between meglumine antimoniató, pentami. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 29, n. 5, p. 447–453, 1996.

COUTINHO, D. F. et al. **Morphoanatomical study of the leaves of Ocotea duckei Vattimo (Lauraceae-Lauroideae)** **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. [s.l: s.n.].

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

DA SILVA, M. F. L.; FLOETER-WINTER, L. M. Arginase in Leishmania. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 74, p. 103–117, 2014.

DA SILVA, S. S. et al. Leishmanicidal activity of brazilian propolis hydroalcoholic extract in Leishmania. v. 36, n. 2, p. 25–34, 2015.

DA SILVA, S. S. et al. Propolis reduces Leishmania amazonensis-induced inflammation in the liver of BALB/c mice. **Parasitology Research**, v. 115, n. 4, p. 1557–1566, 1 abr. 2016.

DARISIPUDI, M. N.; ALLAM, R.; RUPANAGUDI, K. V. Polyene Macrolide Antifungal Drugs Trigger Interleukin- 1 b Secretion by Activating the NLRP3 Inflammasome. v. 6, n. 5, p. 1–6, 2011.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis - Chemical composition and botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435–441, dez. 2008.

DE ARAÚJO, C. F. et al. Leishmania braziliensis and Leishmania amazonensis amastigote extracts differ in their enhancement effect on Leishmania infection when injected intradermally. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, 1 fev. 2014.

DE MOURA, T. R. et al. Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania braziliensis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5827–5834, 2005.

DE OLIVEIRA & BARRAL-NETO, 2005. [s.d.].

DE SOUZA SILVA, T. et al. Green and Red Brazilian Propolis: Antimicrobial Potential and Anti-Virulence against ATCC and Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria. **Chemistry and Biodiversity**, v. 18, n. 8, 1 ago. 2021.

DEVEQUI-NUNES, D. et al. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, 1 dez. 2018.

DINIZ, D. P. et al. Antioxidant Effect of Standardized Extract of Propolis (EPP-AF®) in Healthy Volunteers: A “before and After” Clinical Study. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, 2020.

DNDI. **Leishmanioses | DNDi América Latina**. Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/>>. Acesso em: 28 maio. 2022.

DONOVICK R, GOLD W, PAGANO JF, S. HA. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. **Antibiot Annu.**, v. 3, p. 579–86, [s.d.].

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

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

DOS SANTOS THOMAZELLI, A. P. F. et al. Brazilian propolis promotes immunomodulation on human cells from American Tegumentar Leishmaniasis patients and healthy donors infected with *L. braziliensis*. **Cellular Immunology**, v. 311, p. 22–27, 1 jan. 2017.

ELNAKADY, Y. A. et al. Characteristics, chemical compositions and biological activities of propolis from Al-Bahah, Saudi Arabia. **Scientific Reports**, v. 7, 6 fev. 2017.

**Epiyangambin | C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub> - PubChem**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Epiyangambin#section=Structures>>. Acesso em: 19 ago. 2022.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. AMPHOTERICIN B: A review on different formulations, side effects, and toxicity. **Clin Biomed Res**, v. 35, n. 2, p. 65–82, 2015.

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

FARIA, D. R. et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 7853–7859, dez. 2005.

FEHER, M.; SCHMIDT, J. M. Property distributions: Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, n. 1, p. 218–227, jan. 2003.

FERREIRA, J. M. et al. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 11, p. 3552–3558, 30 ago. 2017.

FLORA DO BRASIL. 2020.

FRANÇA-COSTA, J. et al. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E<sub>2</sub> pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 3, p. 426–435, 1 fev. 2015.

FREITAS-JUNIOR, L. H. et al. **Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?** **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, dez. 2012.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 2009.

FRÉZARD, F.; MONTE-NETO, R.; REIS, P. G. Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 119–132, 2014.

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

GARCIA, A. R. et al. Identification of Chalcone Derivatives as Inhibitors of *Leishmania infantum* Arginase and Promising Antileishmanial Agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 14 jan. 2021.

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

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

GIGLIOTTI F, SHENEP JL, LOTT L, T. D. Induction of prostaglandin synthesis as the mechanism responsible for the chills and fever produced by infusing amphotericin B. **Send to J Infect Dis.**, v. 156, n. 5, p. 784–9, 1987.

GILARDONI, G. et al. Chemical and enantioselective analysis of the essential oils from different morphological structures of *ocotea quixos* (Lam.) kosterm. **Plants**, v. 10, n. 10, 1 out. 2021.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. DA C. et al. **The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis.** **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., 30 out. 2017.

GONTIJO, D. C. et al. Identification of phenolic compounds and biologically related activities from *Ocotea odorifera* aqueous extract leaves. **Food Chemistry**, v. 230, p. 618–626, 1 set. 2017.

GONZALEZ, K. et al. Involvement of the Inflammasome and Th17 Cells in Skin Lesions of Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, 2020.

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

GÜLER, H. İ. et al. Targeting cov-2 spike rbd and ace-2 interaction with flavonoids of anatolian propolis by in silico and in vitro studies in terms of possible covid-19 therapeutics. **Turkish Journal of Biology**, v. 45, n. Special Issue 1, p. 530–548, 2021.

GUO, Y. et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, 15 jan. 2020.

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

HAUSOTT, B.; GREGER, H.; MARIAN, B. Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 129, n. 10, p. 569–576, out. 2003.

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

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

HORI, J. I. et al. The inhibition of inflammasome by Brazilian propolis (EPP-AF). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 418508, 2013.

HOSNY, K. M. et al. Development, optimization, and evaluation of a nanostructured lipid carrier of sesame oil loaded with miconazole for the treatment of oral candidiasis. **Drug Delivery**, v. 29, n. 1, p. 254–262, 2022.

INDRAYANTO, G.; PUTRA, G. S.; SUHUD, F. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. In: **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2021. v. 46p. 273–307.

IQBAL, J. et al. **Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach**. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** Hainan Medical University, , 1 dez. 2017.

JENNING, V.; THÜNEMANN, A. F.; GOHLA, S. H. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, n. 2, p. 167–177, 2000.

jesus-morais2000. [s.d.].

JOHN K. S. CHIA EDWARD J. MCMANUS. In Vitro Tumor Necrosis Factor Induction Assay for Analysis of Febrile Toxicity Associated with Amphotericin B Preparations. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 34, n. 5, p. 906–908, 1990.

KABAKOV, A. E.; GABAI, V. L. Cell death and survival assays. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2018. v. 1709p. 107–127.

KALIL, M. A. et al. Brazilian Green Propolis as a Therapeutic Agent for the Post-surgical Treatment of Caseous Lymphadenitis in Sheep. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, 26 nov. 2019.

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

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

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

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

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

KRAUSE G, K. A. Topical treatment of American methylbenzethonium chloride: cutaneous leishmaniasis with paramomycin and a clinical study under field conditions in Ecuador. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 0, p. 92–94, 1994.

KUROKAWA, M. et al. Efficacy of Brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of antiherpetic efficacies. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

LEES, P. et al. Pharmacology, safety, efficacy, and clinical uses of the COX-2 inhibitor robenacoxib. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 22 abr. 2022.

LEMKE, M. A. Amphotericin B. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 68, p. 151–162, 2005.

LESSA, M. M. et al. **Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. Summary**BRAZILIAN JOURNAL OF OTORHINOLARYNGOLOGY. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.rborl.org.br/>>.

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

LI, Y. et al. **Chemical structures of lignans and neolignans isolated from Lauraceae. Molecules**MDPI AG, 30 nov. 2018.

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

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

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

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

LONARDONI, M. V. C. et al. **mouse macrophages by prostaglandins and platelet activating factor**Research Paper **Mediators of Inflammation**. [s.l: s.n.].

LUZ, N. F. et al. Heme Oxygenase-1 Promotes the Persistence of Leishmania chagasi Infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 9, p. 4460–4467, 1 maio 2012.

MACHADO, G. U.; PRATES, F. V.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: Clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94, n. 1, p. 9–16, 1 jan. 2019.

- MACHADO, J. L. et al. Brazilian green propolis: Anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.
- MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by leishmania braziliensis in Brazil: A randomized and controlled trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. 1–6, 2010.
- MACHADO, P. R. et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: In situ and systemic immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 438–444, ago. 2011.
- MALTA-SANTOS, H. et al. Resolvin D1 drives establishment of Leishmania amazonensis infection. **Scientific Reports**, v. 7, 10 abr. 2017.
- MALTA-SANTOS, H. et al. Differential expression of polyamine biosynthetic pathways in skin lesions and in plasma reveals distinct profiles in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.
- MANN, S. et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. [s.d.].
- MAQUIAVELI, C. DO C. et al. Antileishmanial activity of verbascoside: Selective arginase inhibition of intracellular amastigotes of Leishmania (Leishmania) amazonensis with resistance induced by LPS plus IFN- $\gamma$ . **Biochemical Pharmacology**, v. 127, p. 28–33, 1 mar. 2017.
- MARQUELE-OLIVEIRA, F. et al. Development, characterization and pre-clinical trials of an innovative wound healing dressing based on propolis (EPP-AF®)-containing self-microemulsifying formulation incorporated in biocellulose membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 570–578, 1 set. 2019.
- MARTINS, J. et al. Yangambin and Epi-yangambin Isomers: New Purification Method from Ocotea fasciculata and First Cytotoxic Aspects Focusing on in Vivo Safety. **Planta Medica**, v. 86, n. 6, p. 415–424, 1 abr. 2020.
- MATSUMORI, N. et al. Direct interaction between amphotericin B and ergosterol in lipid bilayers as revealed by 2H NMR spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 33, p. 11855–11860, 2009.
- MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Inst. Biol.** [s.l: s.n.].
- MESA-ARANGO, A. C. et al. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6627–6638, 2014.
- MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1–10, 2012.

MIRANDA-SAPLA, M. M. et al. trans-Chalcone modulates *Leishmania amazonensis* infection in vitro by Nrf2 overexpression affecting iron availability. **European Journal of Pharmacology**, v. 853, p. 275–288, 15 jun. 2019.

MOHAMED, A. H. et al. Effect of bee venom or propolis on molecular and parasitological aspects of *Schistosoma mansoni* infected mice. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 2, p. 390–400, 1 jun. 2016.

MOHAMED, W. A. S. et al. GC-MS Evaluation, Antioxidant Content, and Cytotoxic Activity of Propolis Extract from Peninsular Malaysian Stingless Bees, *Tetrigona Apicalis*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, 2020.

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

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

MONTEIRO, L. M. et al. Oral administration of buparvaquone nanostructured lipid carrier enables in vivo activity against *Leishmania infantum*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 169, 1 fev. 2022.

MORAES; SILVEIRA. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 1994.

MORAES, Pedro Luís Rodrigues de. **Sinopse das lauráceas nos estados de goiás e Tocantins, Brasil**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br>>.

MOREIRA, A. DE M. et al. Aspectos fundamentais da leishmaniose cutânea no BRASIL. In: **Ações de Saúde e Geração de Conhecimento nas Ciências Médicas 3**. [s.l.] Atena Editora, 2020. p. 69–79.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. SUPPL., p. 131–155, 2002.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Yangambin**. PubChem, [2022?]. Disponível em:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Yangambin#section=Structures>>. Acesso em: 19 ago. 2022a.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Epiyangambin**.

PubChem, [2022?]. Disponível em:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Epiyangambin#section=Structures>>. Acesso em: 19 ago. 2022b.

NETO, R. L. M. et al. **Crude Ethanolic Extract, Lignoid Fraction and Yangambin from *Ocotea duckei* (Lauraceae) Show Antileishmanial Activity**. *Naturforsch.* [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.znaturforsch.com>>.

NETO, R. L. M. et al. **Yangambin Cytotoxicity: A Pharmacologically Active Lignan Obtained from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae)**. *Naturforsch.* [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.znaturforsch.com>>.

NETO, R. L. M. et al. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 215–221, jan. 2011.

NEVES, L. O. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092–1101, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019**. *Journal of Natural Products*American Chemical Society, 27 mar. 2020.

NILFOROUSHZADEH, M. et al. **Comparison of *Thymus vulgaris* (Thyme), *Achillea millefolium* (Yarrow) and propolis hydroalcoholic extracts versus systemic glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis in.** [s.l: s.n.].

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

ODA, J. M. M. et al. Ação do extrato de própolis nas Leishmaniose. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 111–121, 30 jul. 2011.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: Mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, 2003.

OTTERBEIN, L. E. et al. **Heme oxygenase 1: Unleashing the protective properties of heme**. **Trends in Immunology**Elsevier Ltd., 1 ago. 2003.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Plan of action to strengthen the surveillance and control of leishmaniasis in the Americas 2017-2022**. PAHO/WHO, 2017. Disponível em: <<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34147/PlanactionLeish20172022-eng.pdf?sequence=5&isAllowed=y>>.

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

PALMEIRO, M. R. et al. Comparative study of the in situ immune response in oral and nasal mucosal leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 1, p. 23–31, jan. 2012.

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

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502–2506, 24 abr. 2002.

PENHA. Antônia Rosângela Soares. **Estudo da potencialidade da lignana iangambina e da quitosana no tratamento da leishmaniose experimental em camundongos suíços**. [s.l.: s.n.].

PEREIRA et al. **Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras**quim. nova. [s.l.: s.n.].

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

PONTIN, K., et al. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitol Res**, v. 103, n. 3, p. 487–92, 2008.

PRÄBST, K. et al. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2017. v. 1601p. 1–17.

PRATES, D. B. et al. New insights on the inflammatory role of Lutzomyia longipalpis saliva in leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 11, 2012.

RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y. P. P. **Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs**. **Drug Discovery Today**Elsevier Ltd, 1 ago. 2015.

RAMOS, P. I. P. et al. Selective Suppression of Cellular Immunity and Increased Cytotoxicity in Skin Lesions of Disseminated Leishmaniasis Uncovered by Transcriptome-Wide Analysis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n. 10, p. 2542- 2546.e5, 1 out. 2021.

RAYNOR, D. K. et al. Buyer beware? Does the information provided with herbal products available over the counter enable safe use? **BMC Medicine**, v. 9, 9 ago. 2011.

REBOUÇAS-SILVA, J. et al. Parasite Killing of Leishmania (V) braziliensis by Standardized Propolis Extracts. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

REFAAT, H. et al. Optimization and evaluation of propolis liposomes as a promising therapeutic approach for COVID-19. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, 5 jan. 2021.

REGUEIRA-NETO, M. DA S. et al. Antitrypanosomal, antileishmanial and cytotoxic activities of Brazilian red propolis and plant resin of Dalbergia ecastaphyllum (L) Taub. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, p. 215–221, 1 set. 2018.

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

RIBEIRO, R. et al. Protective effects of Yangambin - A naturally occurring platelet-activating factor (PAF) receptor antagonist - On anaphylactic shock in rats. **Phytomedicine**, v. 3, n. 3, p. 249–256, 1996.

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

RODRIGUES, F. M. D. et al. Expression of Foxp3, TGF- $\beta$  and IL-10 in American cutaneous leishmaniasis lesions. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, n. 2, p. 163–171, mar. 2014.

RODRIGUES, L. S. et al. Multifunctional, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ -secreting CD4 and CD8 T cells and CD8<sup>High</sup> T cells are associated with the cure of human visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 28 out. 2021.

RODRIGUEZ, A. E. et al. Leishmania. In: **Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets**. [s.l.] Springer International Publishing, 2018. p. 289–311.

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

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

ROMERO, G. A. S. et al. Tratamento da leishmaniose mucosa com sulfato de aminosidine: resultados de dois anos de acompanhamento\rMucosal leishmaniasis treatment with aminosidine sulfate: results of two year follow-up. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 6, p. 511–516, 1998.

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

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

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

SAMPAIO, R. N. R. et al. Successful treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n. 5, p. 602–604, 1 set. 2021.

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

SANDOVAL PACHECO, C. M. et al. Macrophage Polarization in the Skin Lesion Caused by Neotropical Species of *Leishmania* sp. **Journal of Immunology Research**, v. 2021, 2021.

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

SANTOS, L. M. et al. **Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting**. **Journal of the Science of Food and Agriculture** John Wiley and Sons Ltd, , 15 mar. 2020.

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

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

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

SERRA1, M. F. et al. **Anti-Allergic Properties of the Natural PAF Antagonist Yangambin**. [s.l: s.n.].

SESAB. **Boletim Epidemiológico Leishmaniose Tegumentar no Estado da Bahia**. [s.l: s.n.].

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

SHYAM SUNDAR, T.K. et al. Oral miltefosine for indian visceral leishmaniasis s. **Medicine**, v. 342, n. 22, p. 1462–1471, 2002.

SILVA, M. P. et al. Brazilian red propolis exhibits antiparasitic properties in vitro and reduces worm burden and egg production in an mouse model harboring either early or chronic *Schistosoma mansoni* infection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, 10 jan. 2021.

SILVA, R. C. M. C. et al. **Heme oxygenase-1 in protozoan infections: A tale of resistance and disease tolerance**. **PLoS Pathogens** Public Library of Science, 1 jul. 2020.

SILVEIRA, F. T. et al. **Immunopathogenic competences of Leishmania (V.) braziliensis and L. (L.) amazonensis in American cutaneous leishmaniasis.** *Parasite Immunology*, ago. 2009.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. **Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil-A Review** *Mem Inst Oswaldo Cruz*. [s.l: s.n.].

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 3, p. 239–51, 2004b.

SILVEIRA, M. A. D. et al. Efficacy of Brazilian green propolis (EPP-AF®) as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: A randomized, controlled clinical trial. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 138, 1 jun. 2021.

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

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

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 5, p. 485–497, 2012.

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

SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *Journal of Infectious Diseases*, v. 154, n. 1, p. 76–83, 1986.

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

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

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

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

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

SUNDAR, S. (BANARAS H. U.; CHAKRAVARTY, J. (BANARAS H. U. An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis Shyam. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237–252, 2015.

SUNDAR, SHYAMGARWAL, D.; RAI, M.; MURRAY, H. W. Single-Dose Liposomal Amphotericin B for Visceral Leishmaniasis in India Shyam. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 2, p. 504–512, 2010.

SUREK, M. et al. Chemical composition, cytotoxicity, and antibacterial activity of propolis from Africanized honeybees and three different Meliponini species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, 6 abr. 2021.

TADINI MC, et al. Assessments of nanostructured lipid carriers loaded with amphotericin b: a proposal for increased stability and safety for infectious diseases. **J Pharm Biomed Anal**, v. 145, p. 576–585, 2017.

TARAGHIAN, M. et al. **The Comparison of the IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 Cytokines in Healing and Non-Healing Cutaneous Leishmaniasis**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>>.

TEIXEIRA, M. J. et al. **Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis**. **Trends in Parasitology**, jan. 2006.

The Plant List. 2013.

TIBIRICA, E. V. et al. Antagonistic effect of yangambin on platelet-activating factor (PAF)-induced cardiovascular collapse. **Phytomedicine**, v. 2, n. 3, p. 235–242, 1996.

TITUS RG, MARCHAND M, BOON T, L. JA. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol**, v. 7, n. 5, p. 545–55, 1985.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Caryocar coriaceum extracts exert leishmanicidal effect acting in promastigote forms by apoptosis-like mechanism and intracellular amastigotes by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron depletion: Leishmanicidal effect of Caryocar coriaceum leaf extracts. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 98, p. 662–672, 1 fev. 2018.

TOUZANI, S. et al. In Vitro Evaluation of the Potential Use of Propolis as a Multitarget Therapeutic Product: Physicochemical Properties, Chemical Composition, and Immunomodulatory, Antibacterial, and Anticancer Properties. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

ULIANA, S. R. B.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, p. 1–17, 2017.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenase 1 AND 2 **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)>.

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

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

VENTURIN, G. L. et al. Regulatory effect of PGE2 on microbicidal activity and inflammatory cytokines in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 6, 1 jun. 2020.

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

WANESS, A.; AL DAWASARI, G.; AL JAHDALI, H. The Rise of an opportunistic infection called “Invasive zygomycosis.” **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 131, 2009.

WEZGOWIEC, J. et al. Polish propolis-Chemical composition and biological effects in tongue cancer cells and macrophages. **Molecules**, v. 25, n. 10, 1 maio 2020.

WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 28 maio. 2022.

WHO. **Leishmaniasis**.

WHO/PAHO. **Leishmaniasis**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniasis**. Geneva: [s.n.].

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

WOŹNIAK, M. et al. Effect of the Solvent on Propolis Phenolic Profile and its Antifungal, Antioxidant, and in Vitro Cytoprotective Activity in Human Erythrocytes under Oxidative Stress. **Molecules**, v. 25, n. 18, 1 set. 2020.

YANG, G.; CHOI, G.; NO, J. H. Antileishmanial Mechanism of Diamidines Involves Targeting Kinetoplasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6828–6836, 2016.

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

YANG, Z.; MOSSER, D. M.; ZHANG, X. **Activation of the MAPK, ERK, following Leishmania amazonensis Infection of Macrophages 1**. [s.l: s.n.].

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

ZHANG, Y. et al. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 561–80, 2006.

ZUCCA, M.; SCUTERA, S.; SAVOIA, D. New Chemotherapeutic Strategies Against Malaria, Leishmaniasis and Trypanosomiases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 502–526, 2013.

**Anexo A** - Artigo publicado anteriormente a tese, mas relacionado ao tema

## Research Article

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Academic Editor: Salvatore Chirumbolo

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

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

## 1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

## 2. Methodology

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

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

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

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

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

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

#### 2.4. Biological Assay

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TABLE 1: Chemical characterization of propolis samples.

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

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

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

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

### 3. Results

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

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

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

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

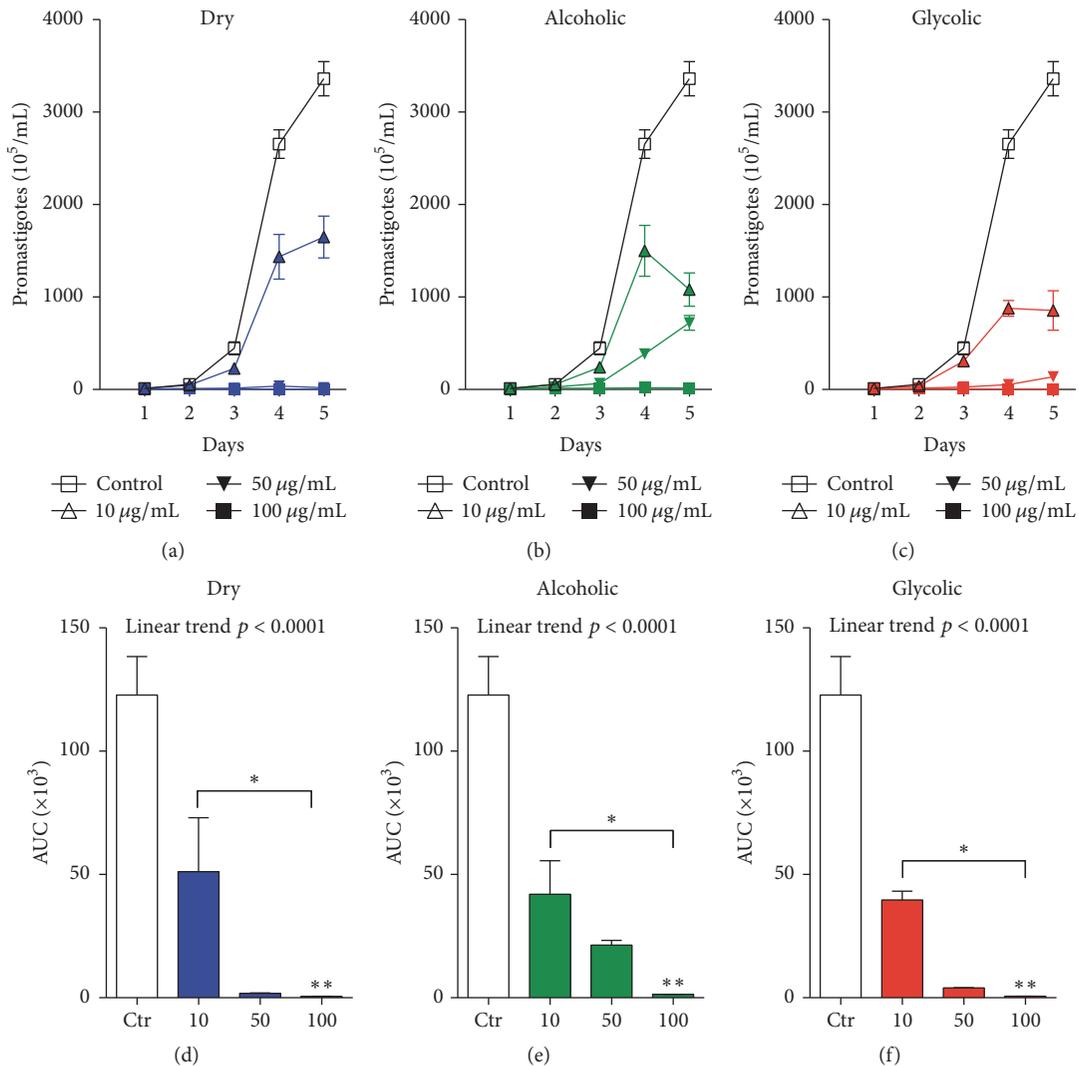


FIGURE 1: Dose-response effect of propolis extract on *L. (V. braziliensis)* promastigote viability. Parasites were incubated for 96 h with 10, 50, or 100 µg/mL of either (a and d) dry, (b and e) alcoholic, or (c and f) glycolic propolis extract. Bars represent means  $\pm$  SD of two representative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

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

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

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

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

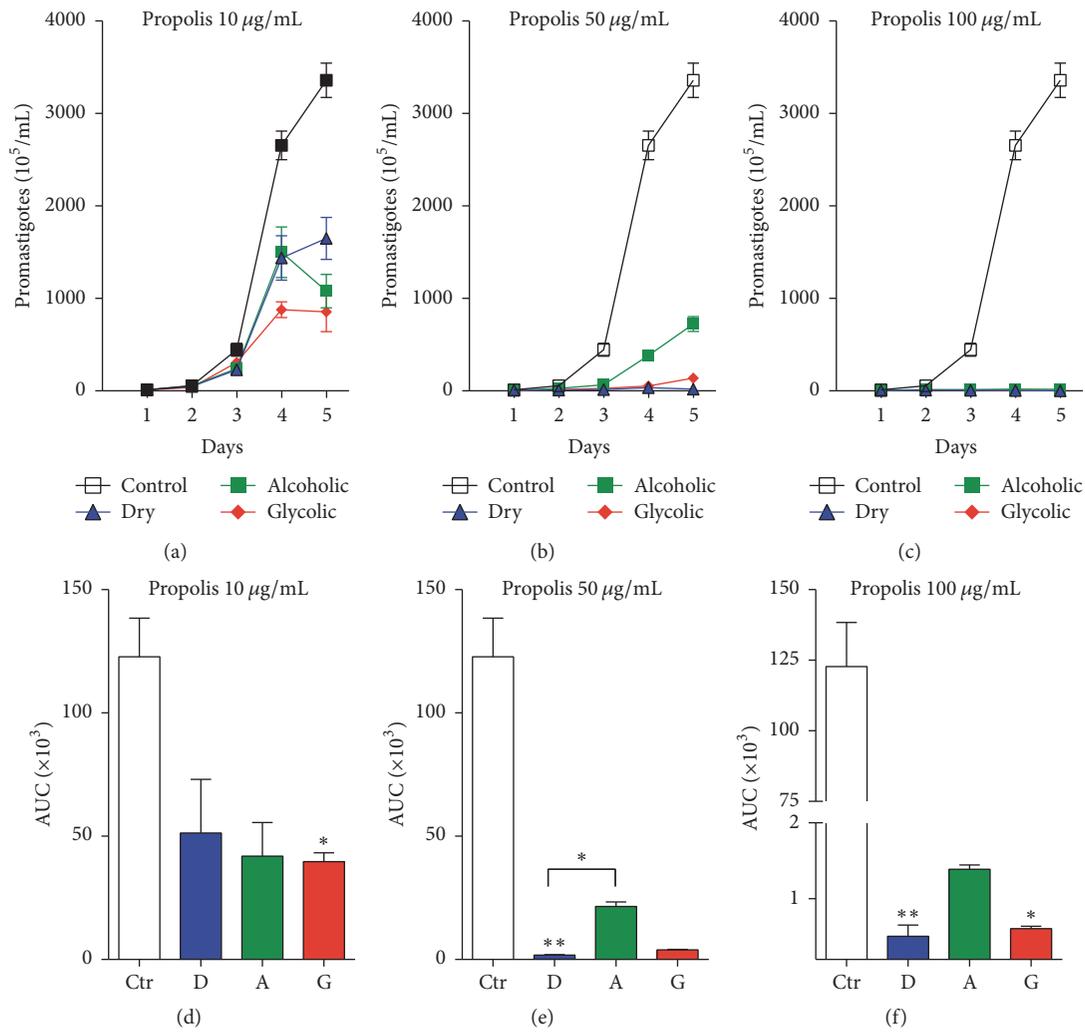


FIGURE 2: Viability of *L. (V) braziliensis* promastigotes in response to each type of propolis extract. Parasites were incubated for 96 h with dry, alcoholic, and glycolic propolis extract at (a and d) 10  $\mu\text{g/mL}$ , (b and e) 50  $\mu\text{g/mL}$ , or (c and f) 100  $\mu\text{g/mL}$ . Bars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

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

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

## 4. Discussion

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

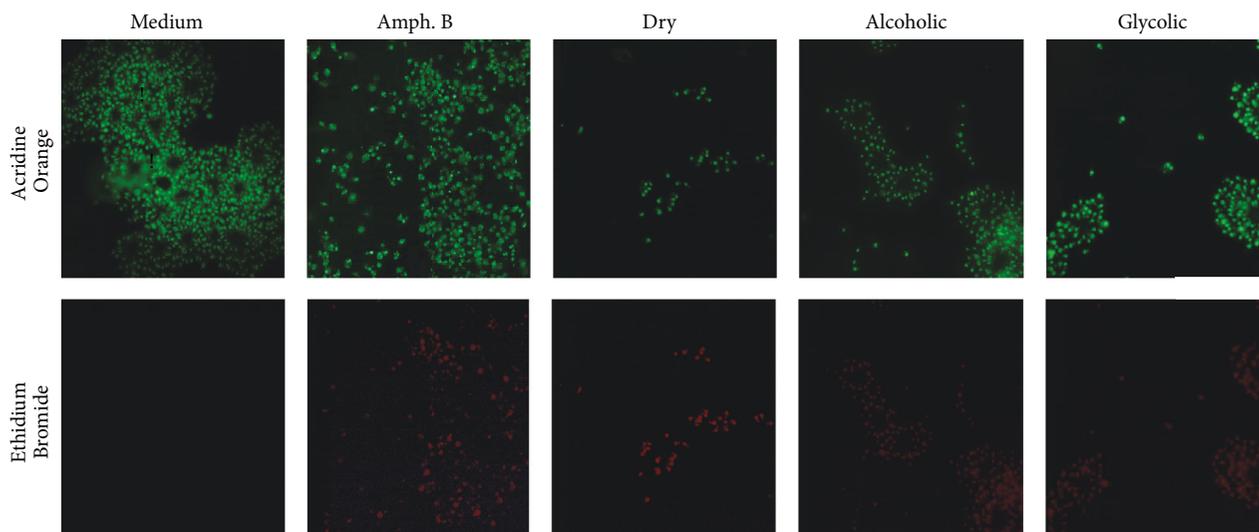


FIGURE 3: *L. (V) braziliensis* promastigote viability assessed by fluorescence microscopy. Live cells were stained with Acridine Orange (green color) and dying cells with Ethidium Bromide (red color). *L. braziliensis* promastigotes were treated with medium alone or with dry, alcoholic, or glycolic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

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

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

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

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

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

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

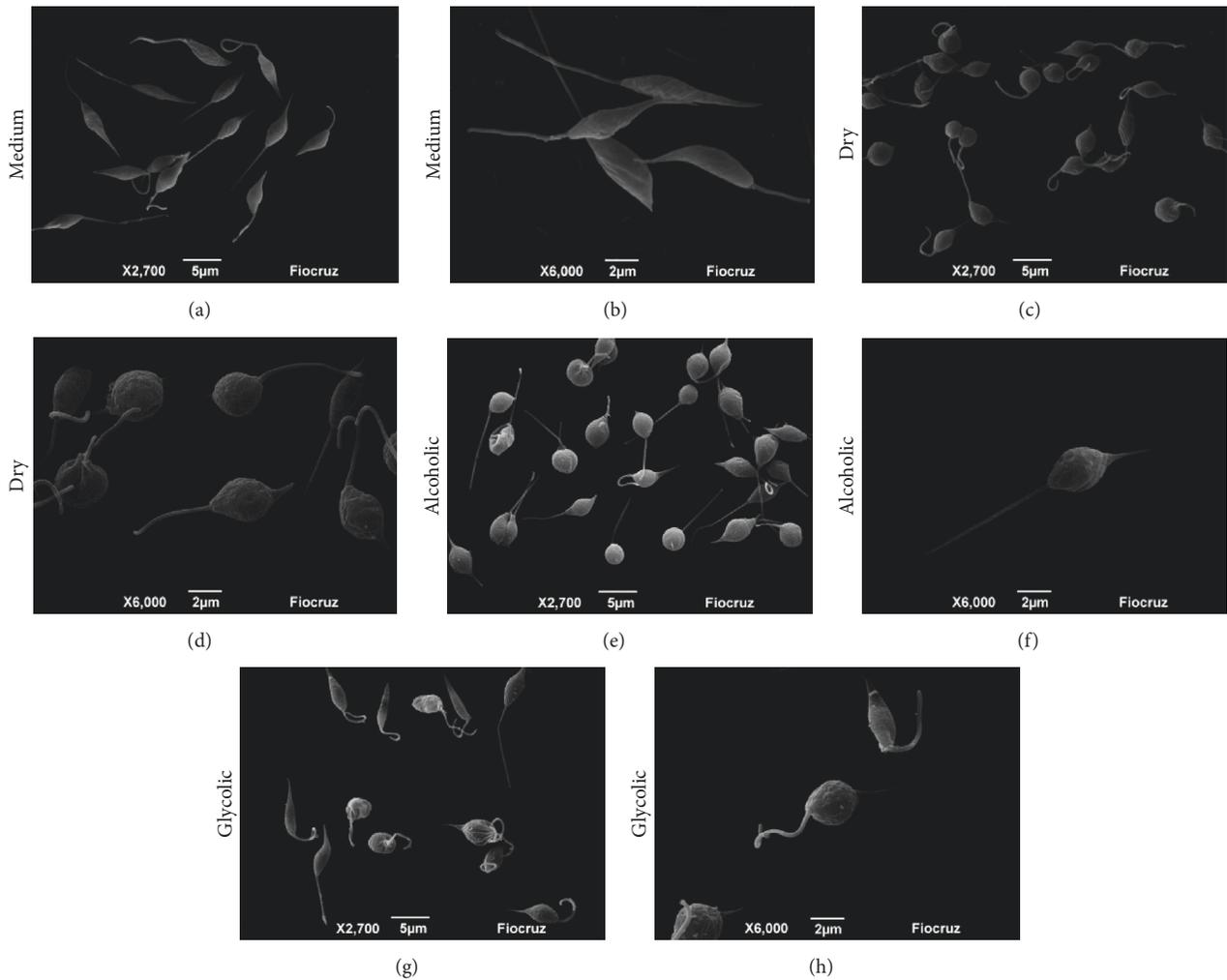


FIGURE 4: Scanning electron microscopy of morphological changes in *L. (V) braziliensis* promastigotes. Parasites were treated with either medium alone or dry, alcoholic, or glycolic extracts of propolis (50 µg/mL) for 96 h. Image amplifications show scale bar representative of 5 µm or 2 µm.

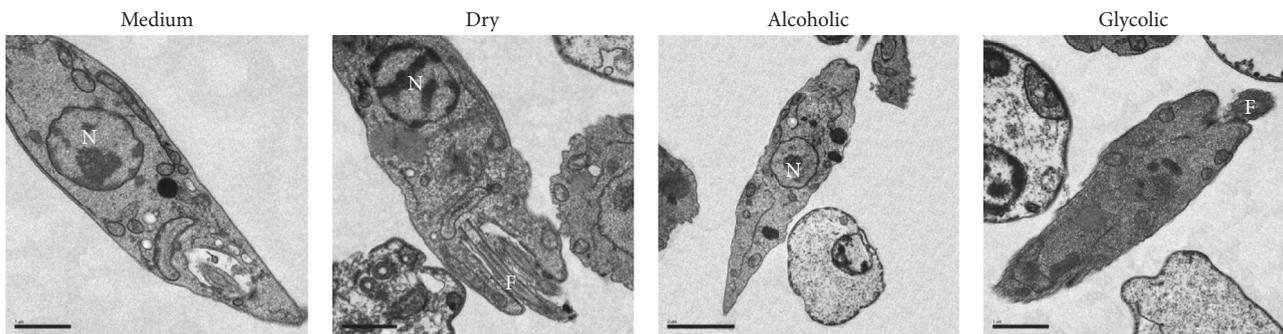


FIGURE 5: Transmission electron microscopy of ultrastructural changes and cell death in *L. (V) braziliensis* promastigotes. Parasites were treated with either medium alone or dry, alcoholic, or glycolic extracts of propolis (50 µg/mL) for 96 h. Nucleus (N). Flagellum (F). Scale bars represent 1 µm.

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

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

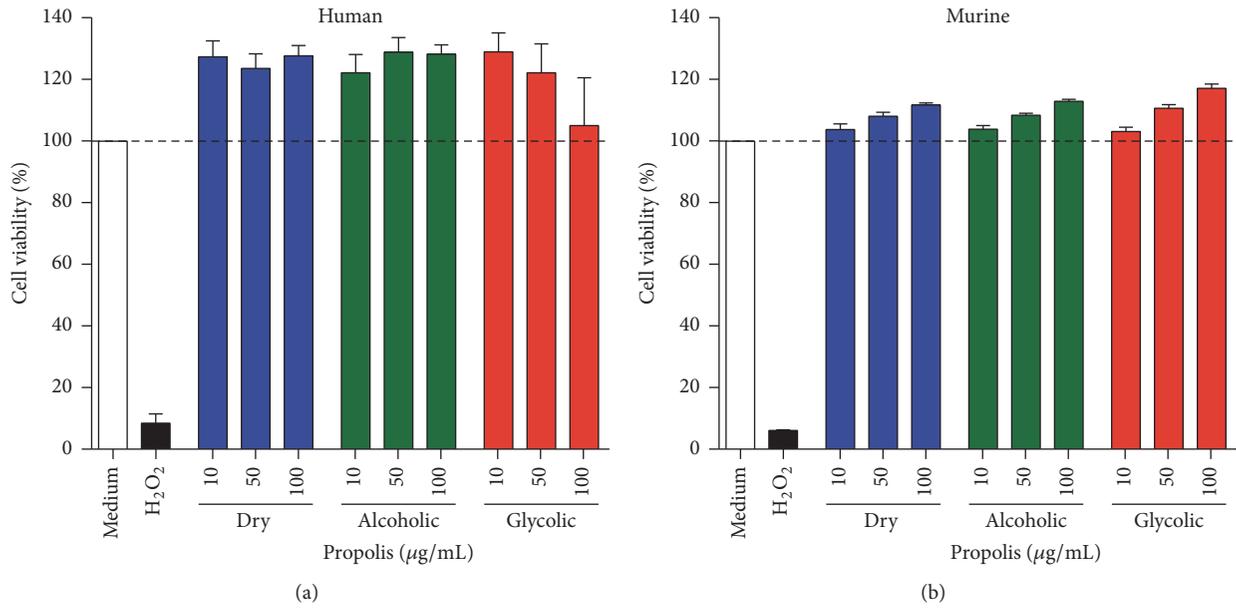


FIGURE 6: Cell cytotoxicity assessment by Alamar Blue. Data representative of viability of uninfected (a) human and (b) murine macrophages treated for 48 h with either medium alone or the dry, alcoholic, or glycolic (10, 50, and 100 µg/mL) extracts of propolis. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2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

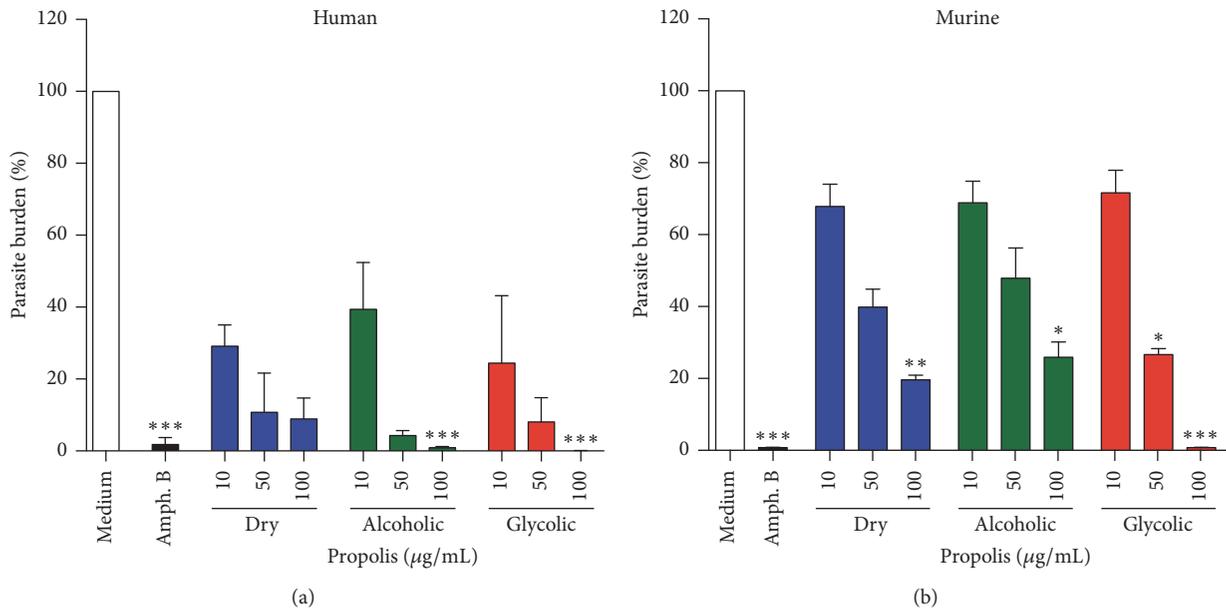


FIGURE 7: Evaluation of viability of promastigotes recovered from *L. (V) braziliensis*-infected macrophages. Human (a) and murine (b) macrophages infected for 24 h with *L. braziliensis*, treated with medium alone or with dry, alcoholic, or glycolic extracts of propolis (10, 50, and 100 µg/mL) for 48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

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

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

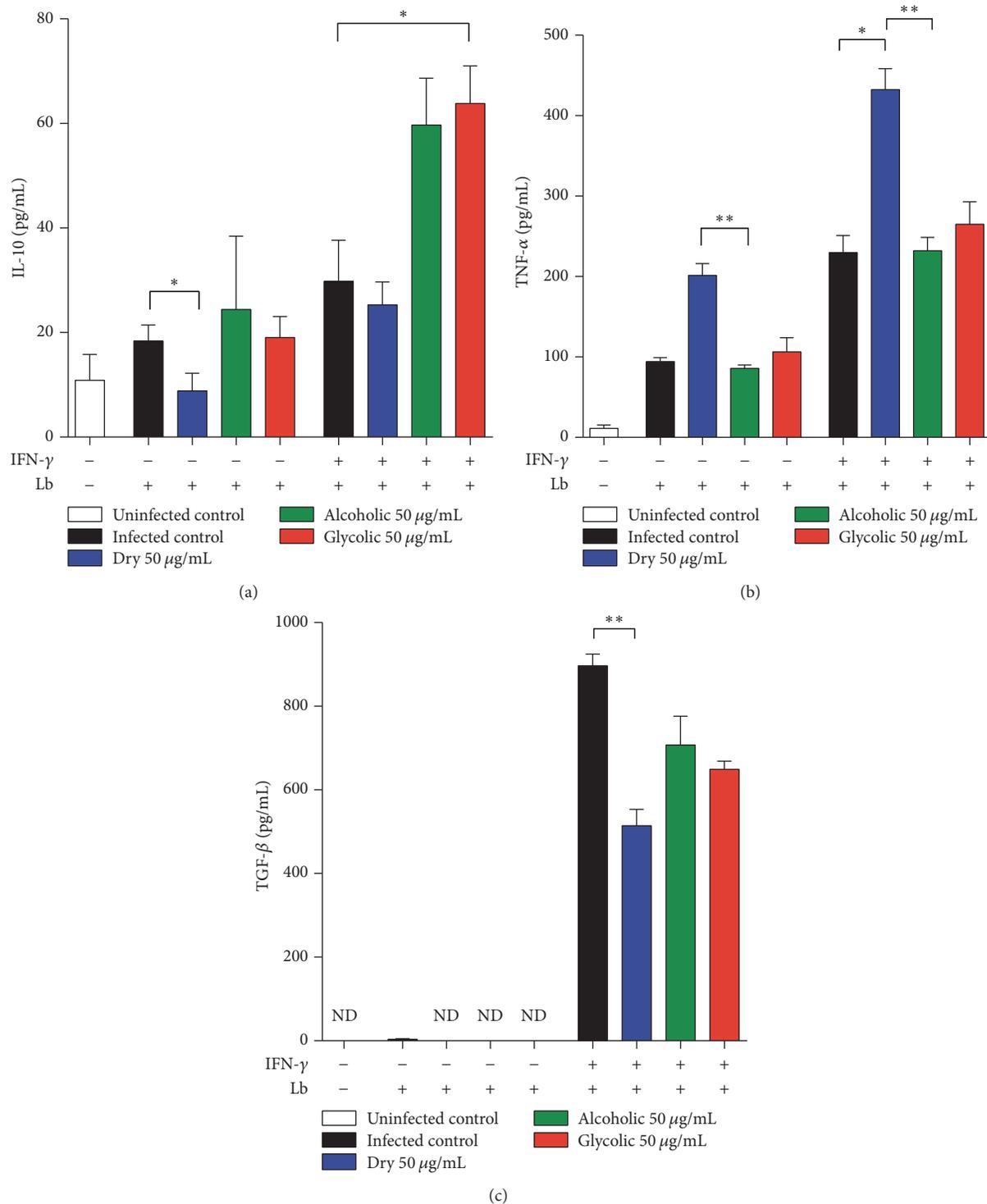


FIGURE 8: Modulation of cytokine production by propolis extract treatment. Quantification of inflammatory mediators secreted by propolis extract-treated *L. (V) braziliensis*-infected macrophages, stimulated by IFN- $\gamma$  or not, and measured in cellular supernatant, as described in Materials and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

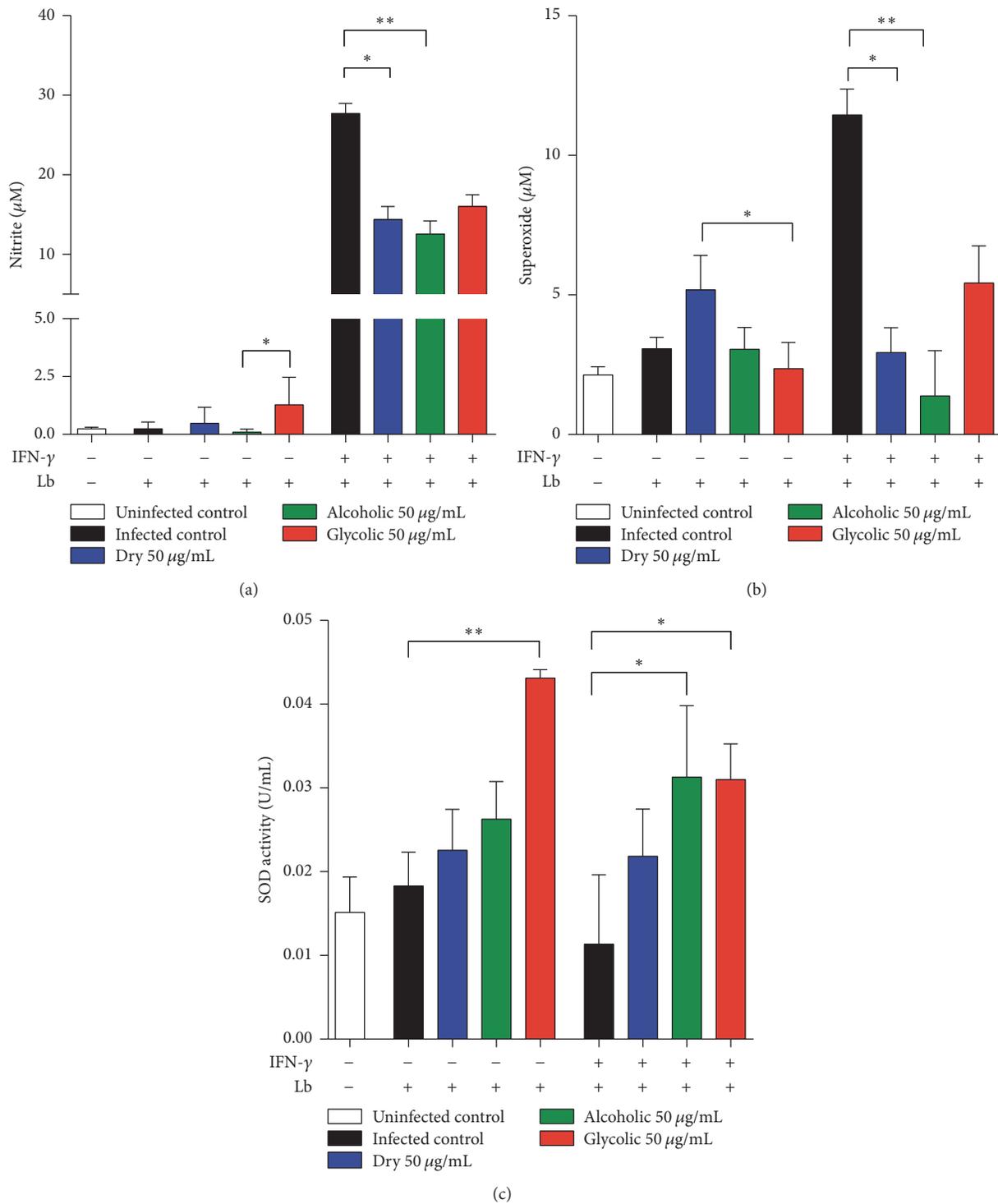


FIGURE 9: Modulation of oxidative response by propolis extract treatment. Quantification of mediators of oxidative stress released by propolis extract-treated *V. braziliensis*-infected macrophages, stimulated by IFN- $\gamma$  or not, and measured in cellular supernatant, as described in Materials and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

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

## 5. Conclusions

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

## Disclosure

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

## Conflicts of Interest

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

## Acknowledgments

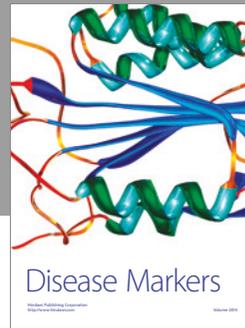
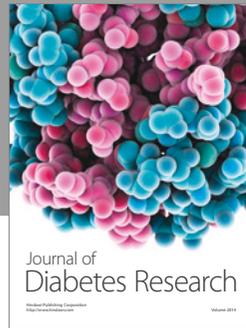
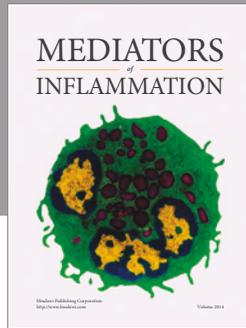
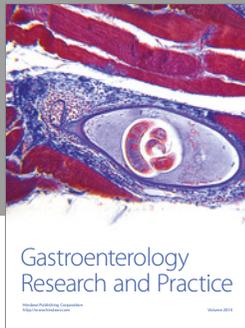
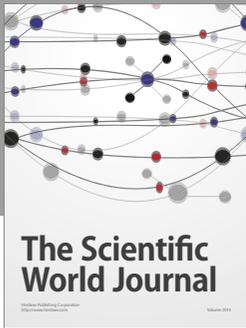
The authors thank Andreza Souza for technical and logistics support. They thank Dr. Fábio Formiga for their helpful discussions and Dr. Adriana Rangel and Dr. Claudio Figueira for their technical assistance with the electron microscopy. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento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

## References

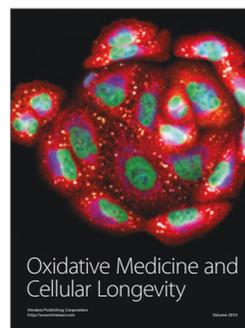
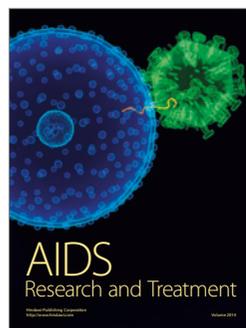
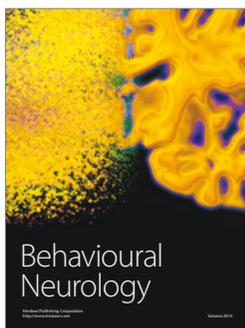
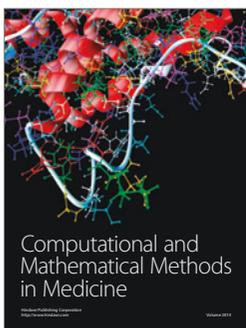
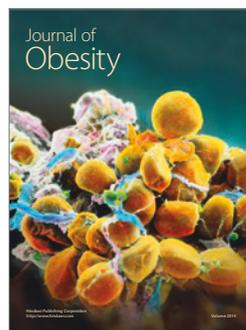
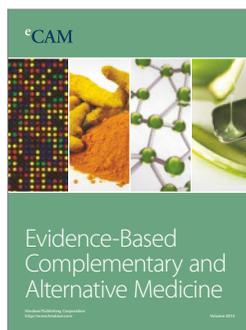
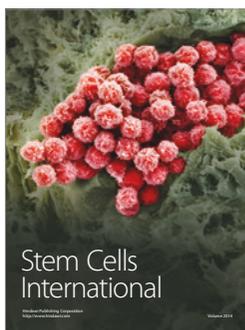
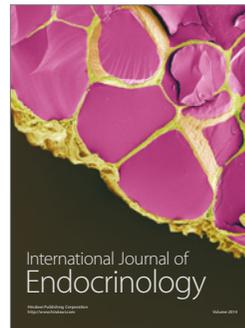
- [1] M. A. Chávez-Fumagalli, T. G. Ribeiro, R. O. Castilho, S. Odília, A. Fernandes, V. N. Cardoso et al., "Review article new delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 48, no. 3, pp. 235–242,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

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

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



**Hindawi**  
Submit your manuscripts at  
<https://www.hindawi.com>



## Anexo B - Artigos publicados em colaboração durante o desenvolvimento da tese



## RESEARCH ARTICLE

# Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction

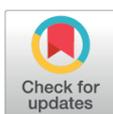
Danielle Devequi-Nunes<sup>1,2,3</sup>✉, Bruna Aparecida Souza Machado<sup>1</sup>✉\*, Gabriele de Abreu Barreto<sup>1,‡</sup>, Jéssica Rebouças Silva<sup>2,3,‡</sup>, Danielle Figuerêdo da Silva<sup>4,‡</sup>, José Luiz Carneiro da Rocha<sup>1,‡</sup>, Hugo Neves Brandão<sup>4,‡</sup>, Valéria M. Borges<sup>2,3,‡</sup>, Marcelo Andres Umsza-Guez<sup>3</sup>✉

**1** SENAI CIMATEC University Center, Health Institute of Technologies (ITS CIMATEC), National Service of Industrial Learning—SENAI, Salvador, Bahia, Brazil, **2** Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil, **3** Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, **4** Estadual University of Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

\* [brunamachado17@hotmail.com](mailto:brunamachado17@hotmail.com)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Devequi-Nunes D, Machado BAS, Barreto GdA, Rebouças Silva J, da Silva DF, da Rocha JLC, et al. (2018) Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. PLoS ONE 13(12): e0207676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207676>

**Editor:** David A. Lightfoot, College of Agricultural Sciences, UNITED STATES

**Received:** May 21, 2018

**Accepted:** November 5, 2018

**Published:** December 4, 2018

**Copyright:** © 2018 Devequi-Nunes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The study was unfunded, and the authors received no specific funding for this work.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Propolis is a natural product with many demonstrated biological activities and propolis extract has been used in the food, pharmaceutical and cosmetics industries. Different works have showed the variations in the chemical composition, and consequently, on the biological activity of the propolis that are associated with its type and geographic origin. Due to this study evaluated propolis extracts obtained through supercritical extraction and ethanolic extraction (conventional) in three samples of different types of propolis (red, green and brown), collected from different regions in Brazil (state of Bahia). Analyses were performed to determine the humidity, water activity, the content of total ash, proteins, lipids and fiber in raw propolis samples. The content of phenolic compounds, flavonoids, *in vitro* antioxidant activity (DPPH), catechin, ferulic acid and luteolin and antimicrobial activity against two bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) were determined for all extracts. For the green and red ethanolic extracts the anti-leishmanicidal potential was also evaluated. The physicochemical profiles showed agreement in relation to the literature. The results identified significant differences among the extracts ( $p > 0.05$ ), which are in conformity with their extraction method, as well as with type and botanical origin of the samples. The extraction with supercritical fluid was not efficient to obtain extracts with the highest contents of antioxidants compounds, when compared with the ethanolic extracts. The best results were shown for the extracts obtained through the conventional extraction method (ethanolic) indicating a higher selectivity for the extraction of antioxidants compounds. The red variety showed the largest biological potential, which included the content of antioxidants compounds. The results found in this study confirm the influence of the type of the raw material on the composition and characteristics of the extracts. The parameters analysis were important to

Article

# Heightened Plasma Levels of Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) and Increased Degree of Systemic Biochemical Perturbation Characterizes Hepatic Steatosis in Overweight Pediatric Patients: A Cross-Sectional Study

Junaura R. Barretto <sup>1,2,†</sup> , Ney Boa-Sorte <sup>1,2,3,†</sup>, Caian L. Vinhaes <sup>4,5,6,†</sup>, Hayna Malta-Santos <sup>4,7</sup> , Jessica Rebouças-Silva <sup>4,7</sup> , Camila F. Ramos <sup>1</sup>, Monica A. S. Torres-Nascimento <sup>1</sup>, Valeria M. Borges <sup>4,7</sup> and Bruno B. Andrade <sup>1,4,5,6,7,8,\*</sup> 

<sup>1</sup> Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador 41150-100, Brazil; junaura@gmail.com (J.R.B.); neyboasorte@gmail.com (N.B.-S.); cmilafr.nut@gmail.com (C.F.R.); monicatorres@bahiana.edu.br (M.A.S.T.-N.)

<sup>2</sup> Fima Lifshitz Metabolic Unit, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador 40170-110, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, Salvador 48000-000, Brazil

<sup>4</sup> Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador 40296-710, Brazil; caianleal@gmail.com (C.L.V.); haynamalta@gmail.com (H.M.-S.); jeureboucas@gmail.com (J.R.-S.); vborges@bahia.fiocruz.br (V.M.B.)

<sup>5</sup> Multinational Organization Network Sponsoring Translational and Epidemiological Research (MONSTER) Initiative, Salvador 41810-710, Brazil

<sup>6</sup> Curso de Medicina, Faculdade de Tecnologia e Ciências, Salvador 45600-080, Brazil

<sup>7</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador 40170-110, Brazil

<sup>8</sup> Curso de Medicina, Universidade Salvador (UNIFACS), Laureate Universities, Salvador 41770-235, Brazil

\* Correspondence: bruno.andrade@fiocruz.br; Tel.: +55-71-3176-2264

† These authors equally contributed to the work.

Received: 24 April 2020; Accepted: 29 May 2020; Published: 2 June 2020



**Abstract:** Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is a common cause of chronic liver disease in childhood and strongly associated with obesity. Routine biochemical non-invasive tests remain with low accuracy for diagnosis of NAFLD. We performed a cross-sectional study to examine potential associations between anthropometric and biochemical parameters, specially TGF- $\beta$ , a prognosis marker for hepatic steatosis (HS). Between May and October 2019, seventy-two overweight adolescents were enrolled, of which 36 had hepatic steatosis. Hepatic, lipidic and glycemic profiles, and levels of vitamin D, ferritin and TGF- $\beta$  were analyzed. Hierarchical cluster and a discriminant model using canonical correlations were employed to depict the overall expression profile of biochemical markers and the biochemical degree of perturbation. Median values of alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transpeptidase (GGT), and TGF- $\beta$  were higher in the adolescents with HS. Values of body mass index (BMI)/age and ALT, but not of TGF- $\beta$ , were gradually increased proportionally to augmentation of steatosis severity. In a multivariate analysis, TGF- $\beta$  plasma concentrations were associated with occurrence of hepatic steatosis independent of other covariates. Discriminant analysis confirmed that TGF- $\beta$  concentrations can identify HS cases. Our data reveal that HS patients exhibit a distinct biosignature of biochemical parameters and imply TGF- $\beta$  as an important biomarker to evaluate risk of steatosis development.

**Keywords:** non-alcoholic fatty liver disease; pediatric obesity; transforming growth factor beta; systemic biochemical perturbation; transaminases; cross-sectional studies



OPEN

# RISK6, a 6-gene transcriptomic signature of TB disease risk, diagnosis and treatment response

Adam Penn-Nicholson<sup>1,3,4</sup>, Stanley Kimbung Mbandi<sup>1,3,4</sup>, Ethan Thompson<sup>2,3,4</sup>, Simon C. Mendelsohn<sup>1,3,4</sup>, Sara Suliman<sup>1,3</sup>, Novel N. Chegou<sup>5</sup>, Stephanus T. Malherbe<sup>6</sup>, Fatoumatta Darboe<sup>1</sup>, Mzwandile Erasmus<sup>1</sup>, Willem A. Hanekom<sup>1</sup>, Nicole Bilek<sup>1</sup>, Michelle Fisher<sup>1</sup>, Stefan H. E. Kaufmann<sup>5,6</sup>, Jill Winter<sup>7</sup>, Melissa Murphy<sup>8</sup>, Robin Wood<sup>9</sup>, Carl Morrow<sup>8</sup>, Ildiko Van Rhijn<sup>3</sup>, Branch Moody<sup>3</sup>, Megan Murray<sup>9</sup>, Bruno B. Andrade<sup>10</sup>, Timothy R. Sterling<sup>11</sup>, Jayne Sutherland<sup>12</sup>, Kogieleum Naidoo<sup>13,14</sup>, Nesri Padayatchi<sup>13,14</sup>, Gerhard Walzl<sup>15</sup>, Mark Hatherill<sup>1</sup>, Daniel Zak<sup>2</sup>, Thomas J. Scriba<sup>1,16</sup>✉, The Adolescent Cohort Study team\*, The G66-74 Consortium\*, The SATVI Clinical and Laboratory Team\*, The ScreenTB Consortium\*, The AE-TBC Consortium\*, The RePORT Brazil Team\*, Peruvian Household Contacts Cohort Team\* & The CAPRISA IMPRESS team\*

Improved tuberculosis diagnostics and tools for monitoring treatment response are urgently needed. We developed a robust and simple, PCR-based host-blood transcriptomic signature, RISK6, for multiple applications: identifying individuals at risk of incident disease, as a screening test for subclinical or clinical tuberculosis, and for monitoring tuberculosis treatment. RISK6 utility was validated by blind prediction using quantitative real-time (qRT) PCR in seven independent cohorts. Prognostic performance significantly exceeded that of previous signatures discovered in the same cohort. Performance for diagnosing subclinical and clinical disease in HIV-uninfected and HIV-infected persons, assessed by area under the receiver-operating characteristic curve, exceeded 85%. As a screening test for tuberculosis, the sensitivity at 90% specificity met or approached the benchmarks set out in World Health Organization target product profiles for non-sputum-based tests. RISK6 scores correlated with lung immunopathology activity, measured by positron emission tomography, and tracked treatment response, demonstrating utility as treatment response biomarker, while predicting treatment failure prior to treatment initiation. Performance of the test in capillary blood samples collected by finger-prick was noninferior to venous blood collected in PAXgene tubes. These results support incorporation of RISK6 into rapid, capillary blood-based point-of-care PCR devices for prospective assessment in field studies.

<sup>1</sup>South African Tuberculosis Vaccine Initiative, Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine and Division of Immunology, Department of Pathology, University of Cape Town, Cape Town, South Africa. <sup>2</sup>Center for Infectious Disease Research, Seattle, WA, USA. <sup>3</sup>Brigham and Women's Hospital, Division of Rheumatology, Immunity and Inflammation, Harvard Medical School, Boston, USA. <sup>4</sup>DST-NRF Centre of Excellence for Biomedical Tuberculosis Research; South African Medical Research Council Centre for Tuberculosis Research; Division of Molecular Biology and Human Genetics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Stellenbosch University, Cape Town, South Africa. <sup>5</sup>Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany. <sup>6</sup>Hagler Institute for Advanced Study at Texas A&M University, College Station, TX, USA. <sup>7</sup>Catalysis Foundation for Health, San Ramon, CA, USA. <sup>8</sup>Desmond Tutu HIV Centre, and Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine (IDM), University of Cape Town, Cape Town, South Africa. <sup>9</sup>Department of Global Health and Social Medicine, and Division of Global Health Equity, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. <sup>10</sup>Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil. <sup>11</sup>Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, USA. <sup>12</sup>Vaccines and Immunity, Medical Research Council Unit, Fajara, The Gambia. <sup>13</sup>Centre for the AIDS Programme of Research in Africa, Durban, South Africa. <sup>14</sup>South African Medical Research Council-CAPRISA HIV-TB Pathogenesis and Treatment Research Unit, Durban, South Africa. <sup>15</sup>These authors contributed equally: Adam Penn-Nicholson, Stanley Kimbung Mbandi, Ethan Thompson and Simon C. Mendelsohn. ✉Lists of authors and their affiliations appear at the end of the paper. ✉e-mail: [thomas.scriba@uct.ac.za](mailto:thomas.scriba@uct.ac.za)



# Prevalence and Clinical Profiling of Dysglycemia and HIV Infection in Persons With Pulmonary Tuberculosis in Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Zhiliang Hu,  
Nanjing Second Hospital, China

### Reviewed by:

Lucio Vera-Cabrera,  
Universidad Autonoma de Nuevo  
León, Mexico

Rachel Lai,  
Imperial College London,  
United Kingdom

### \*Correspondence:

Bruno B. Andrade  
bruno.andrade@fiocruz.br

† These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Infectious Diseases - Surveillance,  
Prevention and Treatment,  
a section of the journal  
Frontiers in Medicine

Received: 28 October 2021

Accepted: 14 December 2021

Published: 21 January 2022

### Citation:

Arriaga MB, Araújo-Pereira M,  
Barreto-Duarte B, Sales C,  
Miguez-Pinto JP, Nogueira EB,  
Nogueira BMF, Rocha MS, Souza AB,  
Benjamin A, de Oliveira JG,  
Moreira ASR, Queiroz ATL,  
Rodrigues MMS, Spener-Gomes R,  
Figueiredo MC, Durovni B,  
Cavalcante S, Lapa-e-Silva JR,  
Kristki AL, Cordeiro-Santos M,  
Sterling TR, Rolla VC, Andrade BB and  
the RePORT-Brazil consortium (2022)  
Prevalence and Clinical Profiling of  
Dysglycemia and HIV Infection in  
Persons With Pulmonary Tuberculosis  
in Brazil. *Front. Med.* 8:804173.  
doi: 10.3389/fmed.2021.804173

María B. Arriaga<sup>1,2,3†</sup>, Mariana Araújo-Pereira<sup>1,2,3†</sup>, Beatriz Barreto-Duarte<sup>1,2,4,5†</sup>,  
Caio Sales<sup>1,2,4</sup>, João Pedro Miguez-Pinto<sup>1,2,4</sup>, Evelyn B. Nogueira<sup>1,2,4</sup>,  
Betânia M. F. Nogueira<sup>1,2,3,6</sup>, Michael S. Rocha<sup>1,2,6,7</sup>, Alexandra B. Souza<sup>8,9</sup>,  
Aline Benjamin<sup>10</sup>, Jamile G. de Oliveira<sup>11</sup>, Adriana S. R. Moreira<sup>12</sup>, Artur T. L. Queiroz<sup>2,13</sup>,  
Moreno M. S. Rodrigues<sup>14</sup>, Renata Spener-Gomes<sup>8,9</sup>, Marina C. Figueiredo<sup>15</sup>,  
Betina Durovni<sup>11</sup>, Solange Cavalcante<sup>11</sup>, José R. Lapa-e-Silva<sup>5,12</sup>, Afrânio L. Kristki<sup>5,12</sup>,  
Marcelo Cordeiro-Santos<sup>8,9,16</sup>, Timothy R. Sterling<sup>15</sup>, Valeria C. Rolla<sup>10</sup>,  
Bruno B. Andrade<sup>1,2,3,4,7,15\*</sup> and the RePORT-Brazil consortium

<sup>1</sup> Laboratório de Inflamação e Biomarcadores, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil,

<sup>2</sup> Multinational Organization Network Sponsoring Translational and Epidemiological Research (MONSTER) Initiative, Salvador,

Brazil, <sup>3</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, <sup>4</sup> Escola de Medicina, Universidade

Salvador (UNIFACS), Salvador, Brazil, <sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Universidade Federal do Rio de

Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>6</sup> Instituto Brasileiro para Investigação da Tuberculose, Fundação José Silveira, Salvador,

Brazil, <sup>7</sup> Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Brazil, <sup>8</sup> Fundação Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira

Dourado, Manaus, Brazil, <sup>9</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas,

Manaus, Brazil, <sup>10</sup> Laboratório de Pesquisa Clínica em Micobacteriose, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas,

Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>11</sup> Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>12</sup> Programa

Acadêmico de Tuberculose da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil,

<sup>13</sup> Center of Data and Knowledge Integration for Health, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil,

<sup>14</sup> Laboratório de Análise e Visualização de Dados, Fundação Oswaldo Cruz, Porto Velho, Brazil, <sup>15</sup> Division of Infectious

Diseases, Department of Medicine, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, United States, <sup>16</sup> Faculdade de

Medicina, Universidade Nilton Lins, Manaus, Brazil

**Background:** There are scarce data on the prevalence and disease presentation of HIV in patients with tuberculosis (TB) and dysglycemia (diabetes [DM] and prediabetes [PDM]), especially in TB-endemic countries.

**Methods:** We assessed the baseline epidemiological and clinical characteristics of patients with culture-confirmed pulmonary TB, enrolled in a multicenter prospective cohort in Brazil (RePORT-Brazil) during 2015–2019. Dysglycemia was defined by elevated glycated hemoglobin and stratified as PDM or DM. Additionally, we used data from TB cases obtained through the Brazilian National Notifiable Diseases Information System (SINAN), during 2015–2019. In SINAN, diagnosis of diabetes was based on self-report. Logistic regression models were performed to test independent associations between HIV, dysglycemia status, and other baseline characteristics in both cohorts.

**Results:** In the RePORT-Brazil cohort, the prevalence of DM and of PDM was 23.7 and 37.8%, respectively. Furthermore, the prevalence of HIV was 21.4% in the group of persons with TB-dysglycemia and 20.5% in that of patients with TBDM. In the SINAN cohort, the prevalence of DM was 9.2%, and among the TBDM group the prevalence of HIV was 4.1%. Logistic regressions demonstrated that aging was independently