



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOTERÁPICO DO 17-DMAG UTILIZANDO
DIFERENTES ABORDAGENS TERAPÊUTICAS
NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis***

KERCIA PINHEIRO CRUZ

Salvador – Bahia

2023

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOTERÁPICO DO 17-DMAG UTILIZANDO
DIFERENTES ABORDAGENS TERAPÊUTICAS
NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis***

KERCIA PINHEIRO CRUZ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Doutora.

Orientadora: Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras

Salvador - Bahia

2023

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

C957a Cruz, Kercia Pinheiro

Avaliação do potencial quimioterápico do 17-DMAG utilizando diferentes abordagens terapêuticas no controle da infecção por *Leishmania braziliensis* / Kercia Pinheiro Cruz. _ Salvador, 2023.

200 f.: il.: 30 cm

Orientadora: Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras, Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro e Epidemiologia.

Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

1. Leishmaniose. 2. L. braziliensis. 3. Hsp90. 4. 17-DMAG. 5. Tratamento. I. Título.

CDU 616.99.161


“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOTERÁPICO DO 17-DMAG UTILIZANDO DIFERENTES ABORDAGENS TERAPÊUTICAS NO CONTROLE DA INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis*”.

KERCIA PINHEIRO CRUZ


FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, **10 de maio 2023**.


COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 FRANCISCO ALEXANDRINO JUNIOR
Data: 17/05/2023 09:59:28-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Francisco Alexandrino Júnior
Professor
UFRJ

Documento assinado digitalmente
 PAULO ROBERTO LIMA MACHADO
Data: 17/05/2023 20:10:41-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Paulo Roberto Lima Machado
Médico
UFBA

Documento assinado digitalmente
 JAIME RIBEIRO FILHO
Data: 12/05/2023 13:53:50-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Jaime Ribeiro Filho
Pesquisador em Saúde Pública
Fiocruz/Ceará

FONTES DE FINANCIAMENTO

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

Aos meus pais, Vera e Ednalvo, a quem eu
sempre dedicarei todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

À todas as forças da natureza que me guiam, me protegem e permitem que eu trilhe o bom caminho;

Ao Instituto Gonçalo Moniz (IGM-FIOCRUZ), ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela estrutura oferecida, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho e pelo financiamento da pesquisa;

À Dra. Patrícia Veras, minha orientadora, pelos doze anos de parceria, contribuindo para a formação da profissional que eu sou hoje;

Ao Laboratório de Micro e Nanotecnologia (LMN – Farmanguinhos, Fiocruz - RJ), em especial a Helvécio Rocha e Beatriz Patrício, pela parceria, discussões e apoio no desenvolvimento das nanopartículas, e a Michelle Sarcinelli, Flávia Fernandes e Marcelo Chaves pelo auxílio na condução dos experimentos e análises;

A Fabio Formiga, pela parceria e ideias no desenvolvimento das nanopartículas;

A Dr. Washington dos Santos, Dra. Isadora Lima e Bianca Azevedo, pelas análises histológicas;

Ao prof. Dr. Gilberto Cafezeiro, pelo auxílio na infecção dos animais;

A André Sampaio, pela condução dos experimentos com as nanopartículas em células de linhagens de câncer;

A Frederico Castelo Branco, pela condução dos ensaios de produção do 17-DMAG;

Ao Senai-CIMATEC, em especial a Dr. Jeancarlo dos Anjos e Eliete Alvez, pelo apoio com as análises em HPLC e estrutura oferecida nesta parceria;

A Marina Faillace, minha amiga e parceira na realização dos experimentos com animais;

A Luana Palma, pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa;

Aos alunos de iniciação científica que eu tive o prazer de coorientar, contribuir com o seu conhecimento e que também contribuíram para a minha formação da profissional: Brenda Melo, Carine Araujo, Gabriella Pitta, Yuri Antônio Carvalho, Izabella Gouveia, Ana Luiza Cordeiro, Mariana Rollemberg, Alexnaldo Junior, Jade Liz Mendes e, em especial, a Alan Gualberto Pinho, que ficou três anos ao meu lado, desenvolvendo este projeto, e a Marina Faillace, pela amizade e parceria na realização dos experimentos *in vivo*;

A Vinícius Pires, pelo auxílio nos experimentos com nanopartículas e com a apresentação;

A Rafael Tiburcio, pelo auxílio e paciência nos experimentos de citometria de fluxo;

À equipe da citometria e da microscopia, em especial à Marcio Santos e Arlene Lessa, pela relação de amizade, além da profissional, e por ajudar sempre tão prestativamente;

À equipe do biotério, pela atenção com os animais e comigo, sempre que precisei;

Aos animais eutanasiados para o desenvolvimento dessa pesquisa e avanço da ciência;

Às pesquisadoras e aos colegas do LaIPHE, pelas contribuições na pesquisa;

Aos “amigos que eu gosto” pela amizade, apoio e por tornar o ambiente e o dia a dia mais alegre, principalmente nas paradas para o cafezinho e pipoca;

Aos amigos que fiz na vida acadêmica, que sempre me ouviram e me incentivaram a não desistir e a seguir um dia de cada vez: Bruna Leite, Brenda Melo, Marina Faillace, Yasmin Luz, Yuri de Jesus, Amanda Rebouças e Jéssica Mirella;

À Isabelle Coelho e Luana Nascimento, pela amizade e por sempre ajudar tão prestativamente na resolução de questões burocráticas ao longo do desenvolvimento do projeto;

A todos os funcionários do IGM, local onde eu passei a maior parte dos últimos cinco anos, por fazerem o centro funcionar e torná-lo um ambiente amigável, seguro e acolhedor;

À minha mãe, Vera, pelo amor incomparável, amizade, companheirismo, dedicação, e por ouvir meus desabafos, estresses e preocupações diariamente, sendo o meu porto seguro sempre que eu preciso;

Ao meu pai, Ednalvo, pelo amor e dedicação, por se fazer tão presente, ainda com a distância, e por sempre se sacrificar tanto para que eu consiga atingir meus objetivos e queira ir cada vez mais longe;

À minha família e aos meus amigos, por acompanhar e compartilhar esse turbilhão de emoções e surpresas que a vida nos reserva, pelos momentos de descontração e descanso e por entender a minha ausência e atrasos em alguns encontros;

À Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant’Anna do Instituto Gonçalo Moniz, pelo acervo e estrutura disponibilizados e à Eneida Nascimento, pela correção do manuscrito.

*“Quando a mulher negra se movimenta, toda a estrutura da sociedade se movimenta com ela,
porque tudo é desestabilizado a partir da base da pirâmide social
onde se encontram as mulheres negras [...].”*

(Angela Davis)

CRUZ, Kercia Pinheiro. **Avaliação do potencial quimioterápico do 17-DMAG utilizando diferentes abordagens terapêuticas no controle da infecção por *Leishmania braziliensis***. 2023. 200 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

RESUMO

INTRODUÇÃO: As leishmanioses são doenças negligenciadas causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e endêmicas em 98 países. A leishmaniose cutânea, caracterizada pela presença de lesões na pele, apesar de não fatal, gera estigmatização, podendo afetar a qualidade de vida dos pacientes. Os tratamentos atuais apresentam limitações como a via de administração invasiva e a ocorrência de efeitos colaterais, evidenciando a necessidade de novos fármacos. Inibidores da Hsp90 da família da Geldanamicina, incluindo o 17-AAG e o seu análogo hidrossolúvel, 17-DMAG, vêm demonstrando ter potencial antiparasitário. Em estudos prévios, foi descrito que esses inibidores apresentam efeito anti-*Leishmania in vitro*. **OBJETIVO:** Avaliar o potencial terapêutico do 17-DMAG no controle da infecção por *L. braziliensis in vitro* e *in vivo*, usando formulações para aplicação por via sistêmica ou tópica, e desenvolver nanopartículas (NPs) para a liberação controlada deste fármaco. **MATERIAL E MÉTODOS:** A toxicidade do 17-DMAG sobre células de linhagem HaCaT, macrófagos derivados de medula óssea (BMMØ) e promastigotas axênicas de *L. braziliensis* foi avaliada *in vitro*, utilizando Alamar blue. Adicionalmente, a viabilidade de amastigotas intracelulares foi avaliada por contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, em microscópio óptico, após 72 h de tratamento. Para os ensaios *in vivo*, camundongos BALB/c foram infectados na orelha com promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após três ou cinco semanas de infecção, foram tratados por via intraperitoneal (IP) com o 17-DMAG ou com glicose, como controle, durante quatro semanas adicionais. A eficácia do composto administrado por via IP no controle da infecção foi avaliada iniciando o tratamento após três ou cinco semanas de infecção, com a caracterização da resposta imunoinflamatória do hospedeiro e avaliação de recidiva da carga parasitária após suspensão do tratamento. Paralelamente, hidrogel a base de carboximetilcelulose contendo diferentes concentrações do 17-DMAG foi preparado e caracterizado de acordo com sua estabilidade. A toxicidade da formulação tópica foi avaliada pelas observações clínicas e histopatológicas nas orelhas dos camundongos saudáveis, expostos por até quatro semanas com diferentes concentrações do 17-DMAG em hidrogel, comparados com os controles expostos ou não ao hidrogel sem fármaco. Em seguida, a eficácia foi avaliada em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* comparados com os animais controles, tratados ou não com o hidrogel branco. NPs poliméricas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) contendo ou não o 17-DMAG foram produzidas, utilizando dois protocolos de dupla emulsão (P1 ou P2), e caracterizadas de acordo com tamanho, índice de polidispersão (PdI), potencial zeta (ZP), formato, aspecto da superfície e eficiência de encapsulamento (%EE), por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). **RESULTADOS:** A concentração necessária para causar a morte de 50% das células foi respectivamente maior para HaCaT [13,68 µM (Q1: 10,03; Q3: 13,75)] e BMMØ (3,2 ± 1,06 µM) que para promastigotas (674,2 ± 0,07 nM) e amastigotas intracelulares (7,4 ± 3,27 nM) de *L. braziliensis*, indicando um potente efeito anti-*Leishmania* do 17-DMAG *in vitro*. O tratamento IP causou redução de 7 vezes na espessura da orelha, no tamanho do linfonodo e de 1000 vezes na carga parasitária nesses órgãos. Também foi observada redução do número de células no sítio da lesão, sugerindo uma diminuição do recrutamento de células nos animais tratados. Um aumento transitório do percentual de linfócitos T regulatórios (T reg) no dia 7, comparado aos dias 4 e 28 de tratamento, foi observado, sugerindo que o fármaco exerce também um papel na resposta imunomodulatória do hospedeiro. O 17-DMAG em hidrogel foi estável, por 90 dias, a 4 °C ou à temperatura

ambiente, mas não a 37 °C. O fármaco foi liberado desta formulação de forma controlada, de maneira tempo-dependente, ao longo de 24 h. Devido ao aumento do tempo de exposição, a aplicação tópica do 17-DMAG foi tolerável por camundongos saudáveis, com aumento da toxicidade quando em uso de colares elizabetanos. A exposição tópica ao 17-DMAG foi tolerável por camundongos saudáveis, com toxicidade aumentada quando em uso de colares elizabetanos, devido ao aumento do tempo de exposição. Nas doses de 0,10 ou 0,15 mg/g, comparado ao controle não tratado, o 17-DMAG em hidrogel reduziu cerca de 50% a espessura da orelha e contribuiu para a cicatrização das lesões. Por fim, as NPs produzidas pelo protocolo P2 apresentaram melhores características que o protocolo P1, com menores tamanhos e PdI, %EE entre 20 e 30%, formato esférico e superfície lisa. **CONCLUSÃO:** O 17-DMAG controla efetivamente a infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. braziliensis* tanto quando aplicado por via intraperitoneal quanto por via tópica. Adicionalmente, PLGA-NPs com boas características foram produzidas para futuros testes de eficácia, *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Leishmaniose. *L. braziliensis*. Hsp90. 17-DMAG. Tratamento.

CRUZ, Kercia Pinheiro. **Assessment of 17-DMAG chemotherapeutic potential using different approaches in the control of *Leishmania braziliensis* infection**. 2023. 200 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Leishmaniasis are neglected diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* and are endemic in 98 countries. Cutaneous leishmaniasis, characterized by the presence of skin lesions, although not fatal, generates stigmatization and may affect the quality of life of affected patients. Current treatments have limitations, such as invasive route of administration and occurrence of side effects, highlighting the need for new drugs. Hsp90 inhibitors from the Geldanamycin family, including 17-AAG and its hydro soluble analog, 17-DMAG, have been shown to present antiparasitic potential. In previous studies, it has been described that these inhibitors presented an anti-*Leishmania* effect *in vitro*. **AIM:** To evaluate the therapeutic potential of 17-DMAG in controlling *L. braziliensis* infection *in vitro* and *in vivo*, using formulations for systemically and topical administration, and to improve 17-DMAG presentations, developing nanoparticles (NPs) as a controlled release system. **MATERIAL AND METHODS:** The toxicity effect of 17-DMAG was evaluated against HaCaT cells, bone marrow-derived macrophages (BMMØ) and axenic promastigotes of *L. braziliensis* *in vitro* using Alamar blue reagent. The viability of intracellular amastigotes was also evaluated by determining parasite counts in Neubauer chamber using a microscope after 72 h of treatment. For the *in vivo* tests, BALB/c mice were infected in the ear with metacyclic promastigotes of *L. braziliensis* and, after three or five weeks of infection, they were treated intraperitoneally (IP) with 17-DMAG or with glucose, as a control, for additional four weeks. The effectiveness of the compound administrated via IP was evaluated in the infection control by initiating treatment at three or five weeks after infection, in the characterization of immune-inflammatory response of the host, and in the occurrence of parasite load relapse after treatment completion. In parallel, a hydrogel formulation based on carboxymethylcellulose (CMC) containing different concentrations of 17-DMAG was prepared and first tested for stability. Formulation toxicity was then evaluated by clinical and histopathological observations of the ears from uninfected mice submitted for up to four weeks with different dosages of 17-DMAG-hydrogel compared to controls submitted or not to the 17-DMAG-free hydrogel. The efficacy was also evaluated in *L. braziliensis*-infected BALB/c mice compared to control animals that were treated or not with 17-DMAG-free hydrogel. Polymeric poly (lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) NPs containing 17-DMAG were produced using two double emulsion protocols (P1 or P2). These NPs were then characterized according to size, polydispersion index (PDI), zeta potential (ZP), shape, surface aspect and encapsulation efficiency (%EE) using High-performance liquid chromatography (HPLC). **RESULTS:** The concentration required to kill 50% of the cells was, respectively, higher for HaCaT [13,68 µM (Q1: 10,03; Q3: 13,75)] and BMMØ (3,2 ± 1,06 µM) than for promastigotes (674,2 ± 0,07 nM) and intracellular amastigotes (7,4 ± 3,27 nM) of *L. braziliensis*, indicating a potent anti-*Leishmania* effect of 17-DMAG *in vitro*. IP treatment caused a reduction of 7 times in ear thickness, lymph node size and 1000 times parasitic load in these organs. We also observed impairment in the cell numbers to the lesion site, suggesting that cell recruitment was impaired in treated mice. A transient increase in the percentage of regulatory T lymphocytes (T reg) at 7 days compared to 4 and 28 days after treatment was observed, suggesting that the drug play a role in the host immunomodulatory response. Hydrogel-containing 17-DMAG was stable for 90 days at 4°C or at room temperature, but not at 37°C. The drug was released from this formulation in a time-dependent controlled manner

over 24 hours. Due to increased exposure time, topical exposure to 17-DMAG was tolerable by healthy mice, with increased toxicity when using Elizabethan collars. At dosages of 0.10 or 0.15 mg/g, hydrogel-containing 17-DMAG, compared to untreated controls, reduced by 50% ear thickness and contributed to wound healing. Finally, the NPs produced by the P2 protocol showed better characteristics than the P1 protocol, with smaller sizes and PDI, %EE between 20 and 30%, spherical shape and smooth surface. **CONCLUSION:** 17-DMAG effectively controls *in vitro* and *in vivo* infection by *L. braziliensis* when applied intraperitoneally and topically. In addition, PLGA-NPs that presented better characteristics were produced for future efficacy tests *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Leishmaniasis. *L. braziliensis*. Hsp90. 17-DMAG. Treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo digenético de <i>Leishmania</i> sp.	29
Figura 2 – Representação estrutural do homodímero formado pela chaperona Hsp90.....	40
Figura 3 – Ciclo de funcionamento da chaperona Hsp90.....	43
Figura 4 – Principais inibidores da Hsp90	45
Figura 5 – Atividade de inibidores da Hsp90.....	46
Figura 6 – Representação esquemática dos componentes da pele, incluindo suas principais células e camadas.....	53
Figura 7 – Diagrama esquemático das possíveis condições da pele durante a leishmaniose cutânea.....	54
Figura 8 – Escala nanométrica utilizada para definir nanopartículas, comparativamente a outras estruturas integrantes dos sistemas vivos	57
Figura 9 – Administração de fármacos e nível plasmático do princípio ativo quando administrado por sistemas convencionais de entrega ou por nanomedicamentos.....	59
Figura 10 – Principais nanoestruturas utilizadas como sistemas de entrega de medicamentos, com destaque para as formulações poliméricas possíveis.....	61
Figura 11 – Influência do tamanho, formato e aspecto da superfície de nanopartícula nas vias possíveis de entrada em células	63
Figura 12 – Toxicidade do 17-DMAG sobre macrófagos derivados de medula óssea (BMMΦ), <i>in vitro</i>	79
Figura 13 – Eficácia do 17-DMAG sobre promastigotas axênicas de <i>L. braziliensis</i>	80
Figura 14 – Eficácia do 17-DMAG no controle da infecção de BMMΦ por <i>L. braziliensis</i> , <i>in vitro</i> (ensaio de viabilidade intracelular).....	82
Figura 15 – Efeito do tratamento com 17-DMAG por via intraperitoneal no desenvolvimento de lesões em camundongos infectados por <i>L. braziliensis</i>	84
Figura 16 – Imagens representativas das lesões na orelha e dos linfonodos de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i> e tratados ou não com o 17-DMAG por via intraperitoneal durante 2, 4 ou 7 semanas	85
Figura 17 – Cortes histológicas das orelhas de camundongos infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados ou não com o 17-DMAG por via intraperitoneal durante 2, 4 ou 7 semanas	86
Figura 18 – Avaliação do peso de camundongos infectados por <i>L. braziliensis</i> e tratados ou não com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG por via intraperitoneal, ao longo de 28 dias	88

Figura 19 – Efeito da aplicação do 17-DMAG por via intraperitoneal em tempos iniciais de tratamento de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i>	90
Figura 20 – Imagens representativas das lesões nas orelhas e dos linfonodos de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i> e tratados ou não com o 17-DMAG por via intraperitoneal durante 2, 4, 7, 14 ou 28 dias	92
Figura 21 – Cortes histológicas das orelhas de camundongos infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados ou não com o 17-DMAG por via intraperitoneal durante 2, 4, 7, 14 ou 28 dias	93
Figura 22 – Efeito do 17-DMAG na espessura da lesão na orelha de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i> após 4, 7 ou 28 dias	95
Figura 23 – Imagens representativas das lesões nas orelhas e contagem de linfócitos do linfonodo retroauricular de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i> e tratados ou não com o 17-DMAG por via intraperitoneal durante 4, 7, ou 28 dias	97
Figura 24 – Caracterização de linfócitos do linfonodo retroauricular de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i> e tratados ou não com 17-DMAG durante 4, 7 ou 28 dias.....	98
Figura 25 – Avaliação do efeito do 17-DMAG na espessura da lesão na orelha de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i> durante e após a interrupção do tratamento.....	100
Figura 26 – Imagens representativas das lesões nas orelhas de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i> e tratados ou não com o 17-DMAG por via intraperitoneal durante e após a finalização do tratamento.....	101
Figura 27 – Avaliação do efeito do 17-DMAG na carga parasitária de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i> durante e após a finalização do tratamento com o 17-DMAG por via intraperitoneal	102
Figura 28 – Avaliação do efeito do tratamento tardio com o 17-DMAG na espessura da lesão na orelha de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i>	103
Figura 29 – Imagens representativas das lesões nas orelhas de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i> e tratados ou não com o 17-DMAG, com início tardio, por via intraperitoneal.....	104
Figura 30 – Avaliação do efeito do tratamento com início tardio utilizando o 17-DMAG na carga parasitária de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i> e tratados por quatro semanas com o 17-DMAG por via intraperitoneal.....	105
Figura 31 – Esquema representativo dos compartimentos funcionais das Células de Franz..	123
Figura 32 – Desenho esquemático de colar elizabetano utilizado nos camundongos.....	124

Figura 33 – Teste da toxicidade do 17-DMAG sobre células de linhagem de queratinócitos HaCaT.....	128
Figura 34 – Estabilidade do 17-DMAG em base semissólida de hidrogel.....	129
Figura 35 – Aspecto da solução de 17-DMAG incorporado em hidrogel após 90 dias de armazenamento a 4 °C.....	130
Figura 36 – Avaliação da influência da temperatura na estabilidade do 17-DMAG livre incorporado em base semissólida de hidrogel.	131
Figura 37 - Aspecto da solução de 17-DMAG incorporado em hidrogel após 90 dias de armazenamento a 4 °C, 24 °C ou 37 °C	132
Figura 38 – Cinética da liberação do 17-DMAG da base semissólida do hidrogel	133
Figura 39 – Teste de toxicidade do 17-DMAG, incorporado em hidrogel, quando aplicado por via tópica em camundongos BALB/c, sem uso de colares elizabetanos	135
Figura 40 – Imagens representativas das orelhas de camundongos BALB/c após quatro semanas de exposição por via tópica ao 17-DMAG, incorporado em hidrogel, na ausência de colares elizabetanos	136
Figura 41 – Toxicidade do 17-DMAG, incorporado em hidrogel, quando aplicado por via tópica em camundongos BALB/c, com uso de colares elizabetanos	137
Figura 42 – Imagens representativas das orelhas de camundongos BALB/c após quatro semanas de exposição por via tópica ao 17-DMAG, incorporado em hidrogel, com uso de colares elizabetanos	138
Figura 43 – Análises histológicas de tecidos de camundongos BALB/c expostos, por via tópica, ao 17-DMAG, incorporado em hidrogel, com uso de colares elizabetanos.....	139
Figura 44 – Avaliação da toxicidade do CMC, aplicado por via tópica em camundongos BALB/c, com uso de colares elizabetanos. Camundongos BALB/c saudáveis, utilizando colares elizabetanos, foram expostos diariamente ao CMC, nas concentrações de 1% ou 2%, ou apenas ao <i>tegaderm</i> , como controle, durante quatro semanas.....	141
Figura 45 – Imagens representativas das orelhas de camundongos BALB/c após quatro semanas de exposição por via tópica ao CMC, com uso de colares elizabetanos.....	141
Figura 46 – Avaliação da reversibilidade da toxicidade causada pela aplicação tópica do 17-DMAG em hidrogel, em camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i>	143
Figura 47 – Avaliação da eficácia do tratamento tópico com o 17-DMAG, incorporado em hidrogel, no controle da infecção e camundongos BALB/c por <i>L. braziliensis</i> , sem uso de colares elizabetanos	146

Figura 48 – Imagens representativas das orelhas e linfonodos de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i> após quatro semanas de tratamento por via tópica com o 17-DMAG, incorporado em hidrogel, na ausência de colares elizabetanos.	147
Figura 49 – Avaliação da eficácia do tratamento tópico com o 17-DMAG, incorporado em hidrogel, no controle da infecção e camundongos BALB/c por <i>L. braziliensis</i> , com uso de colares elizabetanos	149
Figura 50 – Imagens representativas das orelhas e linfonodos de camundongos BALB/c infectados por <i>L. braziliensis</i> ao longo de quatro semanas de tratamento por via tópica com o 17-DMAG, incorporado em hidrogel, com uso de colares elizabetanos.....	150

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%EE	Percentual de eficiência de encapsulamento
17-AAG	17-N-alil-amino-17-demetoxigeldanamicina
17-AG	17-amino-geldanamicina
17-DMAG	17-dimetilaminoetilamino-17-demethoxigeldanamicina
ADP	Adenosina di-fosfato
ATP	Adenosina trifosfato
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATP	Adenosina tri-fosfato
AUC	Área sob a curva
B.O.D.	Demanda Bioquímica de Oxigênio
BMMΦ	Macrófago derivado de medula óssea
CC₅₀	Concentração de 50% de citotoxicidade
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CF	Ciclofilina
CMC	Carboximetilcelulose
CO₂	Dióxido de carbono
DETC	Dietilditiocarbamato
DMEM	Meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i>
EGFR	Fator de crescimento epidérmico
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos
HaCaT	Célula de linhagem de queratinócitos humanos
HE	Hematoxilina e Eosina
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HSP	Proteína de choque térmico
HSPs	Família das proteínas de choque térmico

IC₅₀	Concentração de 50% de inibição de crescimento
IF	Imunofilina
IFN-g	Interferon gama
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IL-6	Interleucina 6
IS	Índice de seletividade
J774	Célula de linhagem macrofágica murina
L-AmB	Anfotericina B lipossomal
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose cutânea disseminada
LDPK	Leishmaniose dermal pós-calazar
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
MCP-1	Quimiocina atratora de macrófagos
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MS	Ministério da Saúde
MW	Peso molecular
NaCl	Cloreto de sódio
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NIC	<i>National Institute of Cancer</i>
NPs	Nanopartículas poliméricas
OMS	Organização Mundial da Saúde
P1	Protocolo de dupla emulsão 1
P2	Protocolo de dupla emulsão 2
PBS	Tampão Fosfato Salina
PCL	Policaprolactona
PdI	Índice de polidispersão
PEG	Polietilenoglicol
PLA	Ácido Polilático
PLGA	Poli (ácido Láctico-co-glicólico)

PVA	Álcool polivinílico
RAW	Célula de linhagem macrofágica murina
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio de cultivo celular <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
THP-1	Célula de linhagem monocítica humana
TNF	Fator de Necrose Tumoral
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZP	Potencial zeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	LEISHMANIOSES	27
2.2	TRATAMENTOS ATUAIS	30
2.3	NOVOS TRATAMENTOS	33
2.4	HEAT SHOCK PROTEIN 90 (Hsp90)	37
2.5	INIBIDORES DA Hsp90	44
2.6	TRATAMENTO TÓPICO	51
2.7	NANOMEDICAMENTOS	57
3	OBJETIVOS	65
3.1	OBJETIVO GERAL	65
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	65
4	CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO LEISHMANICIDA DO 17-DMAG, APLICADO POR VIA INTRAPERITONEAL, EM CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i>	66
1	INTRODUÇÃO	66
2	OBJETIVOS	68
3	METODOLOGIA	69
3.1	ANIMAIS	69
3.2	PARASITOS	69
3.3	OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA (BMM Φ)	70
3.4	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO 17-DMAG SOBRE BMM Φ , <i>IN VITRO</i>	71
3.5	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG SOBRE PROMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i> , <i>IN VITRO</i>	71
3.6	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG NO CONTROLE DA INFECÇÃO <i>IN VITRO</i> DE BMM Φ POR <i>L. braziliensis</i>	72
3.7	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG, APLICADO POR VIA INTRAPERITONEAL, NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C POR <i>L. braziliensis</i>	72
3.8	OBTENÇÃO DE PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS DE <i>L. braziliensis</i>	73
3.9	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO 17-DMAG, APLICADO POR VIA INTRAPERITONEAL, NO CONTROLE DA INFLAMAÇÃO CAUSADA PELA INFECÇÃO POR <i>L. braziliensis</i> EM CAMUNDONGOS BALB/c	74

3.10	CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NOS LINFONODOS DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR <i>L. braziliensis</i> E TRATADOS COM 17-DMAG POR VIA INTRAPERITONEAL	74
3.11	AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA POR DILUIÇÃO LIMITANTE	76
3.12	AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE RECIDIVA EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR <i>L. braziliensis</i> , APÓS FINALIZAÇÃO DO TRATAMENTO COM 17-DMAG POR VIA INTRAPERITONEAL	76
3.13	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO TARDIO COM 17-DMAG, POR VIA INTRAPERITONEAL, NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR <i>L. braziliensis</i>	77
3.14	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS DE CAMUNDONGOS BALB/c SAUDÁVEIS OU INFECTADOS POR <i>L. braziliensis</i> E TRATADOS OU NÃO COM 17-DMAG POR VIA INTRAPERITONEAL	78
3.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	78
4	RESULTADOS	79
4.1	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO 17-DMAG SOBRE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA (BMMΦ), <i>IN VITRO</i>	79
4.2	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG SOBRE PROMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i> , <i>IN VITRO</i>	80
4.3	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE BMMΦ POR <i>L. braziliensis</i> , <i>IN VITRO</i> (ENSAIO DE VIABILIDADE INTRACELULAR)	81
4.4	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG, APLICADO POR VIA INTRAPERITONEAL, NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C POR <i>L. braziliensis</i>	82
4.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO 17-DMAG, APLICADO POR VIA INTRAPERITONEAL, NO CONTROLE DA INFLAMAÇÃO CAUSADA PELA INFECÇÃO POR <i>L. braziliensis</i> EM CAMUNDONGOS BALB/c	87
4.6	CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE LINFÓCITOS NOS LINFONODOS DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR <i>L. braziliensis</i> E TRATADOS COM 17-DMAG POR VIA INTRAPERITONEAL	94
4.7	AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE RECIDIVA EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR <i>L. braziliensis</i> , APÓS INTERRUPTÃO DO TRATAMENTO COM 17-DMAG POR VIA INTRAPERITONEAL	99
4.8	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO TARDIO COM 17-DMAG POR VIA INTRAPERITONEAL NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR <i>L. braziliensis</i>	103
5	DISCUSSÃO	106
6	CONCLUSÃO	111
7	PERSPECTIVAS	112
	REFERÊNCIAS	113

5	CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOTERÁPICO DO 17-DMAG, APLICADO POR VIA TÓPICA, NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR <i>Leishmania braziliensis</i>	116
1	INTRODUÇÃO	116
2	OBJETIVOS	119
3	METODOLOGIA	120
3.1	ANIMAIS	120
3.2	PARASITOS	120
3.3	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA TOXICIDADE DO 17-DMAG SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCaT)	121
3.4	INCORPORAÇÃO DO 17-DMAG EM BASE SEMISSÓLIDA DE HIDROGEL	121
3.5	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO 17-DMAG EM BASE SEMISSÓLIDA DE HIDROGEL	122
3.6	ENSAIO DE LIBERAÇÃO DO 17-DMAG A PARTIR DA BASE SEMISSÓLIDA DE HDROGEL	123
3.7	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO 17-DMAG EM BASE SEMISSÓLIDA DE HIDROGEL, APLICADO POR VIA TÓPICA, SOBRE CAMUNDONGOS BALB/c	124
3.8	AVALIAÇÃO DA REVERSIBILIDADE DA TOXICIDADE DO 17-DMAG EM HIDROGEL EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR <i>L. braziliensis</i>	125
3.9	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG EM BASE SEMISSÓLIDA DE HIDROGEL, APLICADO POR VIA TÓPICA, NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR <i>L. braziliensis</i>	126
3.10	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS DE CAMUNDONGOS BALB/c SAUDÁVEIS OU INFECTADOS POR <i>L. braziliensis</i> E TRATADOS OU NÃO COM 17-DMAG POR VIA TÓPICA	126
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	127
4	RESULTADOS	128
4.1	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA TOXICIDADE DO 17-DMAG SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCaT)	128
4.2	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO 17-DMAG EM BASE SEMISSÓLIDA DE HIDROGEL	129
4.3	ENSAIO DE LIBERAÇÃO DO 17-DMAG A PARTIR DA BASE SEMISSÓLIDA DE HDROGEL	133
4.4	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO 17-DMAG EM BASE SEMISSÓLIDA DE HIDROGEL, APLICADO POR VIA TÓPICA, SOBRE CAMUNDONGOS BALB/c	134
4.5	AVALIAÇÃO DA REVERSIBILIDADE DA TOXICIDADE DO 17-DMAG EM HIDROGEL EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR <i>L. braziliensis</i>	142

4.6	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG EM BASE SEMISSÓLIDA DE HIDROGEL, APLICADO POR VIA TÓPICA, NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR <i>L. braziliensis</i>	145
5	DISCUSSÃO	152
6	CONCLUSÃO	157
7	PERSPECTIVAS	158
	REFERÊNCIAS	159
6	CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 17-DMAG, UM INIBIDOR DA HSP90	163
1	INTRODUÇÃO	163
2	OBJETIVOS	165
3	ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO NA REVISTA FRONTIERS IN CHEMISTRY	166
7	PERSPECTIVAS	179
8	DISCUSSÃO GERAL	183
9	CONCLUSÃO	183
10	PERSPECTIVAS	184
	REFERÊNCIAS	185

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um espectro de doenças tropicais consideradas negligenciadas que está presente em 97 países ao redor do mundo, principalmente em países da África, Ásia e América do Sul (MASMOUDI et al., 2013; AKHOUNDI et al., 2016; WHO, 2021). Neste cenário, o BRASIL recebe importante destaque por ser um dos seis países que concentram mais de 90% dos casos (WHO, 2021). As principais formas clínicas da doença são a visceral, que é altamente fatal se não tratada, e a cutânea que, apesar de não fatal, causa lesões expressivas na pele dos pacientes acometidos, levando ao absenteísmo e afetando diretamente a economia local (WHO, 2021). Alguns fatores como a espécie do parasito, o *background* genético do hospedeiro e fatores de risco concomitantes definirão a forma clínica a ser exibida pelo paciente acometido (KAYE; SCOTT, 2011; ESPUELAS et al., 2016; ORYAN; AKBARI, 2016; SRIVASTAVA et al., 2016; VERAS; DE MENEZES, 2016; WHO, 2021). Uma vez infectados, os pacientes não conseguem obter uma cura parasitológica da doença e o tratamento é realizado por meio da utilização de quimioterápicos (COPELAND; ARONSON, 2015; WHO, 2021). As drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (ANDRADE-NETO et al., 2018; DE MENEZES ET AL., 2015; FREZARD et al., 2009; MARSDEN, 1985; MEYERHOFF, 1999). Além destes, outros tratamentos podem ser aplicados como alternativos ou associados entre si, como por exemplo a pentamidina, a paromomicina, a miltefosina e a anfotericina B (DE MENEZES et al., 2015). Entretanto, esses medicamentos possuem, em algum grau, certas limitações para sua utilização como via de administração invasiva, ocorrência de efeitos colaterais graves e/ou custo elevado (DE MENEZES et al., 2015). Em conjunto, essas limitações levam ao abandono do tratamento por parte dos pacientes e podem, em última instância, levar ao surgimento de cepas resistentes (SUNDAR et al., 2011). Nesse contexto, se faz necessária a busca por novos medicamentos para o tratamento das leishmanioses que sejam mais eficazes e com menor toxicidade, a médio e curto prazos.

Buscando possíveis alvos terapêuticos para tratamento da leishmaniose, nosso grupo tem estudado a proteína de choque térmico 90 (do inglês *heat shock protein* – Hsp90). Essa proteína é uma chaperona molecular responsável pelo dobramento de diversas proteínas cliente fundamentais para a manutenção da homeostase celular ((BOSE et al., 1996; PRATT; TOFT, 2003; ZHAO; HOURY, 2005; BROWN et al., 2007; SCHOPF et al., 2017). Uma classe de moléculas chamadas conjuntamente de “inibidores da Hsp90” tem sido amplamente estudada, principalmente no controle do câncer, por se ligar a diferentes porções da Hsp90, inibindo a sua

atividade e, dessa forma, causando alteração no funcionamento celular (BROWN et al., 2007; LI et al., 2012; SCHOPF et al., 2017). Estudos anteriores mostraram o efeito antiparasitário dos inibidores da Hsp90 sob diferentes espécies de parasitos, levando a uma parada no ciclo celular, causando deformações nos parasitos e, por fim, levando a sua morte (LI et al., 2009). Foi demonstrado por nosso grupo que o inibidor da Hsp90, 17-AAG, causa a morte de *Leishmania amazonensis* e *L. braziliensis*, *in vitro*, de forma tempo e doses dependentes, em concentrações que não são tóxicas para a célula hospedeira (PETERSEN et al., 2012a; SANTOS et al., 2014a). Da mesma forma, demosstramos previamente que o tratamento *in vivo* de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* com o 17-AAG leva à diminuição da lesão causada pela infecção, além da diminuição da carga parasitária na orelha (SANTOS et al., 2014a). Entretanto, nesse estudo, não foi observada redução da carga parasitária no linfonodo dos animais tratados, o que poderia causar recidiva da infecção após finalização do tratamento (SANTOS et al., 2014a). Dessa forma, começamos a investigar o potencial leishmanicida do 17-DMAG, um inibidor da Hsp90, análogo ao 17-AAG e hidrossolúvel, com melhores propriedades farmacocinéticas (WHITESELL; LIN, 2012a; MELLATYAR et al., 2018). Em trabalho recentemente publicado, demosstramos que o 17-DMAG é eficaz no tratamento *in vitro* de células THP-1 infectadas por *L. amazonensis* em concentrações não tóxicas para a célula hospedeira (PALMA et al., 2019). Da mesma forma, em experimentos ainda não publicados, observamos que o 17-DMAG é eficaz no controle da infecção causada por *L. braziliensis* *in vitro* e *in vivo*, além de causar a diminuição da produção de citocinas próinflamatórias e reduzir a carga parasitária, tanto na orelha, quanto no linfonodo dos animais infectados e tratados. Entretanto, foi observado que, em tempos mais prolongados de tratamento, os camundongos BALB/c exibiram sinais de toxicidade à molécula (dados não publicados). Assim, na presente tese, objetivamos avaliar a eficácia do 17-DMAG no controle da infecção *in vitro* e *in vivo*, com aplicação intraperitoneal com tempos mais curtos, ou com aplicação por via tópica, diretamente sobre as lesões causadas pela infecção, após a incorporação do fármaco em base semissólida. Acreditamos que o desenvolvimento de um medicamento aplicado por via tópica sobre a lesão causada pela infecção por *Leishmania* levará a uma maior aderência ao tratamento por parte dos pacientes, uma vez que eles não precisarão se deslocar para unidades de saúde durante o tratamento. Adicionalmente, objetivamos produzir e caracterizar nanopartículas poliméricas contendo o 17-DMAG para permitir a liberação controlada deste composto, avaliando-se futuramente o seu efeito no controle da infecção e a diminuição da ocorrência de toxicidade observada. Ambas as inovações terapêuticas visam melhorar, a médio e longo prazos, o panorama atual de quimioterápicos aplicados para casos de leishmaniose cutânea.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um espectro de doenças tropicais parasitárias, consideradas negligenciadas, que podem ser causadas, em seres humanos, por mais de 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania* (MASMOUDI et al., 2013; AKHOUNDI et al., 2016; WHO, 2021). Clinicamente, as leishmanioses podem ser divididas em três formas principais, (i) a leishmaniose cutânea (LC), que é a forma mais comumente encontrada, (ii) a leishmaniose visceral (LV), que atinge órgãos internos, é a forma mais severa da doença e pode vir a ser fatal se não tratada, e (iii) a leishmaniose mucocutânea (LMC), que é a forma mais debilitante (WHO, 2021). A apresentação dos sinais clínicos da doença, bem como a persistência ou controle da infecção, depende da espécie e virulência do parasito infectante e do sistema imune do hospedeiro, o qual poderá ser influenciado por outros fatores como condições ambientais, sociais e econômicas, além da presença de coinfeções (KAYE; SCOTT 2011; ESPUELAS et al., 2016; ORYAN; AKBARI, 2016; SRIVASTAVA et al., 2016; VERAS; DE MENEZES, 2016; WHO, 2021). Entretanto, considerando que a maioria das pessoas infectadas pelo parasito não desenvolvem sintomas ao longo da vida, é importante ressaltar que o termo “leishmanioses” se refere apenas à doença causada pela infecção e não à presença do parasito no organismo do hospedeiro (WHO, 2021).

A LV é causada, principalmente, pelas espécies *L. donovani* ou *L. infantum* no Velho Mundo e por *L. infantum* no Novo Mundo e apresenta como sintomas clínicos principais pancitopenia, esplenomegalia, hepatomegalia, perda de peso, febre persistente e anemia (KAYE; SCOTT 2011; BURZA et al., 2018; MEIRA; GEDAMU, 2019). A LC é causada, principalmente, pelas espécies *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* no Velho Mundo e por *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. mexicana* no Novo Mundo e, apesar de não fatal, apresenta como sintomas lesões na pele que podem evoluir com o tempo ou se espalhar, levando à morbidade, estigmatização social, efeitos psicológicos e ao absenteísmo dos pacientes acometidos, o que pode interferir na qualidade de vida desses indivíduos (KAYE; SCOTT 2011; MASMOUDI et al., 2013; AKHOUNDI et al., 2016a; BURZA et al., 2018). Essas lesões podem (i) permanecer como pequenos nódulos ou pápulas no local da inoculação do vetor ou progredir, ainda no mesmo local, para lesões ulceradas, caracterizando a leishmaniose cutânea localizada (LCL), (ii) apresentar aspecto nodular e não ulcerado de maneira disseminada, difundindo-se por via linfática, caracterizando a leishmaniose cutânea

difusa (LCD), (iii) apresentar aspecto papular e ulcerado de maneira disseminada, propagando-se por via sanguínea, caracterizando a leishmaniose cutânea disseminada (LD), ou (iv) sofrer metástases e causar lesões secundárias em cavidades naso-orais e/ou faríngeas, culminando na destruição desses tecidos, caracterizando a leishmaniose mucocutânea (LMC) (Carvalho et al., 1994; TORRES-GUERRERO et al., 2017; MEIRA; GEDAMU, 2019). Existe ainda uma quarta forma clínica possível para a LC, a chamada leishmaniose dermal pós-calazar (LDPK), caracterizada por erupções cutâneas maculares, maculopapulares e nodulares que podem surgir em alguns pacientes com LV, após a sua recuperação (ZIJLSTRA et al., 2003; ESPUELAS et al., 2016; WHO, 2021).

As leishmanioses são endêmicas em 98 países, dos quais 89 são considerados endêmicos para a LC, 79 para a LV e 71 para ambas as formas clínicas (WHO, 2021). Além disso, estima-se que haja mais de um bilhão de pessoas vivendo em áreas endêmicas, sob risco de infecção (WHO, 2021). Com uma incidência anual de mais de 1 milhão de novos casos, mais de 90% dos casos de LC reportados concentram-se na região do Mediterrâneo Oriental e nas Américas, dos quais apenas sete países (Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Iraque, Paquistão e Síria) concentram mais de 70% do total de casos globais (WHO, 2021). A LV possui uma incidência de cerca de 30 mil novos casos por ano e concentra 83% dos casos reportados em cinco países: Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2021). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a maioria dos casos de LV reportados em 2018 ocorreram na Ásia, África e América (TORRES-GUERRERO et al., 2017, WHO, 2021). Na região das Américas, no ano de 2018, 17 dos 18 países reportaram casos de LC e LM e 12 países reportaram casos de LV, dos quais quase 36% e 97%, respectivamente, ocorreram no Brasil (PAHO, 2016). Segundo o Ministério da Saúde (MS), em 2018 o Brasil registrou 3.466 casos de LV e 16.342 casos de LC, dos quais aproximadamente 70% concentraram-se nas regiões Norte e Nordeste para ambas as formas clínicas (BRASIL, 2019). Em 2018, a Bahia teve 238 casos de LV, sendo o terceiro maior número do Nordeste e o sexto no *ranking* do Brasil, e 1.840 casos de LC e/ou LMC sendo, para estas formas clínicas, o maior número do Nordeste e o segundo no *ranking* do Brasil (BRASIL, 2019). Em conjunto, esses dados colocam as leishmanioses como um problema de saúde pública no BRASIL e no mundo (BRASIL, 2019; WHO, 2021).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos para seres humanos e outros vertebrados através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas, um inseto vetor de aproximadamente 2 ou 3 mm, enquanto estas realizam o repasto sanguíneo (KAYE; SCOTT, 2011; VERAS; DE MENEZES, 2016; WHO, 2021). Durante a sua alimentação, os flebótomos regurgitam formas promastigotas metacíclicas do parasito na pele do hospedeiro vertebrado,

que são fagocitados por células do sistema imunológico do hospedeiro como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos. Estas últimas células são as principais hospedeiras de *Leishmania*. Após a fagocitose por macrófagos, os parasitos passam por uma série de modificações de expressão gênica e estruturais, alterando a sua forma de promastigotas para amastigotas no interior dos vacúolos parasitóforos. As formas amastigotas são capazes de se multiplicar no interior desses macrófagos, podendo vir a romper estas células e infectar novas células. Quando uma nova fêmea de flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, ingere, junto com o sangue, células infectadas. No intestino dos flebotomíneos, os parasitos se multiplicam após retornarem a sua forma promastigota, por meio de modificações de expressão gênica e estruturais. Os parasitos, então, migram para a porção anterior do trato digestório do inseto vetor, podendo dar continuidade ao ciclo, após ser regurgitado durante o repasto sanguíneo na derme do hospedeiro mamífero (KAYE; SCOTT, 2011; VERAS; DE MENEZES, 2016; WHO, 2021). Este ciclo digenético do parasito *Leishmania* é mostrado na figura 1.

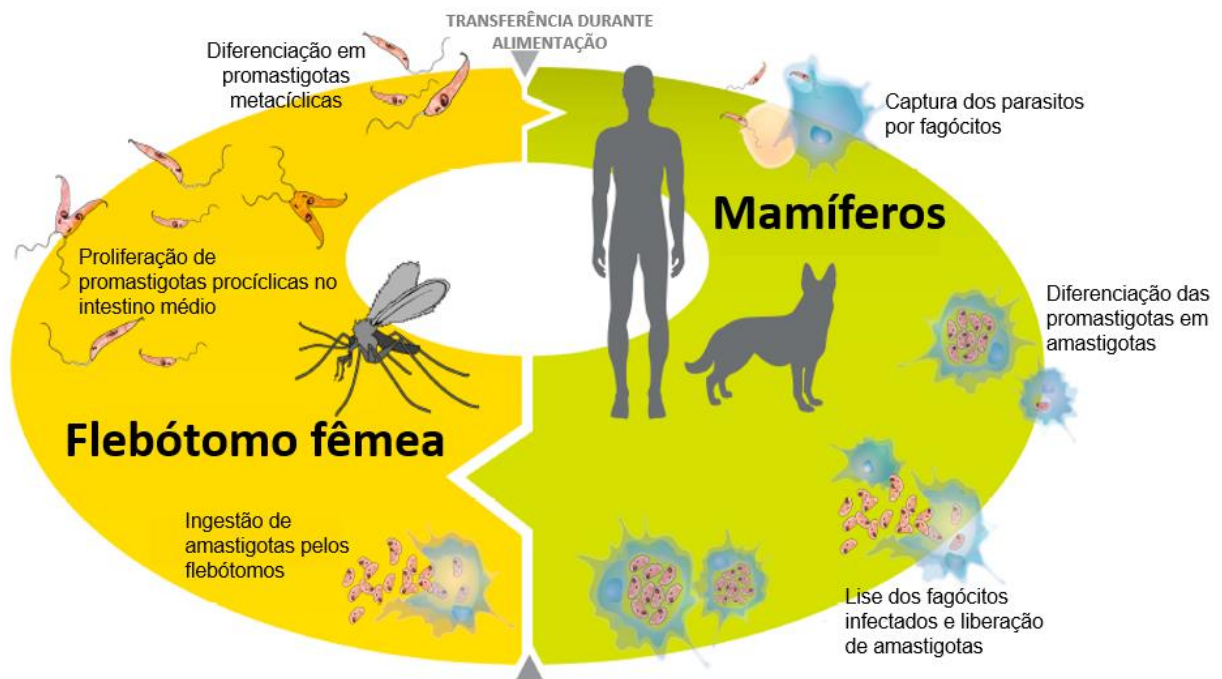


Figura 1 - Ciclo digenético de *Leishmania* sp.
Fonte: Adaptado de (VERAS; DE MENEZES, 2016).

Alguns fatores podem contribuir para o risco de contágio ou de piora dos sinais clínicos das leishmanioses, dentre eles as mudanças ambientais e/ou climáticas, condições socioeconômicas e coinfeção com HIV (WHO, 2021). Diante deste cenário, é de suma

importância o tratamento das leishmanioses como uma das principais medidas de controle da disseminação da doença.

2.2 TRATAMENTOS ATUAIS

Atualmente, o tratamento indicado para leishmanioses depende da espécie causadora da doença, dos sintomas clínicos apresentados e de características inerentes ao organismo do paciente, como presença de gravidez ou imunossupressão (WHO, 2021). Além disso, os tratamentos atualmente utilizados não são capazes de fornecer a cura parasitológica nos pacientes acometidos e os parasitos que permanecem no corpo humano podem levar à recidiva da doença em situações de imunossupressão (COPELAND; ARONSON, 2015; WHO, 2021). Ademais, uma vez que a maioria dos medicamentos são injetáveis, a principal dificuldade no tratamento é a necessidade de administração por profissionais experientes, além da dor causada pela injeção (WHO, 2021).

Em 1912 foram descobertos os primeiros antimoniais com potencial leishmanicida, os trivalentes (ANDRADE-NETO et al., 2018). Após estes primeiros, os antimoniais pentavalentes, menos tóxicos que os trivalentes, foram descobertos nos anos de 1920 e permanecem atualmente como sendo a droga de primeira escolha no tratamento das leishmanioses no BRASIL (ANDRADE-NETO et al., 2018; DE MENEZES et al., 2015; FREZARD et al., 2009; MARSDEN, 1985; MEYERHOFF, 1999). A forma menos tóxica deste composto foi introduzida como terapia das leishmanioses nos anos de 1940 e, ainda hoje, não se sabe exatamente o seu mecanismo de ação (FRÉZARD et al., 2009). Essa incógnita permanece devido, principalmente, ao estado amorfo dos principais compostos utilizados na clínica (Pentostam® e Glucantime®), que dificulta o estudo das suas interações no ambiente intracelular (FRÉZARD et al., 2009). Duas principais abordagens sugerem que o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes pode acontecer (i) após a conversão, dentro da célula, do antimonial pentavalente em antimonial trivalente que, por ser mais ativo e mais tóxico, conseguiria induzir a apoptose de células infectadas ou (ii) por atividade leishmanicida direta, após inibição da atividade da DNA topoisomerase do tipo I nos parasitos de *Leishmania*, ocasionando a sua morte (RATH et al., 2003; FRÉZARD et al., 2009). A utilização desses medicamentos como quimioterápicos possuem algumas limitações que incluem (i) a forma de administração invasiva (parenteral – intravenosa, intramuscular ou intralinfática), que ocasionam dores musculares no local da injeção, (ii) longos ciclos de tratamento (diariamente por, pelo menos, três semanas) e (iii) reações adversas sistêmicas como náuseas, vômitos,

fraqueza, mialgia, cólicas, diarreia e que, com o acúmulo do composto nos órgãos, pode causar pancreatite, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade (DE MENEZES et al., 2015; FRÉZARD et al., 2009). Outra limitação do uso dos antimoniais pentavalentes se deve ao surgimento de cepas resistentes em regiões onde a forma visceral da doença é endêmica, como na cidade de Bihar, Índia (DE MENEZES et al., 2015; SUNDAR, 2002).

A anfotericina B, apesar da sua alta toxicidade, é o segundo medicamento mais utilizado no tratamento das leishmanioses, sendo frequentemente utilizado também em casos de falhas terapêuticas ou de resistência aos antimoniais pentavalentes (BRASIL, 2015; CROFT et al., 2006; DE MENEZES et al., 2015; MEYERHOFF, 1999; SEIFERT, 2011). Essa molécula é um antibiótico poliênico, isolado inicialmente em 1955 e aprovada para utilização como antifúngico pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) em 1965, demonstrando também alto poder leishmanicida (FILIPPIN; SOUZA, 2006; SEIFERT, 2011). O mecanismo de ação desta droga se dá através da interação específica com o ergosterol presente na membrana da *Leishmania*, o que leva à formação de poros, perda da permeabilidade seletiva e, conseqüentemente, à morte do parasito (FILIPPIN; SOUZA, 2006; SEIFERT, 2011; CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015). Apesar do alto potencial leishmanicida, esta molécula apresenta também algumas limitações como a via de administração intravenosa, a ocorrência de reações adversas como rigor, calafrios, hipocalemia, hemólise e febre, além da alta toxicidade, principalmente renal, danos ao fígado e miocardite (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015; DE MENEZES et al., 2015; MEYERHOFF, 1999; SUNDAR et al., 2004). Para superar a limitação das reações adversas causadas pelo tratamento e melhorar a farmacocinética e biodisponibilidade desta droga, uma formulação lipossomal da anfotericina B foi aprovada para uso no tratamento da leishmaniose em 1997 (DE MENEZES et al., 2015; MEYERHOFF, 1999). Essa formulação lipossomal, chamada de AmBisome®, diminui a toxicidade da Anfotericina B e aumenta a sua eficácia em quase 100% dos casos (DE MENEZES et al., 2015; SUNDAR et al., 2004). Entretanto, alguns efeitos colaterais raros e reações adversas ainda são relatados após a utilização de AmBisome® como rigores e calafrios leves durante a aplicação, urticária e nefrotoxicidade leves (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015; DE MENEZES et al., 2015). Ademais, o elevado custo e a instabilidade da formulação em altas temperaturas também constituem limitações para utilização dessa formulação em alguns países, principalmente naqueles em desenvolvimento, onde o número de casos é elevado (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015; CROFT et al., 2006; DE MENEZES et al., 2015; SEIFERT, 2011).

Outras drogas comumente utilizadas no tratamento das leishmanioses, como droga única ou associada aos medicamentos de primeira linha, incluem a pentamidina, a paromomicina e a

miltefosina (DE MENEZES et al., 2015; SANTOS et al., 2008). A pentamidina, um derivado sintético de diamidina, foi descoberta em estudos por drogas para hipoglicemia e apresenta a sua eficácia contra *Leishmania* variável, dependendo da espécie causadora da doença, ocasionando também efeitos adversos que incluem miocardite, pancreatite, que eleva as taxas de glicemia e pode causar diabetes, hipotensão, taquicardia e toxicidade renal, que podem evoluir para óbito (ANDRADE-NETO et al., 2018; DE MENEZES et al., 2015; RATH et al., 2003). A paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, é um medicamento que pode ser aplicado por via intramuscular ou tópica, é uma droga de baixo custo que apresenta alta eficácia, mas leva ao aparecimento de ototoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (ANDRADE-NETO et al., 2018; DE MENEZES et al., 2015; RATH et al., 2003; SEIFERT, 2011). Além disso, em monoterapia, é relatada a ocorrência de resistência ao tratamento com a paromomicina (ANDRADE-NETO et al., 2018). A miltefosina, droga alquilfosfolipídica inicialmente desenvolvida como anticâncer, é o único medicamento não invasivo aplicado atualmente no tratamento das leishmanioses (RATH et al., 2003; SEIFERT, 2011; ANDRADE-NETO et al., 2018). Este fármaco apresenta uma alta eficácia, sendo o primeiro medicamento de apresentação oral (RATH et al., 2003; SEIFERT, 2011; ANDRADE-NETO et al., 2018). Adicionalmente, foi demonstrado em um ensaio clínico que, comparada aos antimoniais pentavalentes, a miltefosina apresenta maior eficácia no tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, apresentando um menor tempo de tratamento necessário para cicatrização das lesões (MACHADO et al., 2021). Entretanto, o uso de Miltefosina pode causar reações adversas como vômitos, diarreia, toxicidade nos rins e fígado, além de apresentar potencial teratogênico, o que impede a sua utilização em gestantes (ANDRADE-NETO et al., 2018; DE MENEZES et al., 2015; MASMOUDI et al., 2013b; SEIFERT, 2011). Além disso, esse fármaco pode ter o custo elevado em algumas regiões (DE MENEZES et al., 2015).

O conjunto de limitações apresentados pelos quimioterápicos atualmente utilizados no tratamento das leishmanioses demonstram a necessidade da busca por novos fármacos que sejam, a médio e longo prazos, mais eficazes, menos tóxicos e de baixo custo para os pacientes (DE MENEZES et al., 2015). Os esforços para melhorar este cenário têm se concentrado (i) no aumento da segurança e eficácia dos tratamentos com drogas conhecidamente leishmanicidas, (ii) na análise de novas combinações entre drogas ou novos protocolos terapêuticos, (iii) na busca por novos alvos terapêuticos no parasito ou na célula hospedeira e melhor compreensão da interação parasito-hospedeiro, (iv) na utilização de drogas desenhadas para outras doenças

para esta nova finalidade (reposição) ou (v) no desenvolvimento de sistemas de entrega mais eficazes (DE MENEZES et al., 2015; FRÉZARD et al., 2009).

2.3 NOVOS TRATAMENTOS

Segundo Copeland e Aronson (2015) existe um baixo incentivo financeiro para o desenvolvimento de tratamentos eficazes para as leishmanioses. Apesar disso, devido ao panorama atual com elevado número de casos e com as limitações apresentadas pelos quimioterápicos utilizados, diversos grupos de pesquisa no mundo, com auxílio principalmente de organizações governamentais e sem fins lucrativos, têm se debruçado sobre a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos e/ou ajustes de esquemas terapêuticos que sejam mais eficazes e menos tóxicos aos pacientes com leishmanioses (COPELAND; ARONSON, 2015; DE MENEZES et al., 2015). Novas drogas podem ser desenvolvidas a partir de microorganismos, animais ou plantas, desenhos utilizando ferramentas de bioinformática, alterações moleculares para elaboração de drogas sintéticas, entre outros (SANTOS et al., 2008). Além disso, drogas em fases de estudo clínico ou já utilizadas como antiparasitários, antibióticos, antifúngicos, anticâncer, antidepressivos, anti-hipertensivos, entre outros, podem ser cooptadas e redirecionadas para avaliação do seu potencial leishmanicida – reposição de fármacos (JAIN; JAIN, 2013; ANDRADE-NETO et al., 2018).

Uma das principais abordagens utilizadas para melhorar o tratamento das leishmanioses é a combinação entre os tratamentos atualmente utilizados ou com outros compostos e, com o sinergismo observado entre as diferentes moléculas, é observada a manutenção da eficácia do tratamento e vantagens que incluem (i) a redução das doses individuais, (ii) atividade sinérgica ou aditiva entre as drogas, (iii) a diminuição dos efeitos colaterais e da toxicidade, (iv) a redução dos custos, (v) a redução de casos de resistência às drogas e (vi) a redução no tempo de tratamento (DE MENEZES et al., 2015; JAIN; JAIN, 2013; SUNDAR et al., 2011; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015; SUNDAR; SINGH, 2018; VAN GRIENSVEN et al., 2010). Esta última vantagem é particularmente importante pois, uma vez que longos períodos são necessários em algumas monoterapias (como miltefosina e paromomicina), isso pode causar o abandono do tratamento por parte dos pacientes e, como consequência, levar ao surgimento de cepas resistentes do parasito (SUNDAR et al., 2011). Na década de 80, foi mostrado que o tratamento combinado *in vivo* entre um antimônio pentavalente (Glucantime®) e um imunostimulador (dipeptídeo muramil) foi mais eficaz no controle da infecção de camundongos BALB/c e C57/BL6 por *L. donovani*, que os tratamentos em monoterapia desses

agentes, além da capacidade de prevenir a letalidade causada pela infecção em hamsters (ADINOLFI et al., 1985). Outro estudo *in vivo* mostrou que a atividade da miltefosina foi potencializada quando associada com a anfotericina B ou com paromomicina, o que poderia ser aplicado em casos de resistência às drogas de primeira escolha no tratamento de leishmaniose visceral (SEIFERT and CROFT, 2006). Um ensaio clínico realizado em Bihar (Índia), onde há resistência ao tratamento com antimoniais pentavalentes, mostrou que o tratamento de leishmaniose visceral com 3,75 mg/kg de anfotericina B lipossomal (L-AmB), associado com miltefosina por 14 dias, foi tão eficaz quanto o tratamento utilizando 5 mg/kg L-AmB em monoterapia (96% e 91%, respectivamente) (SUNDAR et al., 2008). Além disso, outro ensaio clínico com leishmaniose visceral mostrou que o tratamento associado com L-AmB e miltefosina, com L-AmB e paromomicina ou com miltefosina e paromomicina apresentaram taxas de eficiência de 97%, 97% e 98%, respectivamente, tão elevadas quanto quando se utiliza apenas anfotericina B (93%) (SUNDAR et al., 2011). Adicionalmente, um ensaio clínico piloto de fase II realizado com pacientes da cidade de Corte de Pedra, uma área endêmica para leishmaniose cutânea na Bahia, mostrou que a combinação do tratamento com antimoniais pentavalentes, por via parenteral, com o tamoxifeno, um modulador do receptor de estrogênio, por via oral, causou um aumento nas taxas de cura das lesões nos pacientes, em comparação com o protocolo padrão de tratamento apenas com antimoniais pentavalentes (MACHADO et al., 2018). No geral, a associação entre esses medicamentos mostrou menos efeitos colaterais, doença menos severa e menor duração do tempo de tratamento, vantagens que, em conjunto, justificaria o uso de terapia combinada em substituição à monoterapia (DE MENEZES et al., 2015; SUNDAR et al., 2011).

Outra abordagem utilizada para superar as limitações dos tratamentos atuais é a substituição da via invasiva de administração, como intravenosa ou intramuscular, por vias não invasivas, como oral ou tópica. A miltefosina foi e permanece sendo o primeiro e único medicamento licenciado para utilização por via oral comprovadamente eficaz no tratamento para leishmanioses (KUHLENCORD et al., 1992; SINDERMAN et al., 2004). Desde 1992 foi mostrado que o seu uso, por via, oral leva a uma maior redução da carga parasitária no baço e medula óssea, que o tratamento com antimonial pentavalente aplicado por via subcutânea (KUHLENCORD et al., 1992; SINDERMAN et al., 2004). Outras pesquisas têm sido realizadas investigando a eficácia da aplicação oral ou tópica de outros compostos. MONZOTE et al. (2009) demonstraram que camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* apresentaram lesões menores quando tratados, por via oral, com 150 mg/kg de óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz), em comparação com os tratamentos com

Glucantime®, anfotericina B ou pentamidina (MONZOTE et al., 2009). Vale ressaltar que, tanto para a via oral quanto para a via tópica, o tratamento pode ser realizado isolado ou em associação com um tratamento sistêmico (BRITO et al., 2017).

Para LC, medicamentos com aplicação por via tópica têm sido um dos principais focos de pesquisas para tratamentos alternativos por apresentar vantagens como facilidade de administração, poucas reações adversas e boa relação custo/benefício, principalmente quando considerado que os casos de LC ocorrem mais frequentemente em áreas com pouca assistência médica (GONÇALVES et al., 2005; BRUGUÉS et al., 2015). A paromomicina, por exemplo, é um medicamento que apresenta potencial para aplicação por via tópica nas lesões causadas na LC mas que, devido ao seu alto peso molecular, apresenta uma baixa penetração cutânea e, conseqüentemente, baixa atividade quando aplicada na lesão sem um veículo adequado (GONÇALVES et al., 2005; BRUGUÉS et al., 2015). Entretanto, quando em base semissólida de gel e aplicada por via tópica, a paromomicina foi mais eficaz que os antimoniais pentavalentes aplicados por via parenteral, no controle da infecção de camundongos BALB/c por *L. amazonensis* (GONÇALVES et al., 2005). Além disso, Willie et al. (2012) demonstraram que o fexinidazol, uma droga em fase I de ensaio clínico no controle de tripanossomíase africana, quando aplicado por via oral, reduziu de forma dose-dependente a carga parasitária em modelo murino de leishmaniose visceral, camundongos BALB/c infectados por *L. donovani*, de forma similar ao tratamento com miltefosina e melhor que o tratamento com o antimonial pentavalente Pentostam® (WYLLIE et al., 2012). Outro composto, a oleilfosfocolina, quando aplicada por via oral, mostrou eficácia no controle da infecção de camundongos BALB/c por *L. major*, comparável à anfotericina B, enquanto que o mesmo efeito não foi observado no tratamento com miltefosina ou fluconazol (FORTIN et al., 2014). Investigações acerca da eficácia de tratamentos tópicos mostram que a maioria deles apresenta segurança e eficácia, com altas taxas de cura, poucos relatos de efeitos colaterais (sendo a maioria leves, como dor ou irritação local, eritema, prurido, edema e hiper ou hipopigmentação) e baixas taxas de recorrência ou recidiva da lesão (MASMOUDI et al., 2013; NASSIF et al., 2017a).

É importante ressaltar que os tratamentos tópicos propostos atualmente não se restringem à incorporação dos fármacos em bases semissólidas de aplicação (como pomada e gel), mas incluem também a aplicação de medicamentos intralesional, a aplicação de substâncias diversas (como óxido nítrico, morfina, extratos de plantas e mel), fitoterapia, termoterapia, crioterapia, eletroterapia, laser de CO₂, terapia fotodinâmica e, em caso de lesão única e isolada, cirurgia de excisão ou criocirurgia (ALAVI-NAINI et al., 2012; MASMOUDI

et al., 2013; SUNDAR and CHAKRAVARTY, 2015; NASSIF et al., 2017a). Essas terapias locais podem ser aplicadas de forma isolada ou associadas entre si pois foi demonstrado, por exemplo, que a combinação da aplicação intralésional de antimoniais pentavalentes com a crioterapia foi mais eficaz que quando utilizado apenas o primeiro tipo de tratamento (81,8% *versus* 53,3%, respectivamente) (BRITO et al., 2017). Entretanto, acreditamos que, mantendo-se a eficácia e menos efeitos colaterais, como dor, o tratamento com fármacos em bases semissólidas para aplicação individual, seria o melhor avanço para terapia tópica em casos de LC.

A busca por novos alvos terapêuticos, no parasito ou na célula hospedeira, bem como a melhor compreensão da interação parasito-hospedeiro também constituem uma estratégia para melhorar o cenário de tratamentos aplicados para casos de leishmaniose (DE MENEZES et al., 2015). Essa compreensão pode fornecer importantes dados acerca dos alvos intracelulares que podem ser quimicamente modulados por drogas, promovendo ou auxiliando o controle da infecção (DE MENEZES et al., 2015). Após a observação de que macrófagos de camundongos CBA são capazes de controlar a infecção por *L. major*, mas são susceptíveis à infecção por *L. amazonensis*, *in vitro* e *in vivo*, uma análise proteômica foi realizada e observou-se que essa diferença de controle ou persistência da infecção em hospedeiros da mesma espécie e com o mesmo *background* genético poderia estar relacionada com o perfil de expressão de proteínas pelas células hospedeiras (GOMES et al., 2003; LEMOS DE SOUZA et al., 2000; DE MENEZES et al., 2013; VERAS DE MENEZES, 2016). Uma das proteínas identificadas estando diferentemente expressa na infecção entre as duas espécies de *Leishmania* foi o Fator de Transcrição Induzível por Hipóxia 1 α (HIF-1 α , do inglês *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) que, portanto, poderia exercer algum papel nessa diferença de resposta à infecção (DE MENEZES et al., 2013; VERAS; DE MENEZES, 2016). Pelo fato de o HIF-1 α ser uma das proteínas cliente da proteína de choque térmico 90 (Hsp90, do inglês *Heat shock protein*) e devido a algumas moléculas com potencial anticâncer que atuam sobre HIF-1 α agirem, na verdade, sobre a Hsp90, nosso grupo de pesquisa direcionou os seus esforços para a investigação do potencial leishmanicida decorrente da modulação da Hsp90, através do uso de seus inibidores (DE MENEZES et al., 2013; DE MENEZES et al., 2015; VERAS DE MENEZES, 2016).

2.4 HEAT SHOCK PROTEIN 90 (Hsp90)

As proteínas de choque térmico (HSPs) foram descritas pela primeira vez na década de 60 após ser observado, acidentalmente, que o aumento da temperatura de incubação de células de *Drosophila* levou ao aumento da transcrição de genes que não estavam ativados em condições normais de incubação (ERLEJMAN et al., 2014a). Posteriormente, outros estudos mostraram que a expressão desses genes específicos é modulada como resposta não só à modificação da temperatura mas também a outros estresses aos quais as células podem estar expostas como instabilidade gênica, hipóxia, disponibilidade de nutrientes, pressão evolutiva, estímulos de agentes químicos (como drogas) e condições patológicas (PRATT; TOFT, 2003; ALBERTS et al., 2010; ERLEJMAN et al., 2014a). Assim, as HSPs são definidas como o conjunto de proteínas que, como resposta ao estresse celular, tem a sua expressão aumentada após a ativação de genes específicos, alterando, conseqüentemente, o controle da produção de outras proteínas (as chamadas “proteínas cliente”) até retornar ao estágio de homeostasia celular (ERLEJMAN et al., 2014a). Essa modulação externa da Hsp90 é uma comprovação epigenética de que alterações ambientais podem interferir na expressão gênica dos organismos (ZHAO; HOURY, 2005; ERLEJMAN et al., 2014a).

O conceito de “chaperonas moleculares” começou a ser definido entre o final da década de 1980 e início da década de 1990 e hoje é amplamente aceito como sendo um conjunto de proteínas ubíquas e altamente conservadas evolutivamente, que reconhecem proteínas no formato não nativo e exercem a função de mediar o dobramento, montagem ou desmontagem apropriados destas em estruturas oligoméricas, ou auxiliam nesses processos, prevenindo a formação pós-traducional de complexos oligoméricos com estruturas incorretas, inativos e não funcionais, além de evitar interações intra e inter moleculares, sem fazer parte da estrutura molecular final das proteínas formadas (ELLIS et al., 1989; ELLIS, 1990; IVANIUSHINA et al., 1991; BUCHNER, 1999; ZHAO; HOURY, 2005; ALBERTS et al., 2010). As chaperonas moleculares são componentes fundamentais da maquinaria de “controle de qualidade” celular por ser capaz de evitar que as proteínas cliente sofram desestabilização, desnaturação ou agregação, tanto em situações de estresse quanto em condições de homeostase ((BOSE et al., 1996; ZHAO; HOURY, 2005; ERLEJMAN et al., 2014a; SCHOPF et al., 2017). As proteínas de choque térmico são as principais chaperonas moleculares e tem importante papel na manutenção da homeostase celular, sendo os termos “chaperonas” e “proteínas de choque térmico” tão intrinsicamente relacionados que podem, algumas vezes, ser utilizados como sinônimos (ALBERTS et al., 2010; ERLEJMAN et al., 2014).

HSP60, HSP70, Hsp90, HSP100 e as chaperonas da subfamília HSP33 são os principais membros da superfamília das proteínas de choque térmico (ERLEJMAN et al., 2014). Destas, a Hsp90 é uma chaperona constitutiva, bastante conservada evolutivamente e pode ser encontrada em quase todos os organismos vivos, como eubactérias, fungos e todos os organismos multicelulares, exceto no domínio Archea (BUCHNER, 1999; PRATT; TOFT, 2003; ZHAO; HOURY, 2005; BROWN et al., 2007; ERLEJMAN et al., 2014a). Essa proteína é uma das mais abundantes chaperonas moleculares em células eucarióticas e participa da regulação do dobramento de proteínas participantes de diferentes vias de transdução de sinais, estando envolvida, portanto, em diversas funções celulares como desenvolvimento celular normal, apoptose, proliferação, metástase, regulação da transcrição, angiogênese, adaptação, diferenciação, funcionamento do metabolismo e processos evolutivos, o que, em conjunto, demonstra a sua importância na manutenção e sobrevivência celular ((BOSE et al., 1996; BUCHNER, 1999; ZHAO; HOURY, 2005; BROWN et al., 2007; ERLEJMAN et al., 2014a). A Hsp90 é necessária para a viabilidade de eucariotos e, em homeostasia celular, é expressa em altos níveis no citosol como dímero obrigatório constitutivo, correspondendo a 1-2% do total de proteínas solúveis citoplasmáticas enquanto que, sob condições de estresse, essa expressão pode estar aumentada em até dez vezes, chegando a 7% em células cancerígenas e até 10% das proteínas totais em condições de estresse ((BOSE et al., 1996; BUCHNER, 1999; PRATT; TOFT, 2003; BROWN et al., 2007; ERLEJMAN et al., 2014a). Apesar de ser mais frequentemente encontrada no citoplasma, essa proteína também pode ser localizada em outras organelas, como núcleo, retículo endoplasmático e cloroplastos (BUCHNER, 1999; ERLEJMAN et al., 2014a). Na maioria dos seres vivos, existem duas isoformas da Hsp90 com 78-85% de similaridade presentes no citosol das células, a Hsp90 α (forma induzível por estresse) e a Hsp90 β (forma constitutiva) e, nos seres humanos, existem dois membros adicionais com funções mais especializadas e com baixos níveis de expressão: o TRAP1, localizado na mitocôndria e o Grp94, encontrado no lúmen do retículo endoplasmático (BUCHNER, 1999; ZHAO; HOURY, 2005; ERLEJMAN et al., 2014a). Outros homólogos foram identificados, menos frequentemente, em diferentes organelas ou compartimentos celulares, como HtpG no citoplasma de bactérias, Hsp83 no citoplasma de fungos, e cpHSP82 nos cloroplastos de plantas (BUCHNER, 1999; WEGELE; BUCHNER, 2004; ECHTENKAMP; FREEMAN, 2012).

Estruturalmente, a Hsp90 é formada por três domínios altamente conservados: (i) o domínio N terminal, responsável pela ligação e hidrólise do ATP (atividade ATPásica), (ii) o domínio intermediário proteolítico central (ou domínio médio), envolvido na interface da

ligação entre a Hsp90 e proteínas cliente, auxiliando o seu dobramento, e (iii) o domínio C terminal, que facilita a homodimerização e é independente de ATP (BUCHNER, 1999; PRATT; TOFT, 2003; ZHAO; HOURY, 2005; BROWN et al., 2007). A região N-terminal interage também com peptídeos e proteínas não dobradas mas, é a ligação com o ATP que induz a modificação da proteína para um estado de baixa afinidade com o substrato, o que evita a interação com outras proteínas cliente durante o dobramento de uma delas (BUCHNER, 1999). A hidrólise do ATP durante a atividade ATPásica causa uma mudança estrutural na Hsp90 que é fundamental para a induzir a mudança conformacional da proteína cliente (PRATT; TOFT, 2003). Entretanto, o domínio C-terminal também é essencial para o funcionamento da proteína, pois o seu truncamento impede a habilidade da proteína de hidrolisar o ATP, indicando que a dimerização da proteína é essencial para o seu funcionamento (PRATT; TOFT, 2003; ZHAO; HOURY, 2005; BROWN et al., 2007). Em eucariotos, a Hsp90 apresenta também uma pequena região intermediária altamente carregada e de tamanho variável entre os organismos que conecta o domínio intermediário ao domínio N-terminal e acredita-se ser responsável pela flexibilidade da proteína e pela regulação da atividade do domínio N-terminal (BUCHNER, 1999; PRATT; TOFT, 2003; ZHAO; HOURY, 2005; BROWN et al., 2007). É importante ressaltar que, além da função de enovelamento das proteínas cliente, a Hsp90 exerce também as funções de acoplar complexos multiproteicos e unir um ligante ao seu alvo ou receptor (SCHOPF et al., 2017). Essa proteína é encontrada no citosol de eucariotos como um dímero alongado, que se conecta através das regiões C-terminal opostas às regiões N-terminal (BUCHNER, 1999; BROWN et al., 2007). Na ausência de um nucleotídeo ligado ao domínio N-terminal, o homodímero da Hsp90 se mantém em um estado conformacional “aberto” ou “relaxado”, o que facilita a ligação com proteínas cliente, enquanto que, em diferentes condições de homeostasia ou estresse celular ocorre a ligação com uma molécula de ATP, que ocasiona uma transformação na estrutura desta chaperona, onde os domínios N-terminal do dímero se juntam transitoriamente, assumindo o estado conformacional “fechado” ou “tenso”, que possibilita a atividade ATPásica da proteína (BUCHNER, 1999; ZHAO; HOURY, 2005; BROWN et al., 2007). A representação estrutural da Hsp90 é mostrada na figura 2.

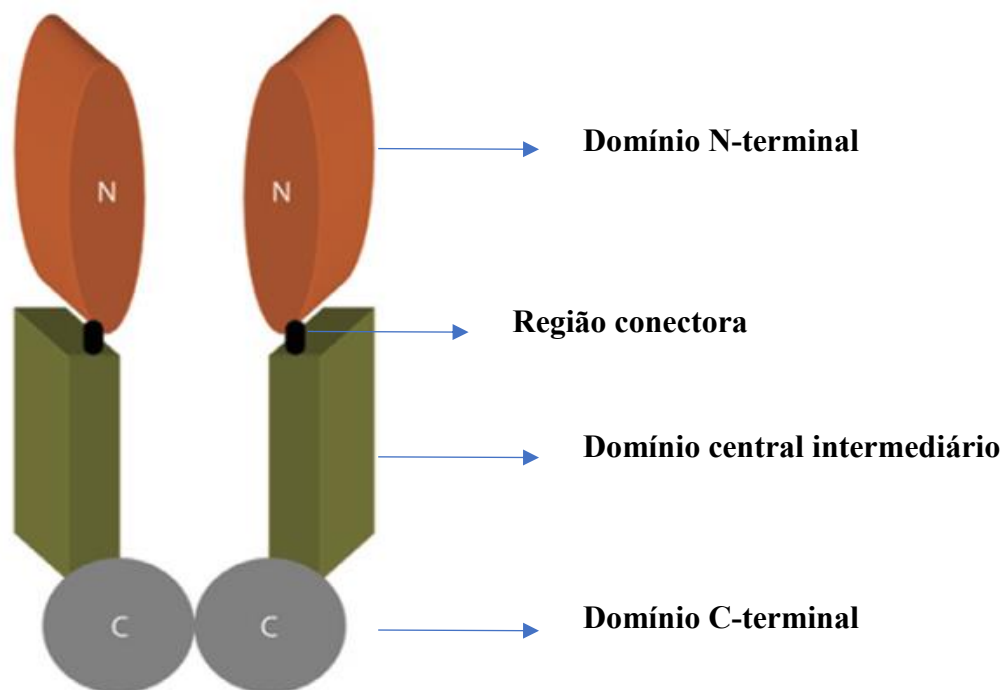


Figura 2 – Representação estrutural do homodímero formado pela chaperona Hsp90.

Fonte: Adaptado de (BROWN et al., 2007).

A Hsp90 não possui a capacidade de funcionar como uma chaperona molecular de maneira autônoma (BROWN et al., 2007). Essa proteína é responsável por uma parte importante da função exercida por um super-complexo de proteínas parceiras específicas, incluindo outras chaperonas (as chamadas co-chaperonas), onde cada componente exerce um papel funcional e atua em conjunto para promover o enovelamento correto de proteínas cliente em condições fisiológicas ou sob condições de estresse celular ((BOSE et al., 1996; PRATT; TOFT, 2003; ZHAO; HOURY, 2005; BROWN et al., 2007; SCHOPF et al., 2017). Apesar de a chaperona Hsp90 ser a plataforma central do complexo, a sincronia entre as diferentes proteínas do complexo é extremamente importante, o que pode ser comprovada pela presença das mesmas co-chaperonas em diferentes grupos de seres vivos como fungos, mamíferos e plantas (BUCHNER, 1999; ZHAO; HOURY, 2005; BROWN et al., 2007). Os estudos mostram que, dependendo do substrato em questão ou do ser vivo onde o ciclo da chaperona está acontecendo, há variação dos componentes principais que participam da maquinaria do complexo, dentre os quais são mais frequentemente descritos, em diferentes organismos: Hsp90, HSP40, HSP70, p60/Hop/Stil, Aha1, Cpr6, p48/Hip, Cdc37, Sba1, Hdj1, p23, WISp39, PP5, CHIP, Tah1/Pih1, uma das três grandes imunofilinas FKBP51, FKBP52, FKBP54, e a ciclofilina 40 (Cyp40) ((BOSE et al., 1996; BUCHNER, 1999; PRATT; TOFT, 2003; ZHAO; HOURY, 2005; BROWN et al., 2007; Li et al., 2012; ERLEJMAN et al., 2014a). Essas

proteínas podem ser divididas em duas classes funcionais generalistas: (i) proteínas que formam o esqueleto do complexo ou (ii) cofatores que auxiliam diretamente no dobramento das proteínas, além daquelas responsáveis por regular a atividade ATPásica da Hsp90 (BUCHNER, 1999; ZHAO; HOURY, 2005). Para a manutenção do funcionamento da chaperona, cinco dessas proteínas são descritas como essenciais: Hsp90, HSP70, Hop, HSP40 e p23, enquanto que as outras proteínas ainda não tiveram suas funções elucidadas ou são descritas como necessárias, mas não fundamentais para o funcionamento da maquinaria (PRATT; TOFT, 2003; ZHAO; HOURY, 2005; BROWN et al., 2007; LI et al., 2012). Além disso, dependendo da proteína cliente em dobramento, diferentes co-chaperonas podem ser cooptadas para realizar funções similares (ECHTENKAMP; FREEMAN, 2012).

Baseado nos estudos da maturação do receptor de hormônio esteroide, a maioria dos autores descrevem que o ciclo de funcionamento da maquinaria ocorre segundo as etapas a seguir (fig. 3): (a) Inicialmente, a proteína HSP40 é atraída pela proteína cliente inativa; (b) Em seguida, a chaperona HSP70 é recrutada para o complexo inicialmente formado, interagindo diretamente com a HSP40 e possibilitando a transferência da proteína cliente para a HSP70, numa reação dependente de ATP; (c) Posteriormente, esse complexo inicial é estabilizado pela proteína Hip; (d) Na sequência, a proteína Hop entra no processo de dobramento, unindo e estabilizando o complexo inicial à Hsp90, que encontra-se livre no citoplasma, na sua conformação aberta. Neste momento, forma-se o chamado “complexo mínimo”, “complexo intermediário”, “complexo núcleo” ou “esqueleto principal da maquinaria” que contém o complexo proteína cliente + HSP40 + HSP70 + Hip + Hsp90 + Hop; (e) Após essa ligação, ocorre a transferência da proteína cliente do complexo HSP40/70-Hip para a Hsp90, de forma não covalente, e a posterior dissociação das proteínas HSP40, HSP70, Hip e Hop; (f) Na sequência, ocorre a ligação transitória de uma molécula de ATP aos domínios N-terminal do dímero da Hsp90, que assume a sua conformação fechada pela união dessas regiões opostas em cada monômero; (g) Em seguida, este grande complexo é estabilizado pelas proteínas p23, na região N-terminal (que reconhece a conformação da proteína ligada ao ATP) e pela proteína PP5 na região C-terminal e, dependendo da proteína cliente em dobramento, pode haver a participação também de uma imunofilina (IF) e/ou uma ciclofilina (CF). Nesta etapa, ocorre a conversão do complexo intermediário para “complexo maduro” ou “complexo tardio”; (h) Posteriormente, ocorre a hidrólise do ATP e o consequente enovelamento e ativação da proteína cliente. Essa reação pode ser intensificada pela proteína Aha1; (i) Por fim, ocorre a liberação da proteína cliente na sua conformação funcional, a liberação das co-chaperonas e cofatores do funcionamento da maquinaria (que podem ser utilizados em um novo ciclo da chaperona) e a

liberação do ATP hidrolisado, na forma de ADP (ELLIS, 1990; (BOSE et al., 1996; BUCHNER, 1999; PRATT; TOFT, 2003; ZHAO; HOURY, 2005; BROWN et al., 2007; Li et al., 2012; ERLEJMAN et al., 2014a; SCHOPF et al., 2017).

Existe uma certa especificidade de substratos para a proteína Hsp90, que pode ser explicada pelo reconhecimento específico de estados conformacionais não nativos de determinadas proteínas cliente, fazendo com que a Hsp90 seja uma chaperona especializada (BUCHNER, 1999; ZHAO; HOURY, 2005; ERLEJMAN et al., 2014a). O primeiro substrato da Hsp90 foi a proteína pp60, descrito em 1981 e, atualmente, são descritas centenas de proteínas cliente que precisam da Hsp90 para completar a sua maturação e/ou ativação, dentre as quais estão alguns receptores de hormônios esteroides, como de progesterona, estrogênio, andrógeno e glicocorticoides, proteínas membranares de tráfego através da membrana plasmática ou do núcleo, proteínas estruturais como miosina, tubulina, actina e histonas, óxido nítrico sintase, transcriptase reversa, o regulador de apoptose Bcl2, RNA polimerase II, fator de necrose tumoral, helicases, luciferase, proteínas quinases, entre outras (BUCHNER, 1999; PRATT; TOFT, 2003; ZHAO; HOURY, 2005; BROWN et al., 2007; ERLEJMAN et al., 2014a; SCHOPF et al., 2017).

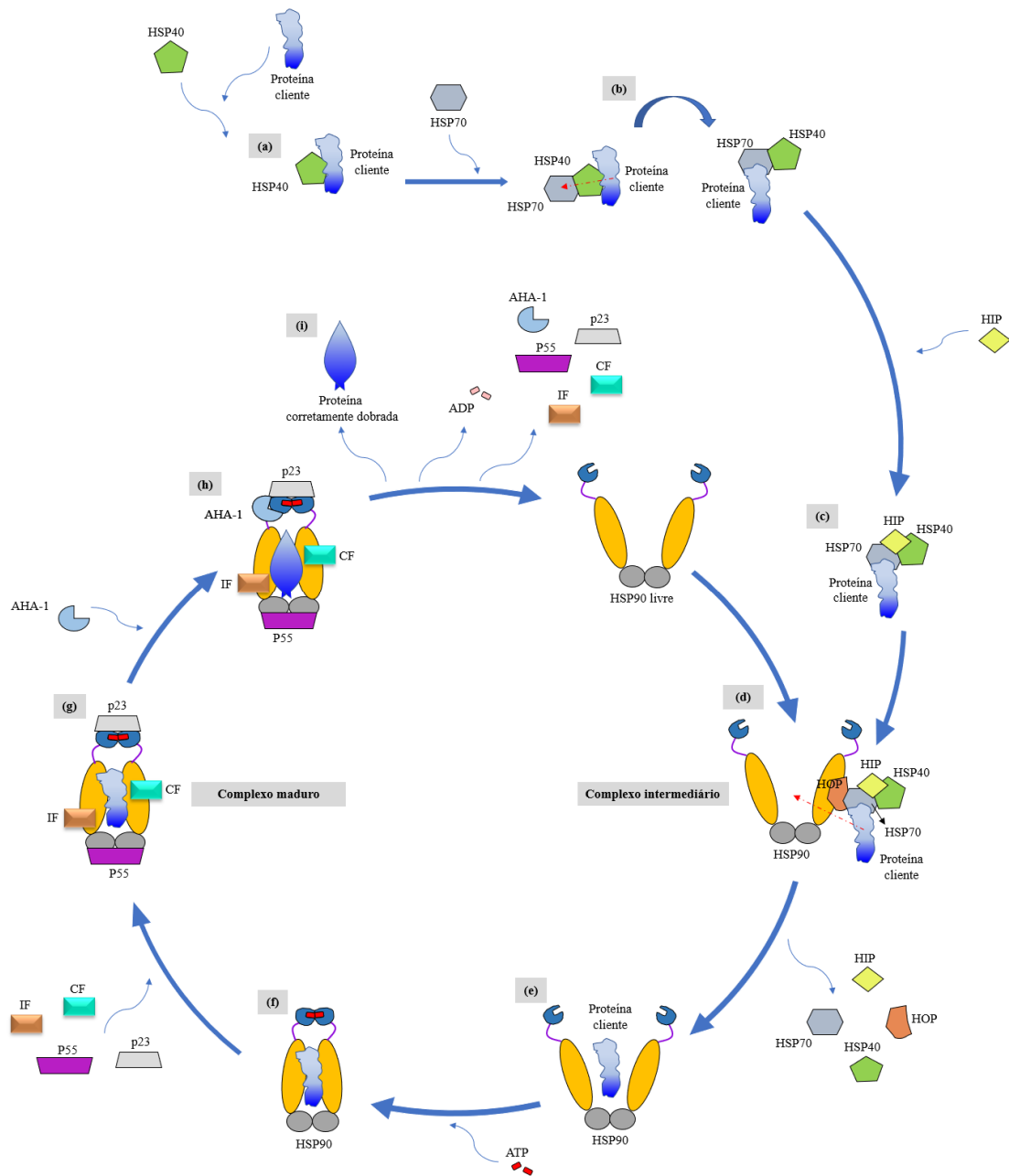


Figura 3 – Ciclo de funcionamento da chaperona Hsp90. A maquinaria da Hsp90 funciona de maneira cíclica e com a participação de co-chaperonas e outras proteínas adaptadoras. Inicialmente, (a) a proteína HSP40 se liga à proteína cliente e (b) esta é transferida para a HSP70, após a entrada desta proteína no complexo inicial. Esse complexo é, então, (c) estabilizado pela proteína HIP e, através da proteína Hop, é (d) ligada à uma Hsp90 que estava livre no citosol, em sua conformação aberta, formando o complexo intermediário. Essa ligação permite a transferência da proteína cliente para a Hsp90 e o desligamento das co-chaperonas e proteínas adaptadoras. (e) Com a proteína cliente estabilizada no domínio central da Hsp90, (f) o ATP é ligado ao domínio N-terminal da chaperona e (g) outras proteínas estabilizadoras atuam para a estabilização da Hsp90 em sua conformação fechada: a P55, estabilizando a dimerização na porção C-terminal e a p23, estabilizando a ligação do ATP ao domínio N-terminal. Nesta etapa, dependendo da proteína cliente em processo de enovelamento, podem ainda participar imunofilinas (IF) e/ou ciclofilinas (CF). Em seguida, (h) a proteína Aha-1 participa da reação, aumentando a atividade hidrolítica do ATP. Por fim, (i) a proteína cliente é liberada na sua conformação ativa e funcional, o ATP hidrolisado é liberado na forma de ADP e as outras proteínas adaptadoras utilizadas nas fases finais do ciclo também são liberadas.

Fonte: Adaptado de (BUCHNER, 1999; ERLEJMAN et al., 2014a; PRATT; TOFT, 2003; SCHOPF et al., 2017; WEGELE; BUCHNER, 2004; ZHAO; HOURY, 2005).

Modificações na estrutura, expressão ou funcionamento da maquinaria da chaperona Hsp90, bem como mutações, podem causar falha no dobramento de certas proteínas cliente que são importantes para o funcionamento das células, tornando a produção dessas proteínas deficiente, o que provoca distúrbios intracelulares e, conseqüentemente, pode resultar em condições patológicas no organismo (ELLIS, 1990; PRATT; TOFT, 2003). Por esse motivo, um conjunto de moléculas chamadas genericamente de “inibidores da Hsp90” tem sido investigado como potenciais quimioterápicos em diferentes patologias, incluindo câncer, doenças associadas com mal dobramento proteico e doenças parasitárias, devido à modulação exercida por esses agentes no funcionamento desta chaperona (BROWN et al., 2007; Li et al., 2012; SCHOPF et al., 2017).

2.5 INIBIDORES DA Hsp90

A geldanamicina foi o primeiro antibiótico da família das anzamicinas benzoquinonas, capaz de inibir a atividade da Hsp90 (PRATT; TOFT, 2003). Esse composto foi descoberto em 1994 e, posteriormente, muitas proteínas cliente, reguladas por essa chaperona foram descobertas (PRATT; TOFT, 2003). Desde então, devido à importância desta chaperona na manutenção da homeostase celular, vários estudos buscaram identificar inibidores com potencial quimioterápico para tratamento em diferentes patologias, incluindo cânceres, como melanoma e leucemia, doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, e doenças infecciosas causadas por vírus, como herpes e rotavírus, ou por protozoários, como *Leishmania* e *Plasmodium* (SCHOPF et al., 2017). A atividade desses inibidores é considerada indireta, pois eles não atuam diretamente nas proteínas cliente, mas na Hsp90, impedindo o seu correto funcionamento e diminuindo, conseqüentemente, a expressão das proteínas cliente devido à deficiência no dobramento (BUCHNER, 1999; ZHAO; HOURY, 2005). Dentre os principais inibidores estudados como quimioterápicos estão os da família das anzamicinas benzoquinonas (geldanamicina, 17-AAG, 17-DMAG e IPI-504), os que usam esqueleto de resorcinol (ABI-010, 17-AG e Ganetespib), esqueleto de purinas (PU3, PU24FCI), entre outras moléculas menores (KW-2478, AT13387, KW-2478) (CHIOSIS et al., 2004a; WHITESELL; LIN, 2012a; SIDERA; PATSAVOUDI, 2013; TALDONE et al., 2013; MURILLO-SOLANO et al., 2017). Alguns dos principais inibidores da Hsp90 são mostrados na figura 4.

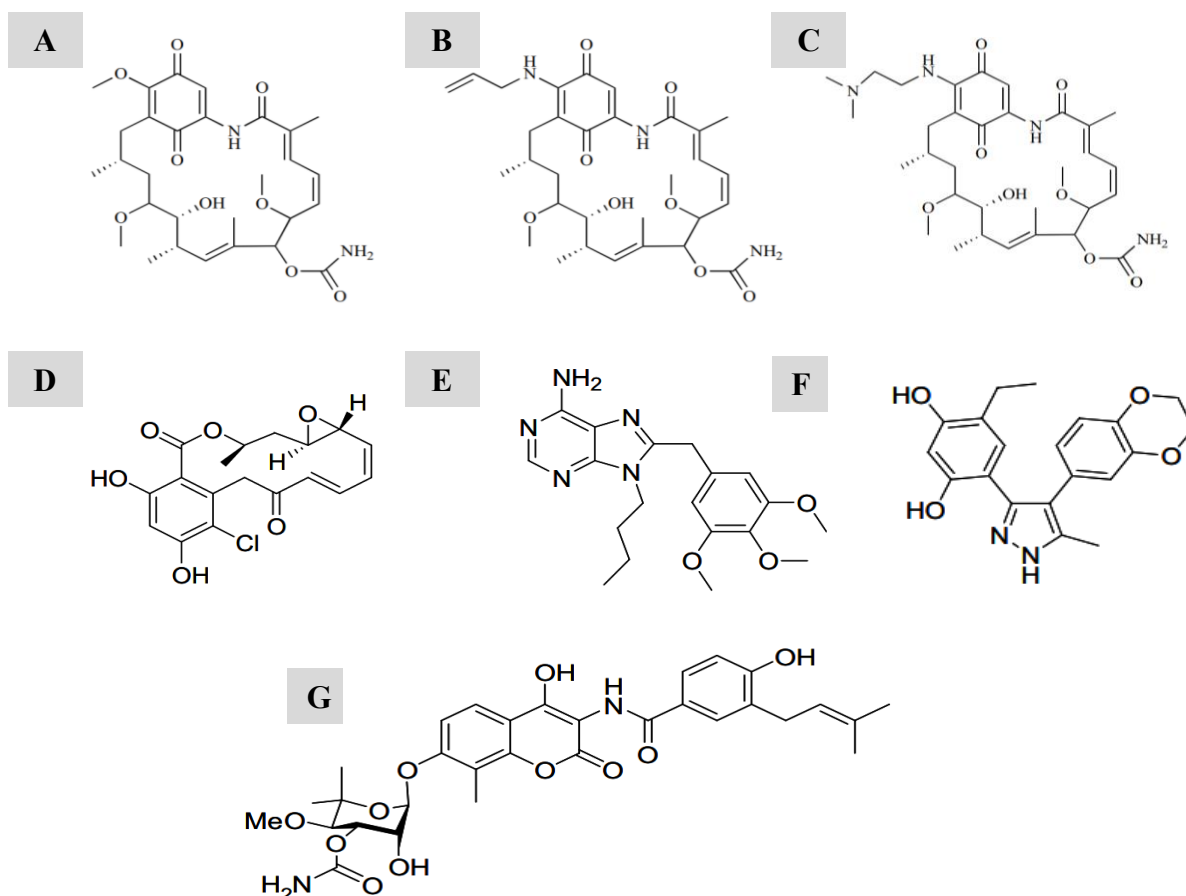


Figura 4 – Principais inibidores da Hsp90. Dentre os principais inibidores da chaperona Hsp90 estão as antramidas (a) geldanamicina, (b) 17-AAG e (c) 17-DMAG, (d) radicicol, esqueletos de purina como (e) PU3, esqueleto de resorcinol como (f) CCT018159 e ligantes da região C-terminal como (g) novobiocina.
Fonte: Adaptado de (POWERS; WORKMAN, 2007 E SIDERA; PATSAVOUDI, 2013).

Diferentes inibidores da Hsp90 podem se ligar a regiões distintas da proteína, levando à inibição do seu funcionamento (CHIOSIS ET AL., 2004a; WANG AND MCALPINE, 2015). Inibidores como cisplatina, novobiocina e seus derivados A4, DNH1 e DNH2, se ligam ao domínio C-terminal, impedindo a dimerização correta da chaperona, causando um truncamento da proteína e, conseqüentemente, bloqueando seu funcionamento (PRATT; TOFT, 2003; CHIOSIS et al., 2004a; MARCU; NECKERS, 2005; XIAO et al., 2006; SIDERA; PATSAVOUDI, 2013). Apesar de alguns estudos demonstrarem a importância similar da inibição do domínio C-terminal para controle de doenças, a maioria dos inibidores amplamente estudados para quimioterapias, como o radicicol, a geldanamicina e seus derivados 17-AAG e 17-DMAG, se ligam ao domínio N-terminal da Hsp90, no sítio de ligação ao ATP, mimetizando a sua conformação e competindo pelo mesmo sítio de ligação (MARCUS; NECKERS, 2005; ZHAO; HOURY, 2005; BROWN et al., 2007; ERLEJMAN et al., 2014a). A figura 5 mostra

o ciclo da Hsp90 com a interferência de inibidores que se ligam ao domínio N-terminal da chaperona.

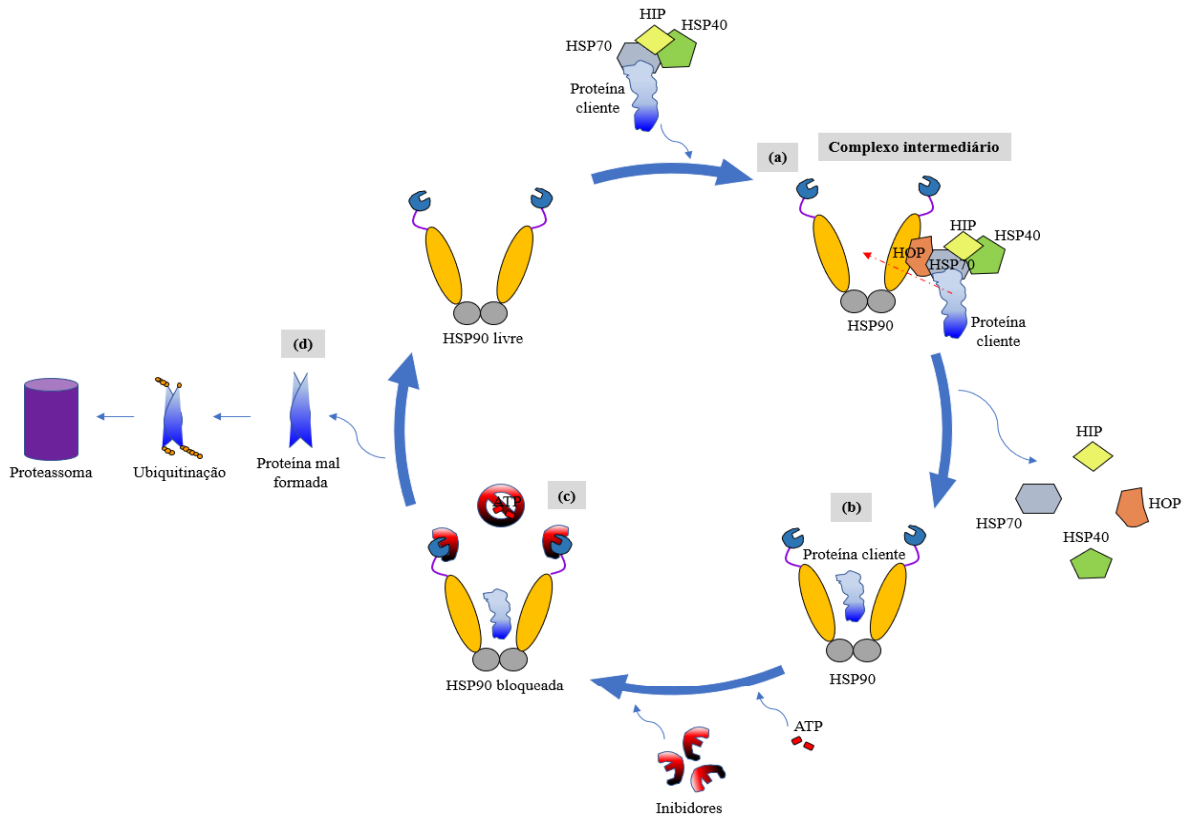


Figura 5 – Atividade de inibidores da Hsp90. Inibidores da Hsp90 podem se ligar à diferentes regiões da proteína. Entretanto, os mais amplamente estudados com potencial quimioterápico são aqueles que se ligam ao domínio N-terminal, no mesmo sítio de ligação ao ATP. Inicialmente, (a) o complexo inicial formado pelas co-chaperonas e proteínas adaptadoras ligadas à proteína cliente é acoplado à Hsp90, formando o complexo intermediário. Posteriormente, (b) a proteína cliente é transferida para a Hsp90 e as co-chaperonas e proteínas adaptadoras são desligadas. (c) Os inibidores da Hsp90 competem com o ATP pelo sítio de ligação no domínio N-terminal da chaperona, bloqueando essa região. Com isso, (d) há a formação de proteínas truncadas ou malformadas, que são então ubiquitinadas e direcionadas para o proteassoma, onde são degradadas.

Fonte: Adaptado de (CHIOSIS et al., 2004; SIDERA; PATSAVOUDI, 2013; XIAO et al., 2006).

Células tumorais são caracterizadas por um estado constante de estresse, devido à presença de proteínas mutantes e proliferação celular acelerada, que eleva a necessidade de controle da maquinaria proteica (XIAO et al., 2006; SCHOPF et al., 2017). O efeito da inibição da Hsp90 sobre a proliferação de células cancerígenas havia sido sugerido antes da descoberta de seus inibidores (BUCHNER, 1999). Dessa forma, nos últimos anos, a Hsp90 emergiu como um dos alvos possíveis para terapia em diferentes tipos de câncer, por ser crucial no desenvolvimento de tumores que apresentam inativação de vias de reparo de DNA e amplificação da expressão de proteínas mutadas, cujas função e estabilidade dependem da Hsp90 (XIAO et al., 2006; BROWN et al., 2007; Li et al., 2012). A inibição da Hsp90 por

inibidores como geldanamicina, herbimicina A, macbecina e radicicol afeta, simultaneamente, múltiplas vias de sinalização oncogênica, evidenciando a importância dessa proteína na sobrevivência de células tumorais e, conseqüentemente, o potencial antitumoral dos inibidores de Hsp90 (PRATT; TOFT, 2003; ZHAO; HOURY, 2005; XIAO et al., 2006; BROWN et al., 2007; SCHOPF et al., 2017). O tratamento de neoplasias com inibidores de Hsp90 gera danos mínimos às células normais devido à maior expressão de Hsp90 e de atividade ATPásica que as células tumorais apresentam, em comparação com células saudáveis (ZHAO; HOURY, 2005; ERLEJMAN et al., 2014a). Muitos dos inibidores da Hsp90 da família das anzamicinas benzoquinonas passaram ou encontram-se em fases clínicas de estudo em seres humanos, em razão do potencial quimioterápico comprovado no tratamento de cânceres (SOLIT; CHIOSIS, 2008; WHITESELL; LIN, 2012a). O 17-AAG, análogo da geldanamicina, com toxicidade atenuada e atividade antiproliferativa similar, foi proposto para substituir a geldanamicina pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NIC), que havia mostrado ter atividade *in vivo* em modelos de neuroblastoma e carcinoma de próstata, somente em doses tóxicas (SAUSVILLE, 2004; XIAO et al., 2006). Entretanto, devido à baixa solubilidade do 17-AAG, o análogo hidrossolúvel da geldanamicina, o 17-DMAG, mostrou ter atividade antiproliferativa ainda mais potente contra células de câncer, tendo como vantagens adicionais a solubilidade em salina e outras soluções aquosas, metabolização reduzida e a biodisponibilidade oral (SAUSVILLE, 2004; XIAO et al., 2006; MELLATYAR et al., 2018). Dentre os principais inibidores que estão ou passaram por fases clínicas em humanos estão: (i) Ganetespib, nas fases I e II, aplicado por via intravenosa (IV) no tratamento de cânceres de mama, próstata, hematológico, melanoma, pancreático e esofagogástrico; (ii) retaspimicina, nas fases II e III, aplicado por via IV no tratamento de cânceres de próstata e mama; (iii) 17-AAG, nas fases I-III, aplicado por via IV no tratamento de melanoma e tumores sólidos; e (iv) 17-DMAG, nas fases I e II, por via intravenosa ou oral, no tratamento de cânceres de mama, intestino, entre outros (SOLIT; CHIOSIS, 2008; WHITESELL; LIN, 2012A; MELLATYAR et al., 2018).

Os inibidores da Hsp90 têm sido investigados também como quimioterápicos para outras doenças, como neurodegenerativas e infecciosas, devido à importância dessa chaperona na estabilidade funcional de proteínas e na viabilidade celular em diferentes condições de pressão ambiental, incluindo transformação celular (SOLIT; CHIOSIS, 2008; SCHOPF et al., 2017). Em doenças infecciosas causadas por protozoários, o tratamento com inibidores da Hsp90 pode bloquear a proliferação desses organismos, uma vez que essa chaperona é essencial para a diferenciação e desenvolvimento destes parasitos nas diferentes etapas do seu ciclo de vida (PALLAVI et al., 2010A; SCHOPF et al., 2017). A Hsp90 auxilia na resposta aos

estímulos ambientais, como pH e temperatura, nos diferentes hospedeiros dos parasitos, atuando na “aclimação” no novo microambiente e reestabelecendo a homeostase celular (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994; GRAEFE et al., 2002; ROY et al., 2012; HOMBACH et al., 2014). Assim, a Hsp90 tem sido colocada como um bom alvo terapêutico para doenças causadas por diferentes gêneros de parasitos como *Eimeria*, *Babesia*, *Theileria*, *Dictyostelium*, *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Giardia*, *Candida* e *Leishmania* (PALLAVI et al., 2010a; ROY et al., 2012; GUSWANTO et al., 2018a).

Diversos inibidores da Hsp90 apresentaram potencial quimioterápico contra duas cepas de *P. falciparum*: os derivados de anzamicina benzoquinona, 17-AAG e 17-DMAG, o derivado de resorcinol, NVP-AUY922, a benzamidina SNX-2112 e o derivado de purina PUWS13 (MURILLO-SOLANO et al., 2017). Destes, os três primeiros se destacaram por causar alterações estruturais na morfologia de todas as formas sanguíneas do parasito (MURILLO-SOLANO et al., 2017). Além disso, o 17-DMAG e o NVP-AUY922 apresentaram alta capacidade de inibição do crescimento tanto da cepa susceptível (3D7) do *Plasmodium*, quanto da cepa resistente à cloroquina (W2), sugerindo a utilização desses compostos no tratamento de malária em casos de resistência aos medicamentos comumente utilizados (MURILLO-SOLANO et al., 2017). A geldanamicina demonstrou ter efeito na redução da proliferação de *T. cruzi* de maneira dose-dependente (GRAEFE et al., 2002). O tratamento com esse composto causa parada na fase G1 do ciclo celular das formas epimastigotas e conversão das formas sanguíneas tripomastigotas em esferomastigotas, por meio do bloqueio da diferenciação para a forma epimastigotas (GRAEFE et al., 2002). Adicionalmente, foi mostrado que outros inibidores de Hsp90 apresentam atividade antiparasitária contra a espécie *T. brucei*, causadora da doença do sono em seres humanos (MEYER; SHAPIRO, 2013). Os inibidores que se ligam na região N-terminal da Hsp90, geldanamicina e o radicicol, foram eficazes *in vitro* em concentrações na escala de nanomolar, enquanto que o inibidor novobiocina, que se liga na região C-terminal, apresentou eficácia na escala de micromolar (MEYER; SHAPIRO, 2013). Esse trabalho mostrou também que o tratamento com 17-AAG causou disfunção do ciclo celular e alterações morfológicas dos tripomastigotas e que quando aplicado por via intraperitoneal ou oral, foi capaz de levar à cura da infecção causada por *T. brucei*, que foi letal para os grupos controle (MEYER; SHAPIRO, 2013).

Cochaperonas, como Sti1 e HSP23, além de proteínas adaptadoras, como p23, são essenciais para funcionamento da maquinaria intracelular, desenvolvimento das diferentes formas de ciclo de vida e manutenção da virulência em parasitos do gênero *Leishmania* (HOMBACH et al., 2013, 2014, 2015). Nesses parasitos, a alternância da forma promastigota,

no inseto vetor, para a amastigota, no hospedeiro vertebrado, e vice-versa, depende da Hsp90 (ROY et al., 2012; HOMBACH et al., 2013). Foi demonstrado que a geldanamicina induz a parada do ciclo celular de promastigotas de *L. donovani* na fase G2, levando à morte do parasito (WIESGIGL et al., 2001). Além disso, geldanamicina, taxol e radicicol atuam sobre a Hsp90 de *L. donovani* e induzem a diferenciação da forma promastigota em amastigota, mimetizando as condições de passagem do parasito para o hospedeiro vertebrado durante a infecção, induzindo também a produção de proteínas específicas da forma amastigota (WIESGIGL et al., 2001). Em conjunto, esses achados evidenciam a importância da ativação da Hsp90 em resposta ao choque térmico no ciclo de vida do parasito (WIESGIGL et al., 2001). Adicionalmente, foi demonstrado que promastigotas de *L. donovani* tratados com geldanamicina exibem morfologia apoptótica, alteração no ciclo celular e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que pode levar à uma disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, à morte destes parasitos por apoptose (LI et al., 2009). Os inibidores da Hsp90 se ligam mais fortemente aos resíduos de aminoácidos da chaperona do parasito, em comparação com a proteína da célula hospedeira, e essa maior afinidade justifica o potencial quimioterápico dessas drogas para doenças parasitárias (PALLAVI et al., 2010a; TALDONE et al., 2013; PALMA et al., 2019)

Nosso grupo tem se dedicado à investigação do potencial quimioterápico de inibidores da Hsp90 no tratamento de leishmanioses. Petersen et al. (2012) demonstraram que o inibidor da Hsp90, 17-AAG, causou a redução do percentual de macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos BALB/c infectados e do número de parasitos intracelulares de *L. amazonensis*, de maneira tempo e dose dependentes, em concentrações não tóxicas para as células hospedeiras (PETERSEN et al., 2012a). Mais recentemente, foi demonstrado que geldanamicina, 17-AAG e 17-DMAG causam a morte de promastigotas de *L. amazonensis* em concentrações não tóxicas para células de linhagem monocítica humana (THP-1) e que o último inibidor citado é capaz de reduzir a viabilidade de amastigotas intracelulares em células THP-1 infectadas por *L. amazonensis* (PALMA et al., 2019). Além disso, foi demonstrado por Santos et al. (2014) que o 17-AAG foi capaz de controlar *in vitro* e *in vivo* a infecção de macrófagos de camundongos BALB/c por *L. braziliensis* (SANTOS et al., 2014). Neste trabalho, foi observado que o tratamento intraperitoneal com 20 mg/kg de 17-AAG, três vezes por semana, durante três semanas, foi capaz de reduzir o tamanho da lesão na orelha e a carga parasitária no local da lesão de camundongos infectados por *L. braziliensis*, mas não foi capaz de causar a redução da carga parasitária no linfonodo drenante desses animais, o que poderia causar uma recidiva da infecção, após a finalização do tratamento (SANTOS et al., 2014). É possível que a baixa eficácia desse protocolo de tratamento esteja relacionada à baixa propriedade farmacocinética

e distribuição tecidual do 17-AAG (WHITESELL; LIN, 2012A; MELLATYAR et al., 2018). Por este motivo, nosso grupo decidiu investigar a eficácia do 17-DMAG, um análogo hidrossolúvel do 17-AAG e com melhores propriedades farmacocinéticas (EGORIN et al., 2002a; SAUSVILLE, 2004; WHITESELL; LIN, 2012a), no controle da infecção por *L. braziliensis*. Resultados preliminares mostraram que o tratamento diário, por via intraperitoneal, com 20 mg/kg de 17-DMAG levou à redução do tamanho da lesão na orelha e do linfonodo drenante de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*, bem como à redução da carga parasitária tanto na orelha quanto no linfonodo, a partir de duas semanas de tratamento, chegando a zero na maioria ou no total de animais tratados, na quarta ou sétima semana de tratamento, respectivamente (dados não publicados). Em conjunto, esses dados mostram que o uso dos inibidores da Hsp90 acima citados, nos modelos de infecção *in vitro* e *in vivo* por *Leishmania*, constitui uma proposta promissora para o desenvolvimento de um novo tratamento para a doença. Entretanto, foi observado que, em esquemas terapêuticos mais prolongados, os animais submetidos ao tratamento com 17-DMAG começaram a apresentar sinais de toxicidade, como secreção ocular e perda de peso (dados não publicados). Essa limitação pode ser superada utilizando-se metodologias que podem reduzir a toxicidade observada na aplicação do 17-DMAG, como por exemplo (i) a aplicação do fármaco por uma via de atuação mais direcionada, como a via tópica, ou (ii) com a utilização de sistemas de liberação controlada de medicamentos (DE LYRA et al., 2007; ANSELMO ; MITRAGOTRI, 2014; DE MENEZES et al., 2015b; ANSELMO et al., 2018).

2.6 TRATAMENTO TÓPICO

A leishmaniose cutânea apresenta como principal sinal clínico a presença de lesões na pele, na forma de pápula, nódulo ou úlcera, que podem se apresentar de maneira localizada ou espalhada pelo corpo dos indivíduos acometidos (CARVALHO et al., 1994; VAN BOCXLAER et al., 2016a; TORRES-GUERRERO et al., 2017; MEIRA; GEDAMU, 2019). Essas lesões, apesar de não fatais, podem interferir na qualidade de vida dos pacientes, uma vez que geram estigmatização social e, conseqüentemente, efeitos psicológicos que, em conjunto, levam à morbidade e ao absenteísmo destas pessoas (KAYE; SCOTT 2011; MASMOUDI et al., 2013; AKHOUNDI et al., 2016a; BURZA et al., 2018). Dessa forma, com o objetivo de reduzir ou eliminar as lesões apresentadas pelos pacientes acometidos pela LC, a aplicação de tratamentos por via tópica pode se apresentar como um avanço na terapia da doença e constituir uma importante ferramenta para a melhoria da qualidade de vida desses indivíduos.

Com o intuito de reduzir os efeitos colaterais observados pela administração por vias sistêmicas de medicamentos para a leishmaniose, alguns tratamentos locais têm sido propostos. Entretanto, a terapia local possui alguns fatores determinantes para a sua utilização em pacientes com LC, como (i) o paciente deve apresentar apenas uma ou poucas lesões, (ii) as lesões não podem estar localizadas em regiões de articulações ou áreas esteticamente comprometidas – como nariz, lábios ou ao redor dos olhos - (iii) o risco de desenvolver LMC deve ser reduzido, e (iv) os pacientes não devem apresentar sinais de imunossupressão ou (v) disseminação linfática do parasito (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013; ESPUELAS et al., 2016). São exemplos da terapia local para a LC: termoterapia, crioterapia, laser de CO₂, terapia fotodinâmica, aplicação intralesional de quimioterápicos e aplicação de quimioterápicos por via tópica, utilizando cremes, pomadas ou géis contendo fármacos (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013; ESPUELAS et al., 2016; NASSIF et al., 2017b; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019).

A termoterapia é baseada no princípio de que parasitos do gênero *Leishmania* não sobrevivem, *in vitro*, em temperaturas superiores a 39 °C e, nela, são incididos, diretamente sobre as lesões, geradores de calor no comprimento de onda do infravermelho ou radiofrequência, promovendo a destruição do parasito, com a contração do colágeno e posterior remodelamento do tecido do hospedeiro (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013, 2015; NASSIF et al., 2017b; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019). Na crioterapia, a aplicação de nitrogênio líquido (- 195 °C) sobre as lesões leva à morte dos parasitos por causa da formação de micro cristais de gelo intracelulares, que causam a destruição das células no local da aplicação e leva à necrose isquêmica localizada (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013, 2015; NASSIF et al., 2017b; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019). No tratamento local em que se utiliza laser de CO₂, esse laser causa termólise específica do tecido infectado, com poucos efeitos colaterais no tecido normal do hospedeiro, que permite a posterior síntese e remodelamento do colágeno (NASSIF et al., 2017b; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019). A terapia fotodinâmica utiliza fontes de luz de baixa potência combinadas com um agente fotossensibilizante que, em conjunto, promove reações fotoquímicas que levam à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), uma molécula conhecidamente leishmanicida (NASSIF et al., 2017b; CABRAL et al., 2021). O tratamento intralesional utiliza aplicações com agulhas de antimoniais pentavalentes ao redor da lesão da LC (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013, 2015; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019). É importante ressaltar que muitas dessas terapias locais citadas podem ser aplicadas na presença ou ausência de fármacos no local da lesão, bem como podem ser recomendadas em combinação entre elas ou com fármacos por via sistêmica em alguns países

(SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013; ESPUELAS et al., 2016; NASSIF et al., 2017b; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019).

O tratamento ideal para leishmaniose cutânea deve ser capaz de (i) acelerar a cicatrização das lesões, (ii) reduzir o risco de deixar cicatrizes, (iii) prevenir a disseminação dos parasitos para área mucosa ou visceral e (iv) reduzir as chances de ocorrência de recidiva (LALATSA et al., 2020) entretanto, no cenário atual, nenhum dos medicamentos utilizados são capazes de abranger todas essas exigências. Segundo a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS), a aplicação de quimioterápicos por via tópica, utilizando cremes, pomadas ou géis contendo fármacos é mais bem tolerada pelos pacientes com LC que as outras terapias locais (MORENO et al., 2019; PAHO, 2022). A escolha da base para formulação tópica de medicamentos depende da compatibilidade entre as estruturas químicas do fármaco e da base e o local de aplicação. Os cremes podem ser definidos como emulsões de água e óleo, mais ou menos na mesma proporção, com alta capacidade de absorção, indicados para aplicação de medicamentos em áreas sem ou com pouco pelo, enquanto as pomadas contêm mais óleo que água, que retém a umidade e permanecem por mais tempo na pele (MUELLER et al., 2012). Já os géis podem ser definidos como emulsões semi-sólidas de água e um agente espessante, geralmente um polímero ou polissacarídeo, que são facilmente absorvidos e deixam uma fina camada do agente espessante na pele (MUELLER et al., 2012). Atualmente, as principais formulações para aplicação tópica no tratamento da LC ou em fase de ensaios clínicos para otimização do tratamento incluem medicamentos como a paromomicina e o imiquimod, além da anfotericina B, sozinhos ou em associação com outros fármacos (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015; AZIM et al., 2021; CABRAL et al., 2021). Adicionalmente, instituições como a OMS e a *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi) recomendam a utilização de tratamentos tópicos para a LC e indicam a aplicação de medicamentos por via parenteral apenas em casos em que a terapia tópica não puder ser aplicada ou tiver falhado em eficácia (ESPUELAS et al., 2016; NASSIF et al., 2017b).

A pele dos seres humanos (fig. 6) funciona como uma barreira biológica protetora, que dificulta a entrada de agentes externos, físicos, químicos ou biológicos, no organismo, além de evitar a perda de água e auxiliar no controle da temperatura corporal (PROKSCH et al., 2008; HWA et al., 2011; CARNEIRO et al., 2012). Essa barreira é constituída por três camadas principais: a epiderme, a derme e a hipoderme (fig. 6). A epiderme é constituída, principalmente, por camadas sobrepostas de células denominadas queratinócitos, mas outras células, como as células de Langerhans e melanócitos, podem estar presentes em algumas regiões (fig. 6) (PROKSCH et al., 2008; HWA et al., 2011). Na camada mais externa da pele

estão os corneócitos, definidos como queratinócitos mortos e anucleados que, juntamente com a grande quantidade de queratina, formam a camada denominada estrato córneo, considerada a principal barreira biológica (fig. 6) (PROKSCH et al., 2008; HWA et al., 2011). Abaixo do estrato córneo estão as outras camadas de células componentes da epiderme são, respectivamente, de fora para dentro: estrato lúcido (que pode ou não estar presente), estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal (também conhecido como lâmina basal ou estrato germinativo) (fig. 6) (PROKSCH et al., 2008). Logo abaixo da epiderme está localizada a derme, uma camada composta principalmente por colágeno e fibras elásticas, onde estão presentes também capilares sanguíneos, vasos linfáticos e apêndices da pele como terminações nervosas, folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas (fig. 6) (HWA et al., 2011). Por fim, a camada mais interna da pele, também chamada de camada subcutânea, ou hipoderme, é composta principalmente por gordura e fornece ao organismo proteção mecânica, isolamento térmico e controle da temperatura, além de funcionar como uma fonte de armazenamento de energia (fig. 6) (HWA et al., 2011).

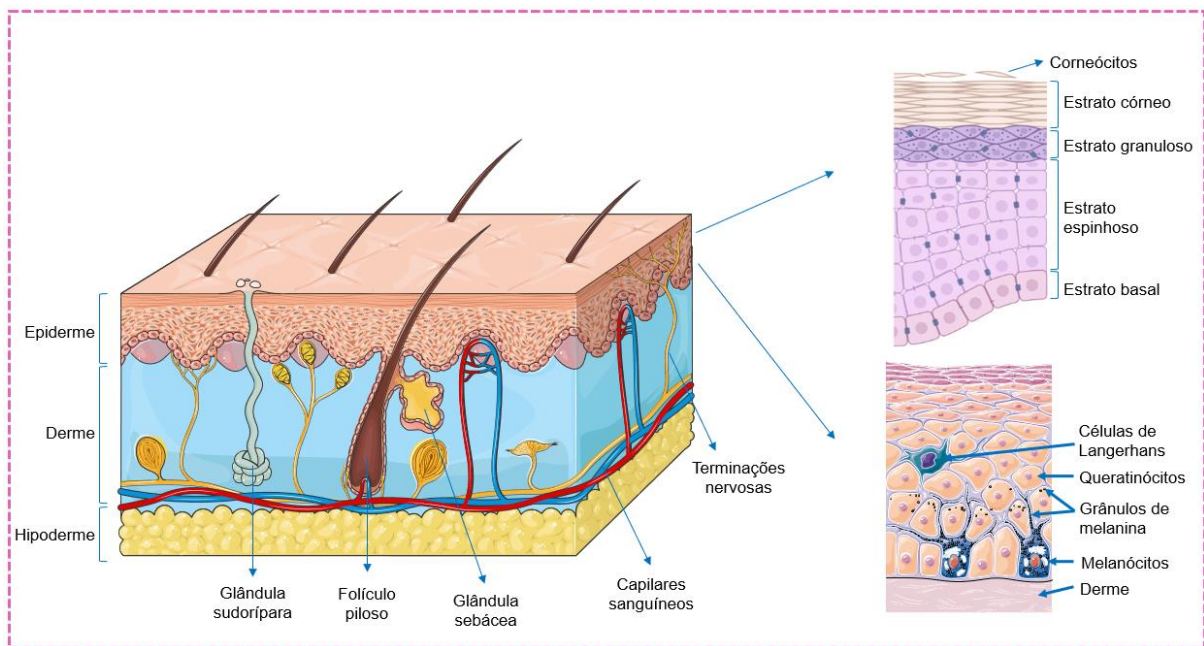


Figura 6 – Representação esquemática dos componentes da pele, incluindo suas principais células e camadas.
Fonte: (BIORENDER, 2023).

Tratamentos tópicos, com aplicação pela pele, são frequentemente indicados como terapias para doenças com manifestações cutâneas (ANSELMO et al., 2018), como é o caso da leishmaniose cutânea. Durante a apresentação clínica da LC, as lesões podem se apresentar, principalmente, na forma de nódulos, onde se observa alta carga parasitária e lesão tecidual

discreta, ou lesões ulcerativas, caracterizadas por um alto grau de destruição tecidual e com baixa carga parasitária no local (ESPUELAS et al., 2016). Essas lesões podem causar sérios danos às diferentes camadas da pele, com perda da epiderme ou de parte dela, o que altera ou elimina a função do estrato córneo de atuar como barreira de proteção (fig. 7) (CARNEIRO et al., 2012; VAN BOCXLAER et al., 2016a). Nesse sentido, na ausência dessas camadas, muitos tratamentos aplicados topicamente podem ter a sua absorção aumentada, especialmente drogas de caráter hidrofílico (CARNEIRO et al., 2012; VAN BOCXLAER et al., 2016a). Uma vez que as manifestações clínicas da LC podem variar e que os macrófagos contendo os parasitos de *Leishmania* internalizados encontram-se, principalmente, na derme, os sistemas de entrega de fármacos aplicados por via tópica devem ser capazes de penetrar nas camadas dérmicas mais profundas, auxiliando na re-epitelização das lesões ulceradas, mas também devem ser capazes de contribuir para o reparo da barreira em diferentes situações (pele intacta, parcialmente ou totalmente danificada) (fig. 7) (CARNEIRO et al., 2012; VAN BOCXLAER et al., 2016a).

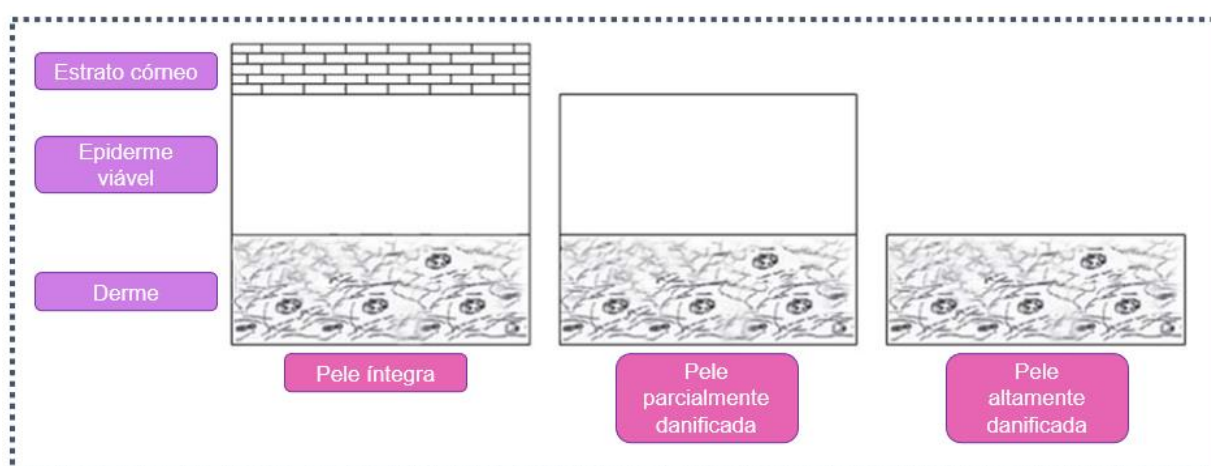


Figura 7 - Diagrama esquemático das possíveis condições da pele durante a leishmaniose cutânea.

Fonte: Adaptado de (CARNEIRO et al., 2012).

Ao contrário de medicamentos aplicados por via parenteral, como os antimoniais pentavalentes, a aplicação de medicamentos por via tópica apresenta como principais vantagens a baixa ocorrência de efeitos colaterais, facilidade de administração, redução da relação risco-benefício e baixo custo (CARNEIRO et al., 2012; DE MENEZES et al., 2015c; ESPUELAS et al., 2016; VAN BOCXLAER et al., 2016a). Além de não ser invasivo, o tratamento por via tópica apresenta como vantagens ser de fácil aplicação, podendo ser feita pelo próprio paciente em tratamento, e ser indolor, o que, em conjunto, pode aumentar a adesão dos pacientes ao tratamento, reduzir as taxas de abandono da terapia e, com isso, as falhas terapêuticas (HWA et al., 2011; ANSELMO; MITRAGOTRI, 2014; ESPUELAS et al., 2016; VAN BOCXLAER

et al., 2016a; ANSELMO et al., 2018). Adicionalmente, esses tratamentos são considerados sistemas de entrega localizada de medicamento e, portanto, os fármacos aplicados por essa via não sofrem degradação gástrica nem metabolização por via hepática, reduzindo drasticamente as chances de ocorrência de efeitos colaterais e/ou toxicidade sistêmica (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2014; ANSELMO et al., 2018). Ademais, a utilização de bases semissólidas, como hidrogéis, para aplicação de medicamentos por via tópica adicionam a este tipo de tratamento a vantagem de permanecer durante um longo período na superfície da pele após a aplicação, permitindo uma liberação sustentada do princípio ativo ao longo do tempo, que contribui também para evitar a toxicidade sistêmica e local (ANSELMO et al., 2018).

Os tratamentos tópicos, apesar de facilitarem o acesso dos pacientes aos medicamentos, pode apresentar algumas desvantagens como o uso incorreto pelos pacientes (devido a autoaplicação não acompanhada por profissionais), a taxa de absorção variável, que é dependente da condição da pele, da localização da lesão no corpo e das barreiras da pele que esses medicamentos precisam atravessar, em alguns casos (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2014; ESPUELAS et al., 2016; ANSELMO et al., 2018). Idealmente, para o desenvolvimento de tratamentos aplicados por via tópica, podem ser necessários parâmetros como alto poder de penetração (entrada em uma camada particular da pele), de permeação (passagem do medicamento de uma camada para outra, estruturalmente diferente da anterior) e/ou de absorção (captação do fármaco pelo plexo vascular para distribuição sistêmica (HWA et al., 2011). Assim, o desenvolvimento de um tratamento tópico para a leishmaniose cutânea deve ser capaz de (i) atravessar as diferentes barreiras da pele, (ii) de forma não tóxica para estas células, e ser capaz de (iii) eliminar os macrófagos infectados e/ou as amastigotas intracelulares de forma seletiva, (iv) reduzindo também a inflamação observada em lesões ulceradas da leishmaniose cutânea e (v) auxiliando na re-epitelização do tecido.

Apesar de, nas últimas décadas, muitas formulações terem sido desenvolvidas para tratamento tópico da LC, nenhuma delas apresentou melhoria satisfatória, devido a ocorrência de alguns efeitos colaterais, como ardência e irritação da pele, e diminuição da eficácia do princípio ativo (VAN BOCXLAER et al., 2016a). Dessa forma, o desenvolvimento de um tratamento que possa ser aplicado por via tópica, com características leishmanicida e antiinflamatória, que seja autoaplicável pelos indivíduos acometidos, pode ser uma importante ferramenta na melhora do quadro clínico do paciente acometido pela LC, reduzindo a estigmatização e, conseqüentemente, melhorando o cenário atual de tratamentos para essa doença.

Recentemente, em estudo realizado por nossa equipe, foi proposto pela primeira vez o uso do 17-DMAG no tratamento de modelo murino de LC, com aplicação por via tópica, impregnado em membrana de celulose bacteriana (AMORIM, 2021). Devido ao potencial leishmanicida e antiinflamatório do 17-DMAG, acreditamos que ele pode ser utilizado para aplicação por via tópica no tratamento da LC, incorporado em base semissólida de hidrogel [sistema de rede tridimensional, frouxamente reticulada, formada a partir da hidratação de grupos hidrofílicos presentes no polímero de sua composição (CARPI, 2011; HRUBÝ et al., 2008; JAGUR-GRODZINSKI, 2010; OKAY, 2009)], como tratamento único ou associado a um tratamento aplicado por via sistêmica. A nossa hipótese é que a aplicação do 17-DMAG por via tópica no tratamento pode auxiliar no controle da infecção causada por *L. braziliensis* eliminando os parasitos no local da lesão e acelerando o processo de cicatrização das lesões.

2.7 NANOMEDICAMENTOS

Apesar de não haver um consenso na literatura do limite máximo de tamanho para partículas serem consideradas “nanopartículas”, no início elas foram classificadas com tamanho até 1000 nm mas, atualmente, a maioria dos estudos as definem como sendo materiais com variação de tamanho, em escala nanométrica, de 1 a 100 nm (ZHANG et al., 2008; López-SERRANO et al., 2014; LI et al., 2017; JEEVANANDAM et al., 2018; APOLINARIO et al., 2020; UTREJA et al., 2020). Entretanto, de acordo com a agência de regulação de alimentos e drogas dos Estados Unidos (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*), um material pode ser considerado nanopartícula se apresentar propriedades físicas, químicas e/ou biológicas atribuíveis ao seu tamanho em nanoescala, até 1000 nm (APOLINÁRIO et al., 2020). A figura 8 mostra a escala considerada nanométrica, em comparação com outros componentes menores e maiores, encontrados nos sistemas vivos, como células e biomoléculas.

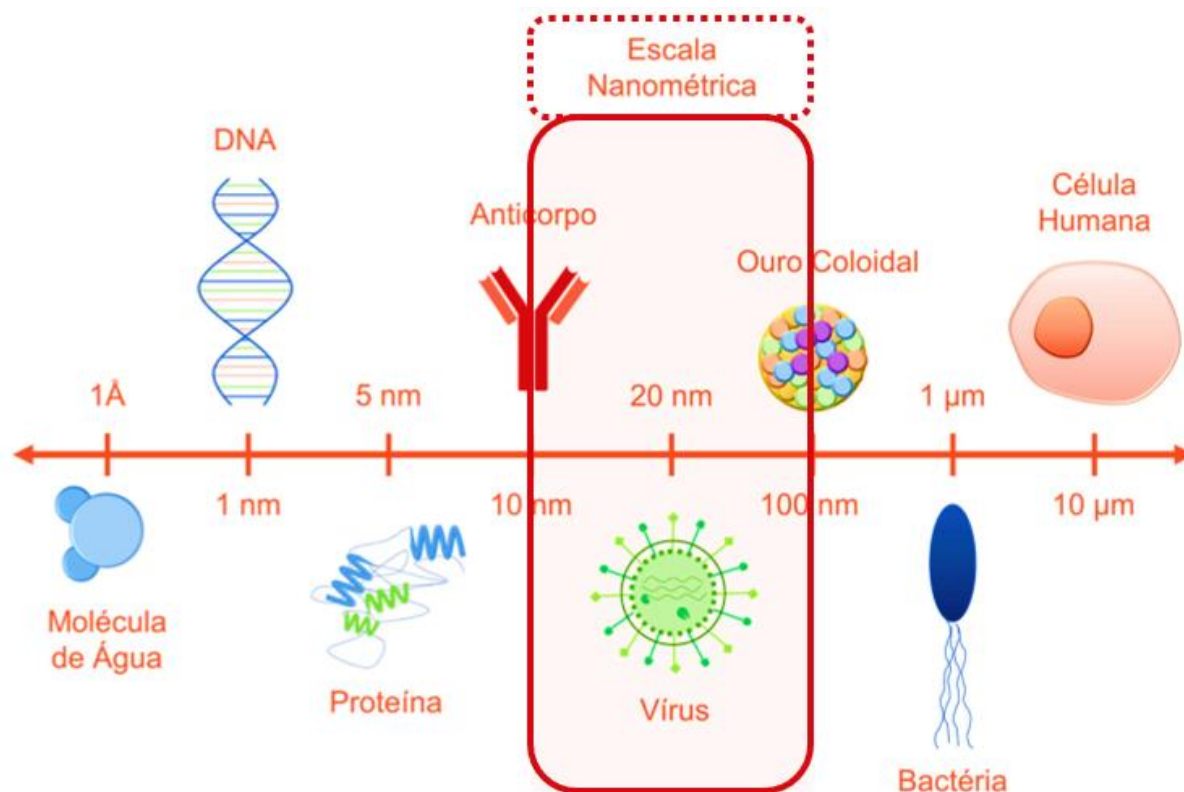


Figura 8 – Escala nanométrica utilizada para definir nanopartículas, comparativamente a outras estruturas integrantes dos sistemas vivos.

Fonte: Adaptado de (APOLINÁRIO et al., 2020).

Quando o conceito de nanopartículas é aplicado nas diversas áreas do campo da medicina, geralmente com aplicações em diagnóstico ou terapia, são utilizados os termos “nanomedicina” e “nanomedicamentos”, que constituem áreas crescentes de estudos nas últimas décadas e vêm revolucionando o cuidado com a saúde (ZHANG et al., 2008; KRUKEMEYER et al., 2015; WOLFRAM et al., 2015; SINGH et al., 2019; UTREJA et al., 2020). A nanomedicina começou a ser pesquisada na década de 1990 quando, após a invenção de microscópios inovadores, no início do século 20, percebeu-se que a nanotecnologia poderia ser utilizada na medicina e farmacologia (KRUKEMEYER et al., 2015). Apesar de alguns nanomateriais serem utilizados na separação de vírus desde o início do século 19, somente depois da invenção de instrumentos capazes de tornar visível essas estruturas surgiu a expressão “nanotecnologia” (KRUKEMEYER et al., 2015). Na verdade, os nanomateriais são usados há muito mais tempo, como é relatado desde o século 4 a.C., quando já existiam materiais com colorações em objetos que hoje são atribuídas à presença de nanopartículas de ouro e prata dispersas em forma coloidal (APOLINÁRIO et al., 2020). Assim, a nanomedicina vem recebendo importante destaque nas últimas décadas, sendo considerada a “ciência chave” do século (KRUKEMEYER et al., 2015). Os sistemas baseados em nanopartículas apresentam como principais vantagens alta segurança, eficácia, especificidade de alvo (direcionamento de

fármacos), biocompatibilidade, biodisponibilidade, biodegradabilidade e reduzida toxicidade, quando comparados aos sistemas tradicionalmente utilizados na entrega de medicamentos (ZHANG et al., 2008; FORMIGA et al., 2009; YILDIRIMER et al., 2011; Lin, 2015; UTREJA et al., 2020). Essa última característica pode ser atribuída à proteção fornecida pelas nanopartículas às moléculas encapsuladas, chamadas de “carga útil”, que permite a liberação sustentada e controlada do composto ao longo de um tempo determinado, caracterizando os nanomedicamentos como sistemas de liberação controlada de fármacos (ZHANG et al., 2008; FORMIGA et al., 2009; YILDIRIMER et al., 2011; LOPEZ-SERRANO et al., 2014; WOLFRAM et al., 2015; LI et al., 2017). Adicionalmente, nanopartículas podem carrear duas ou mais drogas simultaneamente, promovendo uma terapia combinada que gera um sinergismo de efeitos e evita a ocorrência de casos de resistência (ZHANG et al., 2008). Além disso, o direcionamento para tecidos específicos, reduz a dose necessária para se observar eficácia no tratamento e contribui para a redução dos efeitos colaterais (WOLFRAM et al., 2015). Dessa forma, enquanto medicamentos tradicionais precisam ter muitas administrações para que o nível plasmático permaneça dentro da faixa de efetividade ao longo do tempo, os nanomedicamentos conseguem manter essa concentração terapêutica com apenas uma ou poucas aplicações, evitando grandes oscilações entre os níveis sub-terapêutico e tóxicos, devido à sua característica intrínseca de liberação controlada (fig. 9) (DE LYRA et al., 2007; ZHANG et al., 2008; FORMIGA et al., 2009; LI et al., 2017; APOLINARIO et al., 2020).

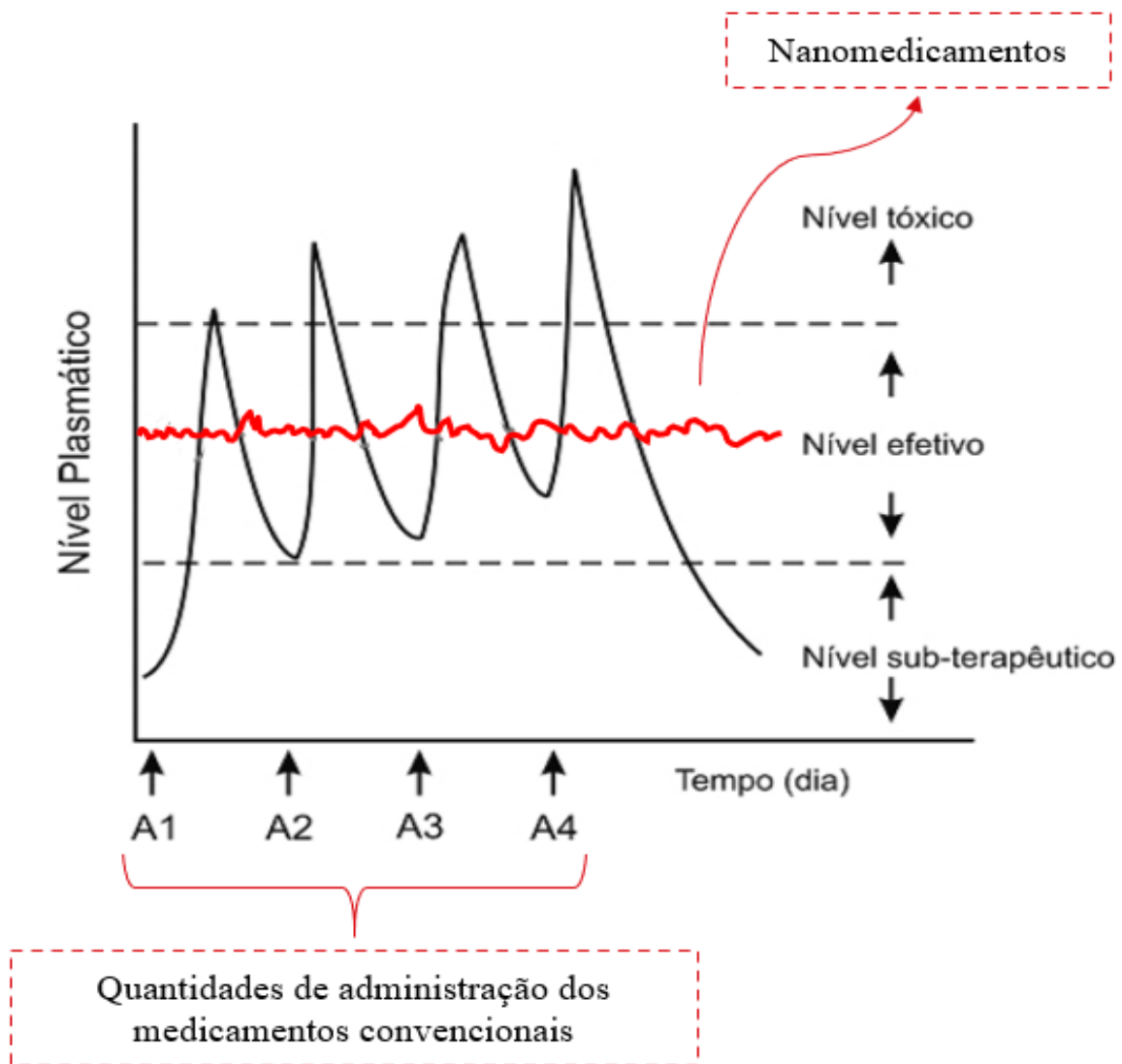


Figura 9 – Administração de fármacos e nível plasmático do princípio ativo quando administrado por sistemas convencionais de entrega ou por nanomedicamentos.

Fonte: Adaptado de (DE LYRA et al., 2007).

As características físicas das nanopartículas, como formato, tamanho e grande área de superfície com baixo volume, as tornam sistemas de entrega de medicamentos melhores do que os sistemas convencionais (SALATA, 2004; ZHANG et al., 2008; WOLFRAM et al., 2015; UTREJA et al., 2020). Outras características, como alta solubilidade, elevado tempo de meia vida na circulação e propriedades imunogênicas, auxiliam no potencial quimioterápico de medicamentos cuja utilização é limitada por características como hidrofobicidade, rápida biodisponibilização do princípio ativo ou presença de agentes tóxicos estabilizantes (SALATA, 2004; ZHANG et al., 2008; WOLFRAM et al., 2015; UTREJA et al., 2020). Nanopartículas formam mais frequentemente estruturas esféricas, o que facilita a captação por células, mas outros formatos, como cilíndrico e achatado, também podem ser elaborados (SALATA, 2004).

A figura 10 mostra os principais nanosistemas que são utilizados para fins terapêuticos, como lipossomas, dendrímeros, nanotubos de carbono, hidrogel e nanopartículas poliméricas, os quais podem ser aplicados por diferentes vias, como intravenosa, intraperitoneal, pulmonar, oral ou tópica (transdermal) (YILDIRIMER et al., 2011; WOLFRAM et al., 2015; SINGH et al., 2019; UTREJA et al., 2020).

Polímeros são definidos como compostos químicos formados por muitas repetições de subunidades, chamados monômeros, que podem existir em formato de cadeia ou ramificações (ZHANG; ZHANG, 2017). Para os nanomedicamentos formados por partículas poliméricas, foco do presente trabalho, os mais frequentemente estudados na literatura utilizam como materiais o quitosân, alginato de sódio, ácido poli-lático (PLA), ácido poli-lático co-glicólico (PLGA) ou policaprolactona (PCL) (FORMIGA et al., 2009; UTREJA et al., 2020). Polímeros sintéticos biocompatíveis e biodegradáveis são preferenciais aos de origem animal ou vegetal pelo risco que esses últimos oferecem de causar infecções e imunidade induzida não esperadas (FORMIGA et al., 2009). Os polímeros são utilizados, principalmente, em casos que o composto livre apresenta limitações como curta meia-vida, o que requer a necessidade de múltiplas aplicações, e/ou inespecificidade do alvo, que leva ao aparecimento de efeitos colaterais (ZHANG et al., 2008; FORMIGA et al., 2009). É importante ressaltar que tanto moléculas hidrofóbicas tóxicas, como hidrofílicas são encapsuladas em nanopartículas poliméricas, objetivando direcioná-las a alvos específicos ou para proteger seu princípio ativo de rápida degradação (FORMIGA et al., 2009). Os fármacos encapsulados em nanopartículas poliméricas geralmente são apresentados adsorvidos na superfície do polímero ou encapsulado no seu interior, estando o polímero em forma de miscela, nanoesfera ou nanocápsula (DE LYRA et al., 2007; Li et al., 2017; SENAPATI et al., 2018). Diferentes sistemas de entrega poliméricos podem ser formados, alguns dos quais são mostradas no destaque da figura 10. As características estruturais do sistema polimérico formado depende do polímero utilizado e das interações estabelecidas entre ele, a molécula encapsulada e o meio externo (LUCKY et al., 2015; SENAPATI et al., 2018; SINGH et al., 2019).

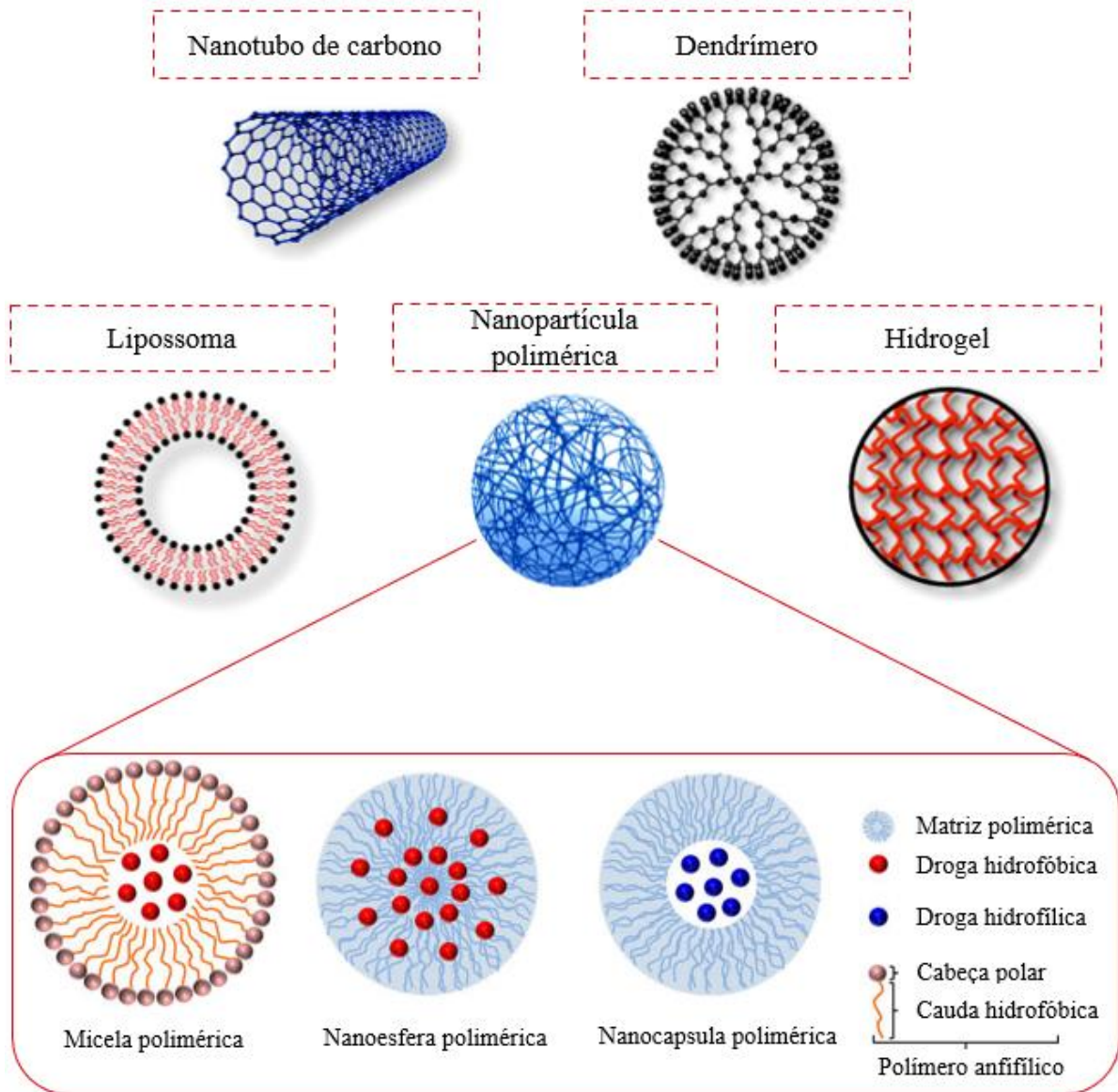


Figura 10 – Principais nanoestruturas utilizadas como sistemas de entrega de medicamentos, com destaque para as formulações poliméricas possíveis.

Fonte: Adaptado de (LUCKY et al., 2015; SENAPATI et al., 2018).

Sistema de entrega de drogas tem sido amplamente estudados no desenvolvimento de novos medicamentos nas últimas décadas (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015). O Doxil, primeiro nanomedicamento aprovado para utilização em seres humanos, em 1995, foi baseado na eficácia similar ao composto livre, a desoxirribicina, com menor toxicidade para pacientes com sarcoma de Kaposi e AIDS (WOLFRAM et al., 2015). As pesquisas com nanomedicamentos cresceram substancialmente nas últimas quase três décadas, com mais de 150 empresas desenvolvendo terapias em nanoescala, concentrando-se, principalmente, nas áreas de diagnósticos, terapia contra o câncer, desordens neurológicas, diabetes, alergia e doenças infecciosas causadas por microrganismos (ZHANG et al., 2008; FORMIGA et al.,

2009; WOLFRAM et al., 2015; Li et al., 2017; UTREJA et al., 2020). Até 2007, 24 produtos terapêuticos baseados em nanotecnologia foram aprovados para uso clínico em seres humanos, além de muitos outros em testes pré-clínicos e ensaios clínicos, tendo como principais materiais mais utilizados, os lipossomas e polímeros que, juntos, corresponderam a mais de 80% dos nanomedicamentos (ZHANG et al., 2008). Dentre os nanomedicamentos aprovados para uso em humanos, que usam a plataforma dos lipossomas estão a AmBisome (tratamento de infecções por fungos e protozoários, incluindo *Leishmania*) e Estrasorb (para terapia da menopausa), e, dentre os que usam a plataforma dos polímeros, estão o Copaxone (para tratamento de esclerose múltipla) e Pegasys (para tratamento de hepatites B e C) (ZHANG et al., 2008).

As nanopartículas podem entrar nas células por diferentes vias, de acordo com o formato, tamanho, aspecto e carga da superfície da partícula (ZHANG et al., 2009; APOLINÁRIO et al., 2020). Dentre as vias de captação conhecidas estão a entrada passiva, endocitose mediada por clatrina ou caveolina, macropinocitose e fagocitose (fig. 11) (ZHANG et al., 2009; APOLINÁRIO et al., 2020). Devido ao tamanho das nanopartículas, nos sistemas vivos, elas são rapidamente captadas por células do sistema fagocítico mononuclear, o que as coloca como sistemas vantajosos para o direcionamento de fármacos para células deste grupo como, por exemplo, os macrófagos (FORMIGA et al., 2009). Dessa forma, o uso de sistemas de liberação controlada utilizando nanopartículas constitui uma das abordagens possíveis para o tratamento alternativo ou associado das leishmanioses, superando as limitações apresentadas pelos medicamentos atualmente utilizados, como reações adversas (DE MENEZES et al., 2015b).

Diversos trabalhos vêm demonstrando o potencial do uso de nanopartículas, principalmente lipídicas e poliméricas, para carreamento de moléculas leishmanicidas, buscando melhorar o cenário atual dos tratamentos utilizados e, conseqüentemente, a qualidade de vida dos pacientes acometidos pela doença (GUTIERREZ et al., 2016; SHAHCHERAGHI, 2016; AKBARI et al., 2017; DE SOUZA et al., 2018). Alguns nanomedicamentos foram descritos como tendo potencial leishmanicida aumentado, com menos efeitos colaterais e menos falhas no tratamento que o composto livre, como a Anfotericina B em lipossomas (AmBisome), em PLGA ou PCL, além da primaquina, a pentamidina e a atovacuna encapsuladas em PLA (FORMIGA et al., 2009; DE MENEZES et al., 2015b). Além disso, diversos trabalhos têm demonstrado que o encapsulamento de medicamentos já utilizados no tratamento da leishmaniose em nanopartículas, apresentaram aumento do potencial quimioterápico e diminuição da toxicidade, como: (i) pentamidina, em polímeros PLA ou

PLGA (DURAND et al., 1997; VALE et al., 2019), (ii) miltefosina, em polímeros PLGA-PEG (KUMAR et al., 2016), (iii) antimoniais pentavalentes, em polímero propilenoglicol (PG), para utilização por via oral, ou em lipossomas, para aplicação por via tópica (FERNANDES et al., 2013; KALAT et al., 2014; LANZA et al., 2016; MOOSAVIAN et al., 2019), (iv) paromomicina, em nanogel, para aplicação por via tópica (BRUGUÉS et al., 2015) e (v) a anfotericina B, em lipossomas, polímeros, nanopartículas poliméricas conjugadas a proteínas, dendrímeros, micelas, ciclodextrina, lipopolimerossomas, entre outros, para aplicação intravenosa, oral ou tópica (RUIZ et al., 2014; KUMAR et al., 2015; SERRANO et al., 2015; VARIKUTI et al., 2017; AMMAR et al., 2019; LANZA et al., 2019).

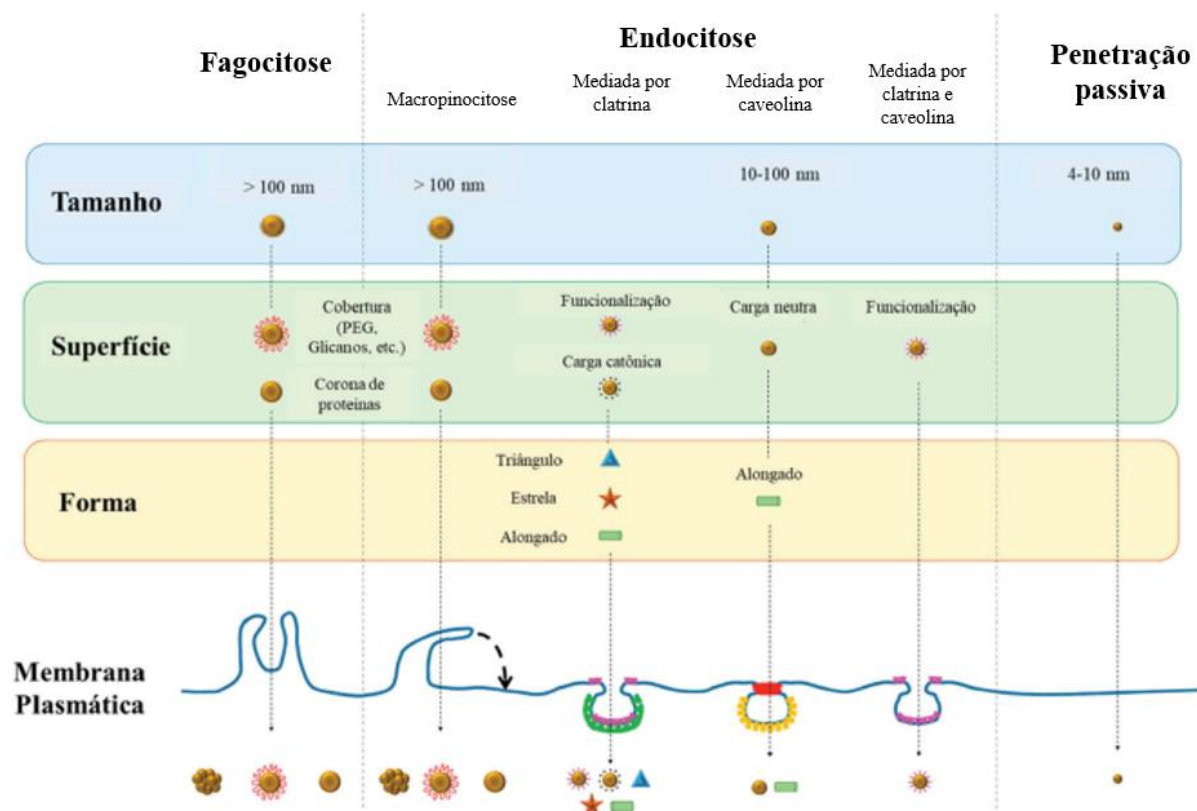


Figura 11 – Influência do tamanho, formato e aspecto da superfície de nanopartícula nas vias possíveis de entrada em células.

Fonte: Adaptado de (APOLINÁRIO et al., 2020).

Para os inibidores da Hsp90, principalmente 17-AAG e 17-DMAG, alguns estudos têm sido realizados utilizando nanopartículas, principalmente formadas por polímeros como PLGA, PCL e PEG, para otimizar o tratamento contra diferentes tipos de câncer (GHALHAR et al., 2014; LIN et al., 2016; MELLATYAR et al., 2014, 2016, 2018). As vantagens do encapsulamento de inibidores da Hsp90 no tratamento de infecções causados por parasitos foram avaliadas por nosso grupo, onde foi mostrado que o encapsulamento do 17-AAG em

lipossomas causou redução do crescimento da cultura axênica de *L. amazonensis*, redução do percentual de células infectadas e do número de amastigotas intracelulares em macrófagos infectados, *in vitro*, em concentrações não tóxicas para as células hospedeiras e de maneira mais pronunciada que o composto na sua forma livre (PETERSEN et al., 2018). Em conjunto com os dados da literatura, os resultados obtidos por nosso grupo evidenciam o potencial quimioterápico de inibidores da Hsp90, tanto 17-AAG quanto 17-DMAG, no tratamento da infecção por *Leishmania* spp. tanto na sua forma livre, quanto nanoencapsulados.

Em suma, o presente trabalho visa a avaliação do efeito do 17-DMAG, quando aplicado por via intraperitoneal ou tópica, no controle da infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*. Acreditamos que a elaboração de um medicamento aplicado por via tópica, diretamente sobre as lesões causadas pela infecção por *Leishmania* sp., levará a uma maior aderência ao tratamento por parte dos pacientes, uma vez que estes podem aplicar o medicamento em si mesmos, sem a necessidade de deslocamento para unidades de saúde para aplicações por vias invasivas. Adicionalmente, objetivamos produzir nanopartículas poliméricas de PLGA contendo o 17-DMAG para futura avaliação do efeito anti-*Leishmania*, com aplicação por via intraperitoneal ou tópica, como tratamento único ou associado ao Glucantime®, no controle da infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. braziliensis*. Devido às vantagens apresentadas pelos sistemas de liberação controlada, hipotetizamos que o encapsulamento do 17-DMAG poderá diminuir a ocorrência dos efeitos adversos observados no tratamento prolongado com o composto em sua forma livre, por via sistêmica, em modelo murino, sendo uma importante inovação aplicada no tratamento da leishmaniose cutânea.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial quimioterápico do 17-DMAG, utilizando diferentes abordagens terapêuticas, no controle da infecção *in vitro* e *in vivo* por *Leishmania braziliensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efeito do 17-DMAG, aplicado por via intraperitoneal, no controle da infecção experimental em modelo murino por *Leishmania braziliensis*;
- Avaliar o potencial quimioterápico do 17-DMAG, aplicado por via tópica, no controle da infecção experimental em modelo murino por *Leishmania braziliensis*;
- Produzir e caracterizar nanopartículas poliméricas de PLGA contendo o fármaco 17-DMAG.

4 CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO LEISHMANICIDA DO 17- DMAG, APLICADO POR VIA INTRAPERITONEAL, EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR *Leishmania braziliensis*.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças tropicais, consideradas negligenciadas, consideradas endêmicas em 98 países, cujo agente etiológico são parasitos do gênero *Leishmania* (MASMOUDI et al., 2013; AKHOUNDI et al., 2016a; WHO, 2021). Essas doenças podem ser divididas em duas principais formas clínicas: a leishmaniose visceral, caracterizada por alta parasitemia em órgãos internos, como baço e fígado, e a leishmaniose tegumentar, que atinge, de forma localizada ou disseminada, regiões da pele, causando estigmatização e absenteísmo dos pacientes (WHO, 2021).

Os tratamentos atualmente aplicados para pacientes com leishmaniose incluem, como drogas de primeira linha os antimoniais pentavalentes e, como tratamentos alternativos ou associados, pode ser recomendado o uso de anfotericina B (desoxicolato ou lipossomal), pentamidina e miltefosina (DE MENEZES et al., 2015c; WHO, 2021). Entretanto, todos esses tratamentos apresentam alguma limitação ao uso, que podem incluir a via de administração invasiva, longos ciclos de tratamento e/ou o elevado custo (DE MENEZES et al., 2015c; WHO, 2021). Em conjunto, essas limitações contribuem para o abandono do tratamento pelos pacientes e evidenciam a necessidade da busca por novos alvos terapêuticos e fármacos que melhorem este cenário.

Na tentativa de buscar novos alvos terapêuticos, nosso grupo vem estudando o potencial quimioterápico de inibidores da Hsp90 no controle da infecção por *Leishmania*. Em estudos anteriormente publicados, foi demonstrado que diferentes inibidores da Hsp90, como a geldanamicina, o 17-AAG e o 17-DMAG apresentam efeito leishmanicida, em concentrações que não tóxicas para células de linhagem monocítica humana (THP-1) (Palma et al., 2019). Adicionalmente, estudos realizados por nosso grupo mostraram que o tratamento com o 17-AAG é eficaz no controle *in vitro* e *in vivo* da infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, respectivamente (Petersen et al., 2012a; SANTOS et al., 2014a). Entretanto, nesses estudos foi observado que o 17-AAG é capaz de reduzir a carga parasitária na orelha dos animais tratados, em comparação com o grupo controle, mas não no linfonodo drenante desses animais

(SANTOS et al., 2014a). Para superar essa limitação, nosso grupo deu enfoque ao estudo do 17-DMAG, análogo hidrossolúvel do 17-AAG e com melhores propriedades farmacocinéticas (Egorin et al., 2002a; Sausville, 2004; Whitesell and Lin, 2012a).

Em dados prévios obtidos por nosso grupo foi mostrado que o 17-DMAG, quando aplicado por via intraperitoneal na dose de 20 mg/kg/dia é eficaz no controle da infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis* (dados não publicados). Adicionalmente, foi observado que este tratamento levou à redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF (dados não publicados). Em conjunto, esses dados mostram o potencial leishmanicida e anti-inflamatório do 17-DMAG, que são vantajosos na busca de tratamentos para a leishmaniose tegumentar. Entretanto, após tempos prolongados de tratamento, os animais submetidos ao tratamento com este fármaco começaram a exibir características de toxicidade como apatia, perda de peso e secreções oculares purulentas (dados não publicados).

Diante deste cenário, o 17-DMAG está sendo apontado como um potencial quimioterápico para o tratamento da leishmaniose tegumentar, necessitando de ajustes no esquema terapêutico aplicado. Dessa forma, o presente capítulo visa a avaliação da eficácia do 17-DMAG, aplicado por via intraperitoneal na dose de 20 mg/kg/dia, utilizando-se tempos curtos de tratamento (até quatro semanas) para não haver ocorrência de toxicidade. A nossa hipótese é que, quando aplicado por via intraperitoneal, o 17-DMAG é eficaz no controle da infecção *in vivo* de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*, sem causar toxicidade quando aplicado por até quatro semanas, e que apresenta características pré-clínicas que o tornam um composto seguro e promissor para o tratamento da leishmaniose cutânea.

2 OBJETIVOS

- ✓ Avaliar a toxicidade do 17-DMAG sobre macrófagos derivados de medula óssea (BMMØ) *in vitro*;
- ✓ Avaliar o efeito do 17-DMAG sobre a viabilidade de promastigotas axênicas de *L. braziliensis*, *in vitro*;
- ✓ Avaliar a eficácia do 17-DMAG no controle da infecção de BMMØ por *L. braziliensis*, *in vitro*;
- ✓ Avaliar a eficácia do 17-DMAG, aplicado por via intraperitoneal, no controle da infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*;
- ✓ Caracterizar o efeito do 17-DMAG no controle da inflamação em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*;
- ✓ Caracterizar o perfil do infiltrado inflamatório de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados com o 17-DMAG;
- ✓ Verificar a ocorrência de recidiva da infecção em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*, após finalização do tratamento com 17-DMAG;
- ✓ Avaliar a eficácia do 17-DMAG no tratamento tardio de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Camundongos BALB/c fêmeas foram fornecidos e mantidos em gaiolas no biotério do Instituto Gonçalo Moniz (IGM - FIOCRUZ / BA) com ração e água *ad libitum* e utilizados nos experimentos ao atingir idade entre seis e oito semanas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos nº 007/2015 e 007/2020 aprovados pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais do Instituto Gonçalo Moniz (IGM - FIOCRUZ / BA).

3.2 PARASITOS

Promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) foram cultivadas em meio Schneider completo [*Schneider's Insect Medium* (Sigma-Aldrich) suplementado com 50 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich) e 20% de soro bovino fetal (Gibco®)] em estufa B.O.D. a 24 °C. O crescimento da cultura axênica foi acompanhado com contagens em câmaras de Neubauer sob microscópio óptico invertido, até a sétima passagem. Ao atingir a fase estacionária de crescimento (concentração maior que 10⁸ parasitos / mL), as promastigotas foram utilizadas para os experimentos de infecção *in vivo*. A infectividade da cepa utilizada foi mantida por isolamento e passagens sucessivas dos parasitos em camundongos BALB/c, conforme descrito a seguir.

Para manutenção da cepa, mensalmente dois camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas axênicas em fase estacionária de *L. braziliensis*. Para isso, inicialmente, após atingir a fase estacionária de crescimento, foi realizada uma centrifugação diferencial a 125 x G por 5 min, a 4 °C, para separação dos parasitos móveis e afilados, que permanecem no sobrenadante após a centrifugação. Em seguida, estes parasitos foram lavados com solução salina (NaCl a 0,9%), seguido por centrifugação a 750 x G, 10 min, 4 °C por três vezes. O *pellet* foi ressuspensão em um volume de 1 mL e, após contagem em câmara de Neubauer, a suspensão foi ajustada para concentração de 5x10⁶ parasitos em 20 µL de solução salina para ser inoculada em uma das patas traseiras de camundongos BALB/c, utilizando seringa de insulina 0,5 mL com agulha 8,0 x 0,30 mm, 30g (PROCARD®). Após um mês de infecção ou quando a lesão na pata se tornou visível, os camundongos BALB/c foram eutanasiados com tiopental (50 mg/kg) via intraperitoneal e tiveram o linfonodo drenante removido de forma asséptica. Por fim, este linfonodo foi macerado em um dos poços de uma placa de seis poços, em meio

Schneider completo, utilizando o fundo de um êmbolo de uma seringa, liberando assim as células do linfonodo, incluindo macrófagos infectados, da cápsula do órgão. As células foram cultivadas em meio Schneider completo e incubadas em estufa B.O.D a 24 °C por uma semana, permitindo a liberação das amastigotas dos macrófagos e a sua diferenciação em formas promastigotas, que foram mantidas em culturas axênicas com passagens sucessivas, até a sétima passagem, conforme descrito acima.

3.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA (BMMΦ)

Para obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMMΦ), inicialmente, camundongos BALB/c foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de tiopental (50 mg/kg) e tiveram os ossos das patas posteriores (fêmur e tíbia) retirados de forma asséptica e mantidos em solução salina estéril gelada contendo 0,01 mg/mL de ciprofloxacina. Em seguida, em ambiente estéril, as extremidades dos ossos foram removidas e a extração das células de medula foi realizada através da lavagem da cavidade óssea com jatos de meio RPMI completo [RPMI suplementado com 25 mM de HEPES (SIGMA), 2 g/L de bicarbonato de sódio (SIGMA), 20% de soro bovino fetal inativado (GIBCO), 200 mM de glutamina (SIGMA) e 0,02 mg/mL de ciprofloxacina (CLARIS)], utilizando seringa de 10 mL conectada a uma agulha de 21g ou 22g. Após esta etapa, as células foram centrifugadas a 300xG, 4 °C, por 10 min, ressuspensas e cultivadas em placas de Petri bacteriológicas descartáveis (3 placas por animal) contendo 10 mL de RPMI completo suplementado adicionalmente com 30% do sobrenadante da cultura de células de linhagem fibroblástica L929, o qual contém GM-CSF, um fator de diferenciação que permite a diferenciação destas células em macrófagos derivados de precursores da medula óssea (BMMΦ). Após 24 h, o sobrenadante das placas foi transferido para novas placas, descartando macrófagos residentes presentes na medula, que aderiram à placa. Após 72 h adicionais, mais 5 mL de RPMI completo contendo 30% de sobrenadante de L929 foram adicionados à cultura, reestimulando as células à diferenciação. Ao final de sete dias, obtivemos os macrófagos diferenciados.

Para utilização dos macrófagos diferenciados, inicialmente, o sobrenadante das culturas foi removido e, em cada placa, foram adicionados 5 mL de solução EDTA a 1 mM. As placas foram então incubadas em estufa a 37 °C por 5 min e, em seguida, as células aderidas foram retiradas com jatos da mesma solução e centrifugadas a 300 x G, 10 min, 4 °C. Posteriormente, essas células foram ressuspensas, contadas em câmaras de Neubauer e plaqueadas de acordo com o desenho experimental.

3.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO 17-DMAG SOBRE BMMΦ, *IN VITRO*

A viabilidade de BMMΦ após exposição ao 17-DMAG, *in vitro*, foi avaliada em ensaio de redução do Alamar blue. Para isso, inicialmente, as células foram obtidas conforme descrito no item 3.3 e plaqueadas na concentração de 5×10^4 em placas de 96 poços, contendo 100 μL de meio DMEM *low* [DMEM *low glucose* (Gibco) suplementado com 22,8 mM de HEPES (Sigma), 27 mM de bicarbonato de sódio (Sigma), 10% de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM de Glutamina (Sigma) e 10 μg/mL de ciprofloxacino] (DMEM *high* completo) por poço. Após 24 h de incubação em estufa a 37 °C, com 95% de umidade e 5% de CO₂, com as células aderidas ao assoalho dos poços, o meio de cultura foi substituído por 200 μL de meio DMEM *low* completo fresco contendo diferentes concentrações de 17-DMAG, variando de 50 μM a 0,024 μM, após realização de diluições seriadas de 1:2. Após 48 h de incubação, foi adicionado 10% de Alamar Blue (Invitrogen) (v/v) nos poços e as células foram reincubadas por mais 24 h. Ao final de 72 h de exposição ao composto, a leitura das placas para avaliação da redução do Alamar Blue foi realizada utilizando espectrofotômetro SPECTRAmax-340PC sob comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

3.5 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG SOBRE PROMASTIGOTAS DE *L. BRAZILIENSIS*, *IN VITRO*

Para avaliar o efeito do 17-DMAG sobre promastigotas de *L. braziliensis*, inicialmente, os parasitos em fase exponencial de crescimento em cultura axênica, com concentração entre 10^7 e 5×10^7 parasitos / mL, foram plaqueados em placas de 96 poços na concentração de 4×10^5 parasitos por poço, em 100 μL de meio Schneider completo. Em seguida, foram adicionados 100 μL por poço de meio Schneider completo contendo diferentes concentrações de 17-DMAG, variando de 2 μM a 0,001 μM, após realização de diluições seriadas de 1:2. Após 70 h de incubação em estufa B.O.D. a 24 °C, foi adicionado 10% de Alamar Blue (Invitrogen) (v/v) nos poços e os parasitos foram reincubados por mais 2 h. Ao final de 72 h de exposição ao composto, a leitura das placas para avaliação da redução do Alamar Blue foi realizada utilizando espectrofotômetro SPECTRAmax-340PC sob comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

3.6 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG NO CONTROLE DA INFECÇÃO *IN VITRO* DE BMMΦ POR *L. BRAZILIENSIS*

Para avaliar a eficácia do 17-DMAG no controle da infecção *in vitro* de BMMΦ por *L. braziliensis*, inicialmente, os macrófagos obtidos a partir de precursores de medula óssea de camundongos BALB/c foram plaqueados na concentração de 2×10^5 células por poço, em placas de 24 poços, contendo 1 mL de DMEM *low* completo e incubadas por quatro horas em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade e, em seguida, foram lavadas três vezes com solução salina para remoção de células não aderidas. Paralelamente, promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento foram submetidas à uma lavagem diferencial a 125 x G por 5 min, a 4 °C, seguida de três lavagens com solução salina a 750 x G, 10 min, 4 °C. Posteriormente, as células plaqueadas foram infectadas por *L. braziliensis* na proporção de 10:1 e reincubadas por 24 h, permitindo a internalização dos parasitos. Após 24 h, os poços foram lavados com solução salina para remoção dos parasitos não internalizados e, então, as células infectadas foram tratadas com diferentes concentrações de 17-DMAG, variando de 1 μM a 1 nM, após realização de diluições seriadas de 1:2, em quintuplicata. Após 72 h de tratamento, os poços foram lavados duas vezes com solução salina e, em seguida, 1 mL de Schneider completo foi adicionado por poço. As placas foram então incubadas por 6 dias em estufa B.O.D a 24 °C, permitindo a diferenciação das amastigotas viáveis nas formas promastigotas do parasito. Por fim, as promastigotas viáveis foram contadas, de forma cega e aleatória, em câmaras de Neubauer.

3.7 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG, APLICADO POR VIA INTRAPERITONEAL, NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C POR *L. braziliensis*

Para avaliar a eficácia do 17-DMAG no controle da infecção *in vivo* por *L. braziliensis*, inicialmente, trinta camundongos BALB/c com idade de 6 a 8 semanas foram contidos e tiveram inoculados na orelha, num volume de 10 μL de solução salina, 10^5 parasitos em fase estacionária, após sucessivas lavagens, como descrito no tópico 3.2, utilizando micro-seringa (BD Ultra-Fine™ II – 0,5 mL). Após duas semanas de infecção, quando no local da inoculação foi observado o aparecimento de uma pápula, os animais tiveram a espessura da orelha medida com paquímetro analógico (Köeppen – exatidão $\pm 0,1$ mm) e, em seguida, foram distribuídos em dois grupos similares em relação aos tamanhos de lesão: i) o grupo tratado, que recebeu 20 mg/kg de 17-DMAG diariamente, por via intraperitoneal (a partir de uma solução estoque inicial de 5 mg/mL de 17-DMAG em glicose a 5%) e ii) o grupo controle, que recebeu

intraperitonealmente uma solução de glicose 5% (Isofarma Industrial Farmacêutica LTDA, BRASIL) no volume equivalente ao do tratamento. A evolução da lesão nos animais foi acompanhada semanalmente, com mensuração da espessura da orelha utilizando o paquímetro. Além disso, foi avaliado também o aspecto clínico desses animais ao longo do tratamento. Após duas, quatro ou sete semanas, cinco camundongos de cada grupo foram eutanasiados com tiopental (50 mg/kg) e tiveram orelha e linfonodo removidos para análise histopatológica.

3.8 OBTENÇÃO DE PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS DE *L. braziliensis*

Diferentemente do que era observado nos primeiros experimentos de infecção *in vivo*, foi observado que, ao longo de aproximadamente um ano, após a infecção com promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária, (i) as lesões apareciam mais tardiamente, (ii) sem evolução ao longo do tempo, permanecendo em forma de pápula, (iii) regredindo rapidamente e (iv) com grande variabilidade nos tamanhos das lesões entre os animais. Para superar essas limitações, foi utilizada a lectina para o enriquecimento de formas metacíclicas da cultura de promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento.

Para o enriquecimento com a forma metacíclica dos parasitos, culturas de promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária foram, inicialmente, submetidas a uma lavagem com solução de NaCl 0,9% e centrifugadas a 750 x G, por 10 min, a 4 °C. Em seguida, o *pellet* formado foi ressuspenso em 1 mg/mL de lectina (*Bauhinia Purpurea Lectin* - Vector Laboratories) diluída em solução de NaCl 0,9%, onde os parasitos ficaram incubados por 30 min, à temperatura ambiente. Posteriormente, esses parasitos foram centrifugados a 40 x G, por 5 min a 4 °C, coletando-se, no sobrenadante obtido após a centrifugação, a forma metacíclica do parasito. Em seguida, a fração enriquecida com a forma metacíclica dos parasitos foi lavada duas vezes com solução de NaCl 0,9% e centrifugadas a 2.760 x G, por 15 min, a 4 °C. Após a última lavagem, o *pellet* final foi ressuspenso em 1 mL de solução de NaCl 0,9% e os parasitos foram homogeneizados utilizando seringa de 1 mL e agulha de insulina para desfazer rosetas. Por fim, os parasitos foram contabilizados em câmara de *Neubauer* e diluídos em solução de NaCl 0,9% de acordo com a concentração de interesse para infecção em cada experimento.

3.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO 17-DMAG, APLICADO POR VIA INTRAPERITONEAL, NO CONTROLE DA INFLAMAÇÃO CAUSADA PELA INFECÇÃO POR *L. braziliensis* EM CAMUNDONGOS BALB/c

Para avaliar o efeito do tratamento por via intraperitoneal com o 17-DMAG sobre a inflamação causada pela infecção *in vivo* por *L. braziliensis*, inicialmente, trinta camundongos BALB/c com idade de 6 a 8 semanas foram contidos e tiveram inoculados na orelha, num volume de 10 µL de solução salina, 5×10^5 parasitos em fase estacionária e enriquecidos com a fração metacíclica, obtidas conforme descrito no tópico 3.4, utilizando micro-seringa (BD Ultra-Fine™ II – 0,5 mL). Após três semanas de infecção, os animais foram distribuídos igualmente, de acordo com a espessura da orelha, em dois grupos: (i) grupo tratado, que recebeu 17-DMAG na dose de 20 mg/kg/dia, diluído em solução de glicose a 5% (Isofarma Industrial Farmacêutica LTDA, BRASIL) ou (ii) grupo controle, que recebeu apenas glicose, na dose de 20 mg/kg/dia. Os animais foram pesados diariamente e tiveram a espessura das orelhas (infectada e contralateral) mensuradas semanalmente com auxílio de um paquímetro analógico (Köeppen – exatidão $\pm 0,1$ mm). Após 2, 4, 7, 14 ou 28 dias de tratamento os animais foram eutanasiados com tiopental (50 mg/kg) e tiveram a orelha e linfonodo retroauricular removidos para análise histopatológica.

3.10 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NOS LINFONODOS DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR *L. braziliensis* E TRATADOS COM 17-DMAG POR VIA INTRAPERITONEAL

Para caracterizar o perfil do infiltrado inflamatório nos linfonodos de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados ou não com o 17-DMAG por via intraperitoneal, inicialmente, trinta camundongos BALB/c com idade de 6 a 8 semanas foram contidos e tiveram inoculados na orelha, num volume de 10 µL de solução salina, 5×10^5 parasitos em fase estacionária e enriquecidos com a fração metacíclica, obtidas conforme descrito no tópico 3.4, utilizando micro-seringa (BD Ultra-Fine™ II – 0,5 mL). Após três semanas de infecção, os animais foram distribuídos igualmente, de acordo com a espessura da orelha, em dois grupos: (i) grupo tratado, que recebeu 17-DMAG na dose de 20 mg/kg/dia, diluído em solução de glicose a 5% (Isofarma Industrial Farmacêutica LTDA, BRASIL) ou (ii) grupo controle, que recebeu apenas glicose, na dose de 20 mg/kg/dia. Os animais tiveram a espessura das orelhas (infectada e contralateral) mensuradas semanalmente com auxílio de um paquímetro analógico (Köeppen – exatidão $\pm 0,1$ mm) e, após 4, 7 ou 28 dias de tratamento os

animais foram eutanasiados com tiopental (50 mg/kg) e o linfonodo retroauricular removido para caracterização dos linfócitos por citometria de fluxo utilizando o citômetro LSR Fortessa (BD biosciences).

Para caracterização dos linfócitos, inicialmente, os linfonodos drenantes foram macerados usando pistilo e, em seguida, os linfócitos foram centrifugados a 375 x G. Posteriormente, as células foram contadas em câmaras de *Neubauer* e plaqueadas na concentração de 10^6 por poço, em duplicata para cada animal, em placas de 96 poços com fundo em U, em 200 μ L de tampão FACS [1% de SBF (GIBCO) em tampão PBS (Invitrogen) 1x, diluído em água destilada]. Em seguida, a placa contendo as células foi centrifugada a 450 x G, por 5 min, a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante dos poços foi descartado, as células foram ressuspensas com 200 μ L de tampão FACS por poço e centrifugadas novamente por 5 min, a 450 x G, 4 °C. Na sequência, o sobrenadante dos poços foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 μ L por poço de tampão FACS contendo o mix de anticorpos de superfície: Anti-CD3e Pacific blue (Invitrogen), Anti-CD4 FITC (Invitrogen), Anti-CD25 Alexa Fluor 700 (Invitrogen), Anti-CD8 PE (Invitrogen) e o marcador de viabilidade celular eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (Invitrogen). Células em poços adicionais foram ressuspensas apenas com 20 μ L por poço de tampão FACS, sem o mix de anticorpos, como controle negativo. As células foram incubadas por 30 min, a 4 °C e, em seguida, 100 μ L de tampão FACS foram adicionados por poço, para lavagem dos anticorpos de superfície. Posteriormente, a placa foi centrifugada por 5 min, a 450 x G, 4 °C e, após o descarte do sobrenadante pós centrifugação, as células foram ressuspensas com 50 μ L por poço da solução de fixação e permeabilização *Cytofix/Cytoperm* (BD biosciences), incluindo as células não marcadas, e incubadas por 20 min a 4 °C. Em seguida, foram adicionados 100 μ L por poço da solução *Perm/Wash* (BD biosciences) 1x (diluída em água destilada) e a placa foi centrifugada novamente por 5 min, 500 x G, a 4°C. Na sequência, o sobrenadante dos poços foi descartado, as células foram ressuspensas em 20 μ L por poço de solução *Perm/Wash* 1x contendo o anticorpo intracelular Anti-FOXP3 APC (Invitrogen) e incubadas por 1 h a 4 °C. Para as células não marcadas, foram adicionados 20 μ L por poço de solução *Perm/Wash* 1x. Após 1 h de incubação, foram adicionados 100 μ L de *Perm/Wash* 1x por poço e a placa foi novamente centrifugada por 5 min, 500 x G, a 4°C. Por fim, o sobrenadante dos poços foi descartado e as células foram ressuspensas com 200 μ L por poço de tampão FACS, transferidas para tubos de citometria e analisadas utilizando o citômetro LSR Fortessa (BD biosciences).

3.11 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA POR DILUIÇÃO LIMITANTE

Para avaliação da carga parasitária na orelha e linfonodo dos camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados ou não com 17-DMAG por via intraperitoneal na dose de 20 mg/kg/dia, foi utilizado o método de diluição limitante. Para isso, inicialmente, após o tratamento, os animais do grupo controle ou tratado foram eutanasiados com tiopental (50 mg/kg) e tiveram a orelha e linfonodo removidos de forma asséptica. Em seguida, os tecidos foram macerados para obtenção das células infectadas. Posteriormente, essas células foram centrifugadas a 300 x G, 10 min, 4 °C e o *pellet* formado foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI completo [meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com 25 mM de HEPES (SIGMA), 2 g/L de bicarbonato de sódio (SIGMA), 20% de soro bovino fetal inativado (GIBCO), 200 mM de glutamina (SIGMA) e 0,02 mg/mL de ciprofloxacina (CLARIS)]. Após essa etapa, 20 µL da suspensão de cada tecido foram distribuídos, em triplicata, em placa de 96 poços contendo previamente 180 µL de meio Schneider completo. Por fim, foi realizada a diluição seriada, transferindo 20 µL dos três primeiros poços para novas triplicatas, oito vezes, sequencialmente. As placas das diluições foram vedadas com *parafilm* e incubadas em estufa B.O.D. O crescimento das promastigotas em cada poço foi avaliado a cada três dias, durante quinze dias, sendo classificado com positivo, na presença de promastigotas, ou negativo, na ausência destas. Ao final do tempo de observação, para montar os gráficos dos resultados, foi atribuído o valor de 10^1 para a primeira triplicata positiva e, para os poços positivos subsequentes da diluição, a potência aumentou linearmente, isto é, 10^2 , 10^3 , 10^4 e assim sucessivamente.

3.12 AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE RECIDIVA EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR *L. braziliensis*, APÓS FINALIZAÇÃO DO TRATAMENTO COM 17-DMAG POR VIA INTRAPERITONEAL

Para avaliar a possibilidade da ocorrência de recidiva após finalização do tratamento com o 17-DMAG aplicado por via intraperitoneal, inicialmente, vinte camundongos BALB/c com idade de 6 a 8 semanas foram contidos e tiveram inoculados na orelha, num volume de 10 µL de solução salina, 5×10^5 parasitos em fase estacionária e enriquecidos com a fração metacíclica, obtidas conforme descrito no tópico 3.4, utilizando micro-seringa (BD Ultra-Fine™ II – 0,5 mL). Após três semanas de infecção, os animais foram distribuídos igualmente, de acordo com a espessura da orelha, em dois grupos: (i) grupo tratado, que recebeu 17-DMAG na dose de 20 mg/kg/dia, diluído em solução de glicose a 5% (Isofarma Industrial Farmacêutica

LTDA, BRASIL) ou (ii) grupo controle, que recebeu apenas glicose, na dose de 20 mg/kg/dia. Os animais tiveram a espessura das orelhas (infectada e contralateral) mensuradas semanalmente com auxílio de um paquímetro analógico (Köeppen – exatidão $\pm 0,1$ mm). Após 28 dias de tratamento cinco animais de cada grupo foram eutanasiados com tiopental (50 mg/kg) e tiveram a orelha e linfonodo retroauricular removidos para análise da carga parasitária por diluição limitante, conforme descrito no tópico 3.6. Os outros dez animais, cinco de cada grupo, tiveram os tratamentos suspensos e foram acompanhados por 28 dias adicionais. Por fim, esses animais foram eutanasiados com tiopental (50 mg/kg) e tiveram a orelha e linfonodo retroauricular removidos para análise da carga parasitária por diluição limitante, conforme descrito no tópico 3.11.

3.13 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO TARDIO COM 17-DMAG, POR VIA INTRAPERITONEAL, NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR *L. braziliensis*

A eficácia do tratamento tardio com 17-DMAG por via intraperitoneal foi avaliada pois simularia melhor o tratamento aos quais os pacientes com leishmaniose cutânea são submetidos, uma vez que eles, na maioria das vezes, buscam por ajuda médica apenas após a lesão ulcerada estar instalada. Para isso, vinte camundongos BALB/c com idade de 6 a 8 semanas foram contidos e tiveram inoculados na orelha, num volume de 10 μ L de solução salina, 5×10^5 parasitos em fase estacionária e enriquecidos com a fração metacíclica, obtidas conforme descrito no tópico 3.4, utilizando micro-seringa (BD Ultra-Fine™ II – 0,5 mL). Após cinco semanas de infecção, os animais foram distribuídos igualmente, de acordo com a espessura da orelha, em dois grupos: (i) grupo tratado, que recebeu 17-DMAG na dose de 20 mg/kg/dia, diluído em solução de glicose a 5% (Isofarma Industrial Farmacêutica LTDA, BRASIL) ou (ii) grupo controle, que recebeu apenas glicose, na dose de 20 mg/kg/dia. Os animais tiveram a espessura das orelhas (infectada e contralateral) mensuradas semanalmente com auxílio de um paquímetro analógico (Köeppen – exatidão $\pm 0,1$ mm). Após 28 dias de tratamento os animais foram eutanasiados com tiopental (50 mg/kg) e cinco animais de cada grupo tiveram a orelha e linfonodo retroauricular removidos para análise da carga parasitária por diluição limitante, conforme descrito no tópico 3.6. Os outros cinco animais de cada grupo tiveram a orelha e linfonodo retroauricular removidos para análise histopatológica.

3.14 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS DE CAMUNDONGOS BALB/c SAUDÁVEIS OU INFECTADOS POR *L. braziliensis* E TRATADOS OU NÃO COM 17-DMAG POR VIA INTRAPERITONEAL

Após a remoção, os tecidos extraídos dos animais, como orelha, baço, fígado, rins e linfonodo, foram incubados por 48 h em solução de formalina ácida (5% de ácido acético glacial, 10% de formaldeído e 85% de etanol absoluto), que permite a fixação e manutenção da integridade do tecido. Em seguida, a formalina ácida foi substituída por álcool 70% e as amostras foram enviadas para a Plataforma de Histotecnologia do IGM, onde o material foi processado e preparado para análise. Brevemente, as amostras foram banhadas em solução de eosina e, em seguida, mantidas em álcool 70% até o seu emblocamento em parafina. Após o emblocamento, os tecidos foram cortados com um micrótomo e, por fim, os cortes finos e uniformes com espessura de 3 a 4 μm foram corados com hematoxilina e eosina (coloração HE), seguindo o protocolo da Plataforma. As análises histopatológicas dos tecidos foram realizadas sob a supervisão de Dr. Washington Luís Conrado dos Santos ou Dra. Isadora dos SANTOS Lima, patologistas colaboradores do projeto.

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em caso de distribuição gaussiana dos dados foi utilizado o teste t de Student para comparação entre dois grupos, ou o teste One-way ANOVA com o pós-teste de Tukey, para comparação entre três ou mais grupos. Em caso de distribuição não gaussiana, foi utilizado o teste U de Mann-Whitney, para comparação entre dois grupos, ou o teste de Kruskal-Wallis, para comparação entre três ou mais grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p < 0,05$. As análises estatísticas e a construção dos gráficos serão realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software Inc).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO 17-DMAG SOBRE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA (BMMΦ), *IN VITRO*

A avaliação da toxicidade do 17-DMAG sobre BMMΦ mostrou que o fármaco nas concentrações de 50 e 25 μM causaram a morte de 100% das células e que na concentração de 12,5 μM foi letal para mais de 96% das células expostas (fig. 12), enquanto a partir da concentração de 6,25 μM do 17-DMAG até a menor concentração testada (0,024 μM), foi observado um aumento gradual da viabilidade destas células. Dessa forma, após 72 h de exposição, a concentração capaz de causar toxicidade a 50% dos macrófagos (CC_{50}) foi de $3,2 \pm 1,06 \mu\text{M}$ (fig. 12).

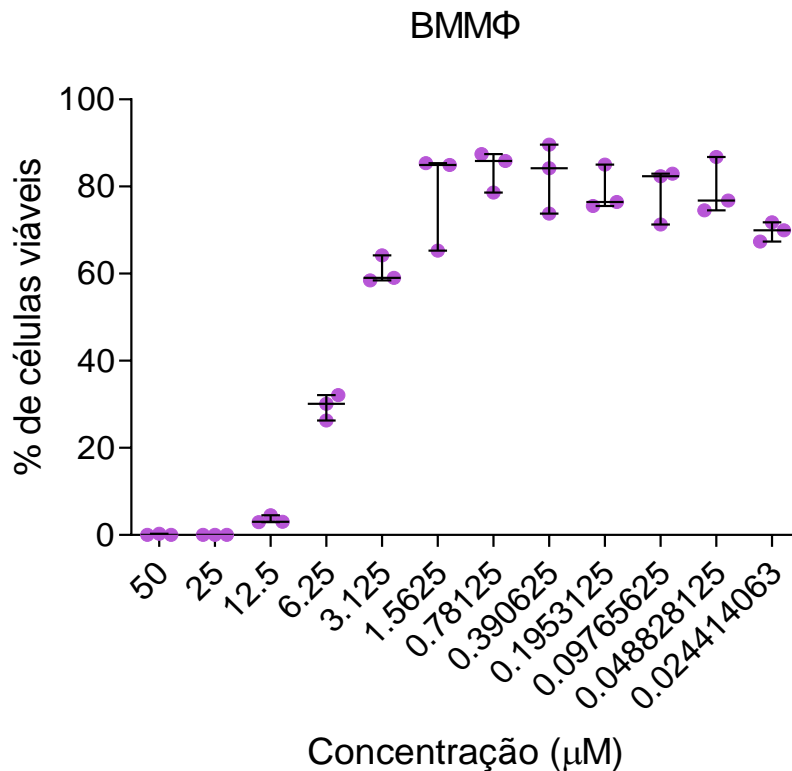


Figura 12 – Toxicidade do 17-DMAG sobre macrófagos derivados de medula óssea (BMMΦ), *in vitro*. BMMΦ foram plaqueados na concentração de 5×10^4 células por poço, em placa de 96 poços e incubados com diferentes concentrações do 17-DMAG, em 200 μL de meio DMEM low completo. Após 48 h de exposição, 10% de Alamar blue (v/v) foi adicionado aos poços e as células foram reincubadas por 24 h adicionais. Ao final de 72 h de exposição ao composto, a redução do Alamar blue nos poços foi lida em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O gráfico é representativo de cinco experimentos independentes realizados em triplicata e o valor do CC_{50} é dado pela média deles.

Fonte: Elaborado pela autora

4.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG SOBRE PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis*, *IN VITRO*

A avaliação da eficácia do 17-DMAG sobre promastigotas axênicas de *L. braziliensis* mostrou que, nas concentrações de 2 e 1 μM , o composto causou a morte de 93,12% e 88,66% dos parasitos, respectivamente (fig. 13). Uma vez que o valor de CC_{50} para BMM Φ foi de 3,2 μM , é importante ressaltar que a concentração de 2 μM é também potencialmente tóxica para os macrófagos. A partir da concentração de 0,5 μM até a menor concentração testada (~ 1 nM), todos os valores de viabilidade dos parasitos foram de quase 100% ($91,24 \pm 4,04$ %) (fig. 13). De acordo com a média dos valores de quatro experimentos realizados de forma independente, em triplicata, a concentração do 17-DMAG capaz de causar a morte de 50% dos parasitos na sua forma promastigota (IC_{50}) foi $674,2 \pm 0,07$ nM (fig. 13). Comparativamente, os resultados mostram que o 17-DMAG é quase cinco vezes mais tóxico para promastigotas de *L. braziliensis* que para os macrófagos.

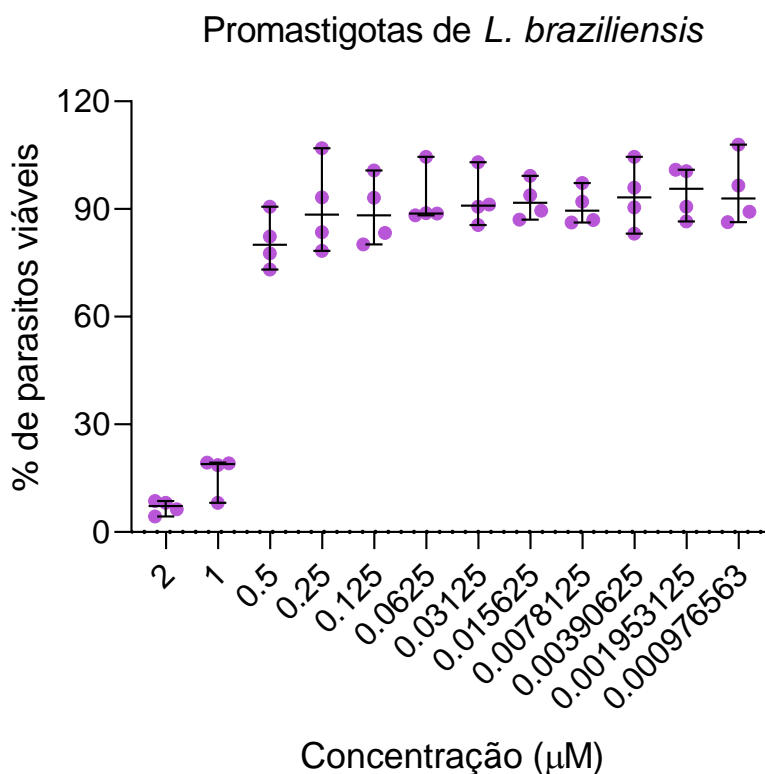


Figura 13 – Eficácia do 17-DMAG sobre promastigotas axênicas de *L. braziliensis*. Promastigotas axênicas de *L. braziliensis* foram plaqueadas na concentração de 4×10^5 parasitos por poço, em placa de 96 poços e incubados com diferentes concentrações do 17-DMAG, em 200 μL de meio Schneider completo. Após 70 h de exposição, 10% de Alamar blue (v/v) foi adicionado aos poços e os parasitos foram reincubadas por 2 h adicionais. Ao final de 72 h de exposição ao composto, a redução do Alamar blue nos poços foi lida em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O gráfico apresenta a mediana, de cada concentração, de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. O valor do IC_{50} é dado pela média dos valores dos quatro experimentos.

Fonte: Elaborado pela autora

4.3 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE BMMΦ POR *L. braziliensis*, *IN VITRO* (ENSAIO DE VIABILIDADE INTRACELULAR)

O tratamento de BMMΦ infectados por *L. braziliensis* com o 17-DMAG nas concentrações de 1000 a 15,6 nM causou a morte de aproximadamente 100% dos parasitos, quando comparados ao grupo controle (fig. 14). A partir da concentração de 7,8 nM, até a menor concentração testada (0,9 nM) foi observado um aumento gradativo na viabilidade dos parasitos (fig. 14). Dessa forma, foi possível calcular que o valor do IC₅₀ do 17-DMAG para amastigotas intracelulares foi de $7,4 \pm 3,27$ nM (média de quatro experimentos realizados em quintuplicata, de maneira independente).

Em conjunto, os resultados dos ensaios realizados com o 17-DMAG *in vitro* mostram que este fármaco é mais de 90 vezes mais eficaz contra a forma amastigota intracelular de *L. braziliensis* que contra a forma promastigota. Adicionalmente, quando comparado com a toxicidade causada sobre BMMΦ, foi mostrado que o 17-DMAG é quase cinco vezes mais tóxico para promastigotas axênicas de *L. braziliensis* e mais de 430 vezes mais tóxico para amastigotas intracelulares [índice de seletividade (IS) = 432,43].

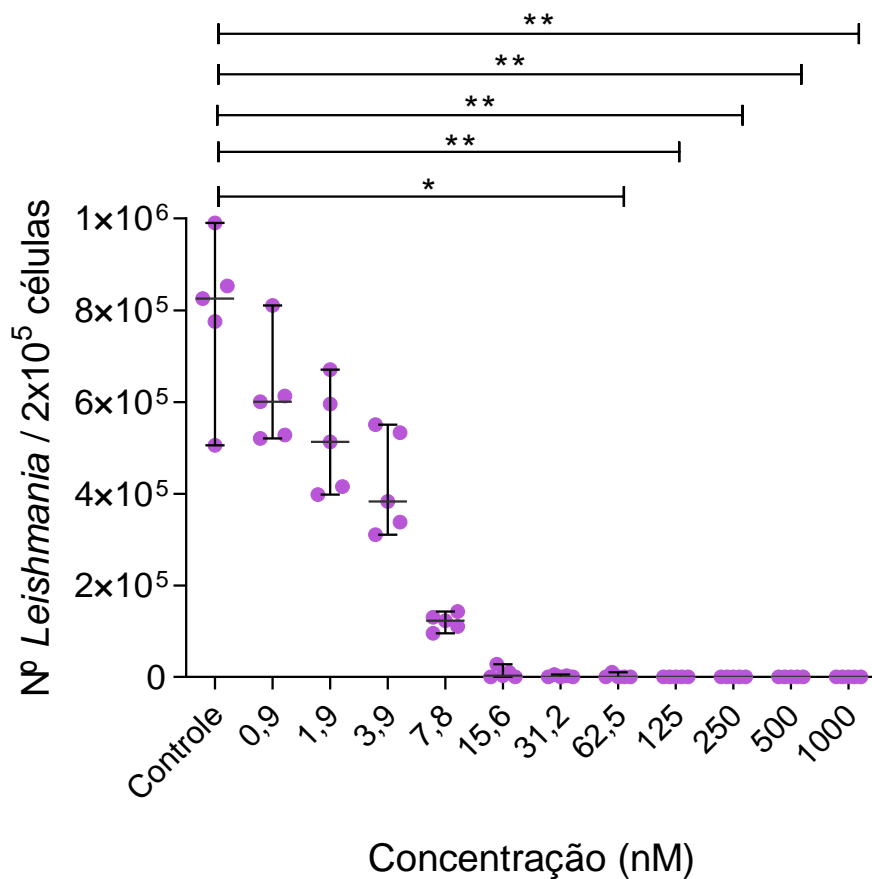


Figura 14 – Eficácia do 17-DMAG no controle da infecção de BMMΦ por *L. braziliensis*, *in vitro* (ensaio de viabilidade intracelular). BMMΦ foram plaqueados na concentração de 2×10^5 parasitos por poço, em placas de 24 poços, e infectados por *L. braziliensis* na proporção de 10:1. Após 24 h, as células infectadas foram tratadas ou não com diferentes concentrações do 17-DMAG. Após 72 h de tratamento, o meio de cultura dos poços foi substituído por meio Schneider completo, permitindo a liberação do compartimento intracelular e diferenciação dos parasitos intracelulares nas formas promastigotas. Após 6 dias de diferenciação, os parasitos viáveis foram contabilizados em câmara de Neubauer. O gráfico é representativo de quatro experimentos independentes realizados em quintuplicata e o valor do IC_{50} é dado pela média deles. Teste Kruskal-Wallis, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

Fonte: Elaborado pela autora

4.4 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG, APLICADO POR VIA INTRAPERITONEAL, NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C POR *L. braziliensis*

Previamente, um ensaio piloto foi realizado com camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados com o 17-DMAG nas doses de 20 mg/kg/dia, 30 mg/kg a cada dois dias ou 50 mg/kg a cada cinco dias. Este ensaio mostrou que a dose de 20 mg/kg/dia se apresentou como o melhor esquema terapêutico a ser utilizado *in vivo*, por causar redução da espessura da orelha e do tamanho do linfonodo, sem causar mortalidade nos animais (dados não publicados). O tratamento de camundongos infectados por *L. braziliensis* com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG por via intraperitoneal causou uma redução do tamanho da lesão a partir da segunda

semana de tratamento, quando comparado ao grupo controle (fig. 15A). A partir da quarta semana de tratamento, até o final do experimento, houve diminuição intensa do tamanho da lesão nos animais tratados, chegando a zero a diferença entre a orelha infectada e contralateral, na maioria dos animais (fig. 15A). A maior diferença do tamanho da lesão entre os grupos ocorreu na quinta semana de tratamento quando, no grupo controle, observa-se o pico do tamanho da lesão, enquanto, no grupo tratado, não se observam lesões (fig. 15A). Após duas, quatro ou sete semanas de tratamento foi observada redução da espessura da lesão na orelha dos animais tratados com o 17-DMAG, em comparação aos animais do grupo controle (fig. 15A). Após duas semanas de tratamento, a média da espessura da orelha dos animais do grupo tratado foi quase seis vezes menor que a média dos animais do grupo controle ($0,085 \pm 0,111$ mm vs $0,482 \pm 0,239$ mm, respectivamente – Teste *t* não pareado, ** $p < 0,01$) (fig. 15A). Após quatro semanas de tratamento, essa diferença foi mais de sete vezes menor para o grupo tratado, em comparação ao grupo controle ($0,08 \pm 0,103$ mm vs $0,592 \pm 0,415$ mm, respectivamente – Teste *t* não pareado, * $p < 0,05$) (fig. 15A). Por fim, após sete semanas de tratamento, não foram observadas lesões nas orelhas dos animais do grupo tratado, tendo este grupo a mediana da espessura da orelha igual a zero (Q1: 0,000; Q3: 0,007), enquanto, para os animais do grupo controle, a mediana da espessura da orelha foi de 0,565 mm (Q1: 0,465; Q3: 0,925) e ainda foram observadas lesões discretas (Teste Mann-Whitney, ** $p < 0,005$) (fig. 15A). Ao avaliar a área sob a curva (AUC) da diferença do tamanho da lesão na orelha entre os grupos controle e tratado ao longo do tempo de tratamento, foi observado que a mediana da AUC referente à espessura da lesão nos animais do grupo tratado foi quase sete vezes menor que a dos camundongos do grupo controle [0,28 (Q1: 0,15; Q2: 0,55) vs 1,91 (Q1: 0,31; Q2: 4,56), respectivamente - Teste Mann-Whitney, *** $p < 0,005$) (fig. 15B).

Adicionalmente, a AUC da diferença do tamanho da lesão na orelha dos grupos controle e tratado foi avaliada a cada ponto do tratamento, isto é, após duas (fig. 15C), quatro (fig. 15D) ou sete (fig. 15E) semanas de tratamento. Os resultados mostraram que, após duas semanas de tratamento, a média da AUC dos animais tratados foi mais de três vezes menor que a média da AUC dos animais do grupo controle ($0,147 \pm 0,097$ vs $0,498 \pm 0,33$, respectivamente – Teste *t* não pareado, * $p < 0,05$) (fig. 15C). Apesar do resultado da curva geral da espessura da lesão ter mostrado uma redução intensa e gradual da lesão nos animais do grupo tratado a partir de duas semanas de tratamento (fig. 15A), durante quatro semanas, não foi observada diferença estatística entre a média das AUCs do tamanho das lesões dos grupos tratado e controle ($0,405 \pm 0,213$ vs $1,456 \pm 1,289$, respectivamente - Teste *t* não pareado, $p = 0,179$) (fig. 15D). No grupo tratado durante sete semanas foi observado resultado similar aos dados observados até

duas semanas de tratamento, onde a média da AUC dos animais tratados foi quase dez vezes menor que a média da AUC dos animais do grupo controle ($0,573 \pm 0,362$ vs $5,193 \pm 1,052$, respectivamente – Teste t não pareado, **** $p < 0,0005$) (fig. 15E).

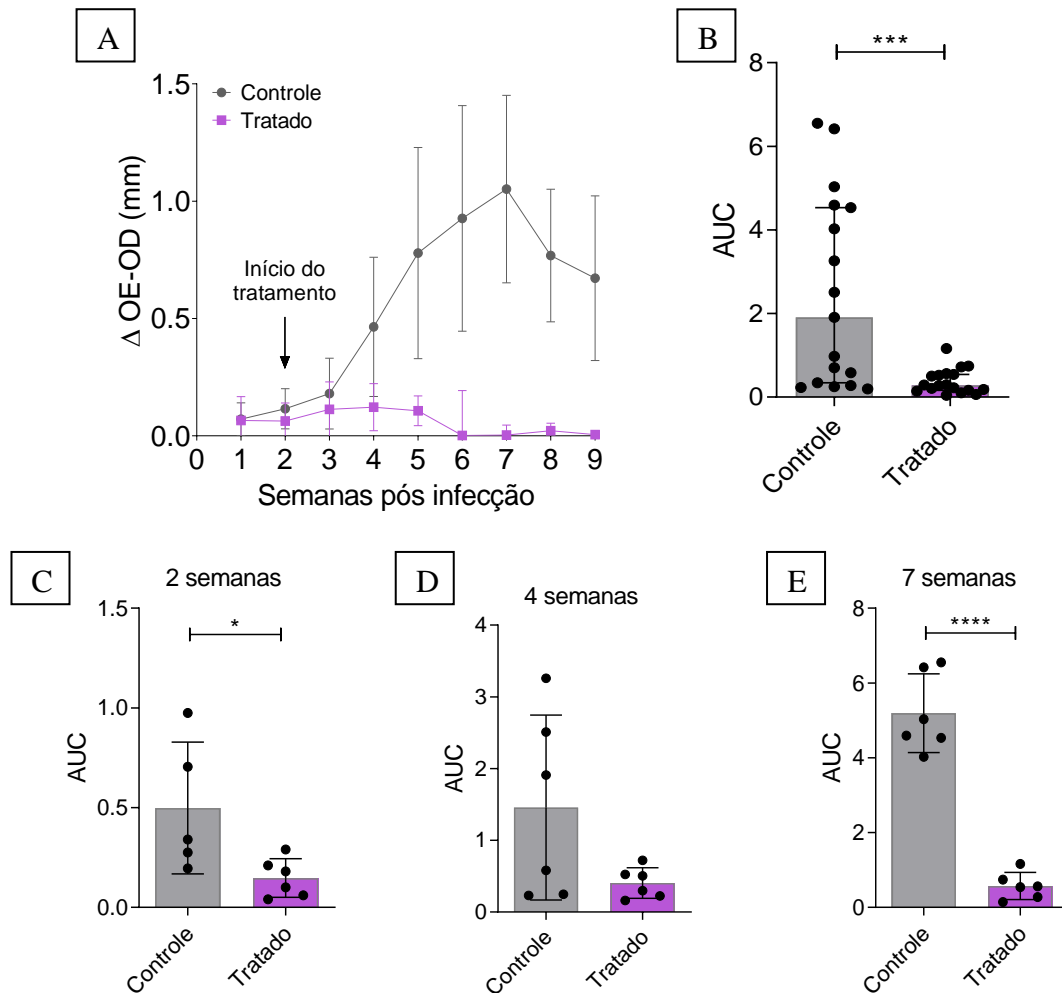


Figura 15 – Efeito do tratamento com 17-DMAG por via intraperitoneal no desenvolvimento de lesões em camundongos infectados por *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 10^5 promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária e, após duas semanas de infecção, foram tratados ou não com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG durante duas, quatro ou sete semanas, por via intraperitoneal. Os resultados são expressos como a diferença da espessura da orelha infectada em relação à contralateral. (A) Espessura semanal da lesão na orelha dos animais tratados ou não com o 17-DMAG; (B) Área sob a curva (AUC) da espessura das lesões mostradas em “A” - Teste Mann-Whitney, **** $p = 0,001$. (C-E) Área sob a curva (AUC) da espessura da lesão dos animais tratados ou não com o 17-DMAG após duas (C), quatro (D) ou sete (E) semanas de tratamento – Teste t não pareado, * $p < 0,05$; *** $p = 0,001$; **** $p < 0,0005$.

Fonte: Elaborado pela autora

As imagens representativas dos tamanhos dos linfonodos e aspecto das lesões na orelha infectada dos animais tratados ou não com o 17-DMAG ao longo de sete semanas são mostradas na figura 16. Após duas semanas de tratamento com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG por via intraperitoneal, o tamanho da lesão da orelha (fig. 16A) e o tamanho do linfonodo (fig. 16B)

dos animais tratados foram claramente menores em comparação com os do grupo controle (fig. 16G e H). O mesmo pode ser observado após quatro (fig. 16C-D; I-J) ou sete semanas de tratamento (fig. 16E-F; K-L), tempos em que, no grupo tratado, as lesões nas orelhas infectadas foram quase imperceptíveis visualmente (fig. 16I; K) e com diminuição progressiva do tamanho do linfonodo (fig. 16J; L), em comparação aquelas do grupo controle (fig. 16C-D; E-F).

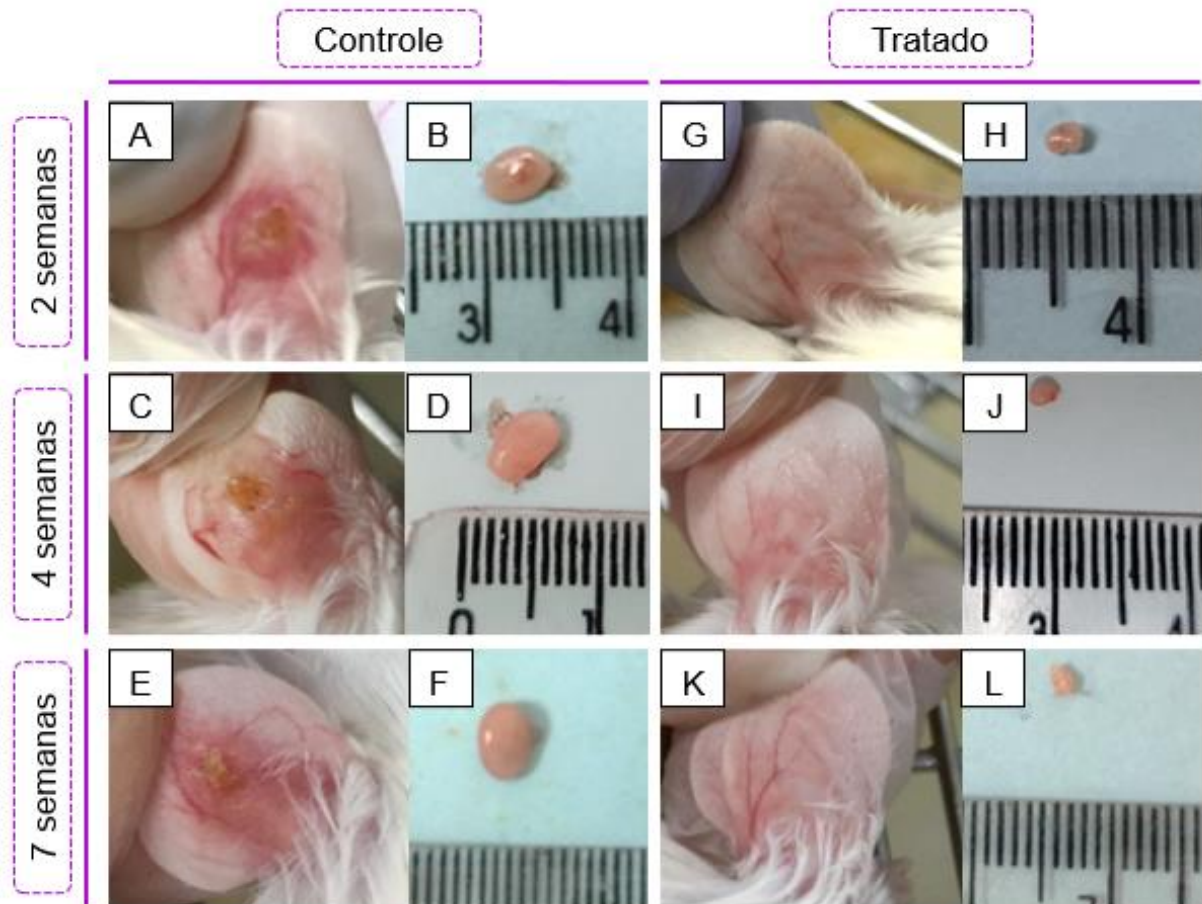


Figura 16 – Imagens representativas das lesões na orelha e dos linfonodos de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados ou não com o 17-DMAG por via intraperitoneal durante 2, 4 ou 7 semanas. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 10^5 promastigotas em fase estacionária de *L. braziliensis* e, após duas semanas, foram tratados, por via intraperitoneal, com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG (A-F) ou com glicose, como controle (G-L). Os animais foram eutanasiados e tiveram a orelha (A; C; E; G; I; K) e linfonodo (B; D; F; H; J; L) removidos para análise após duas (A; B; G; H), quatro (C; D; I; J) ou sete semanas de tratamento (E; F; K; L).

Fonte: Elaborado pela autora

Quanto ao aspecto clínico dos animais, foi observado que apenas aqueles tratados com o 17-DMAG por tempo mais prolongado (sete semanas) apresentaram sinais de toxicidade, como desidratação, olhos fechados e com secreção, e fezes ressecadas. Em conjunto, esses resultados mostram que o 17-DMAG apresenta alta eficácia para o tratamento da leishmaniose tegumentar, porém, com toxicidade quando utilizado por tempos prolongados.

As orelhas dos animais dos grupos controle e tratado foram removidas após duas, quatro ou sete semanas de tratamento e as análises histopatológicas destes tecidos são mostrados na figura 17.

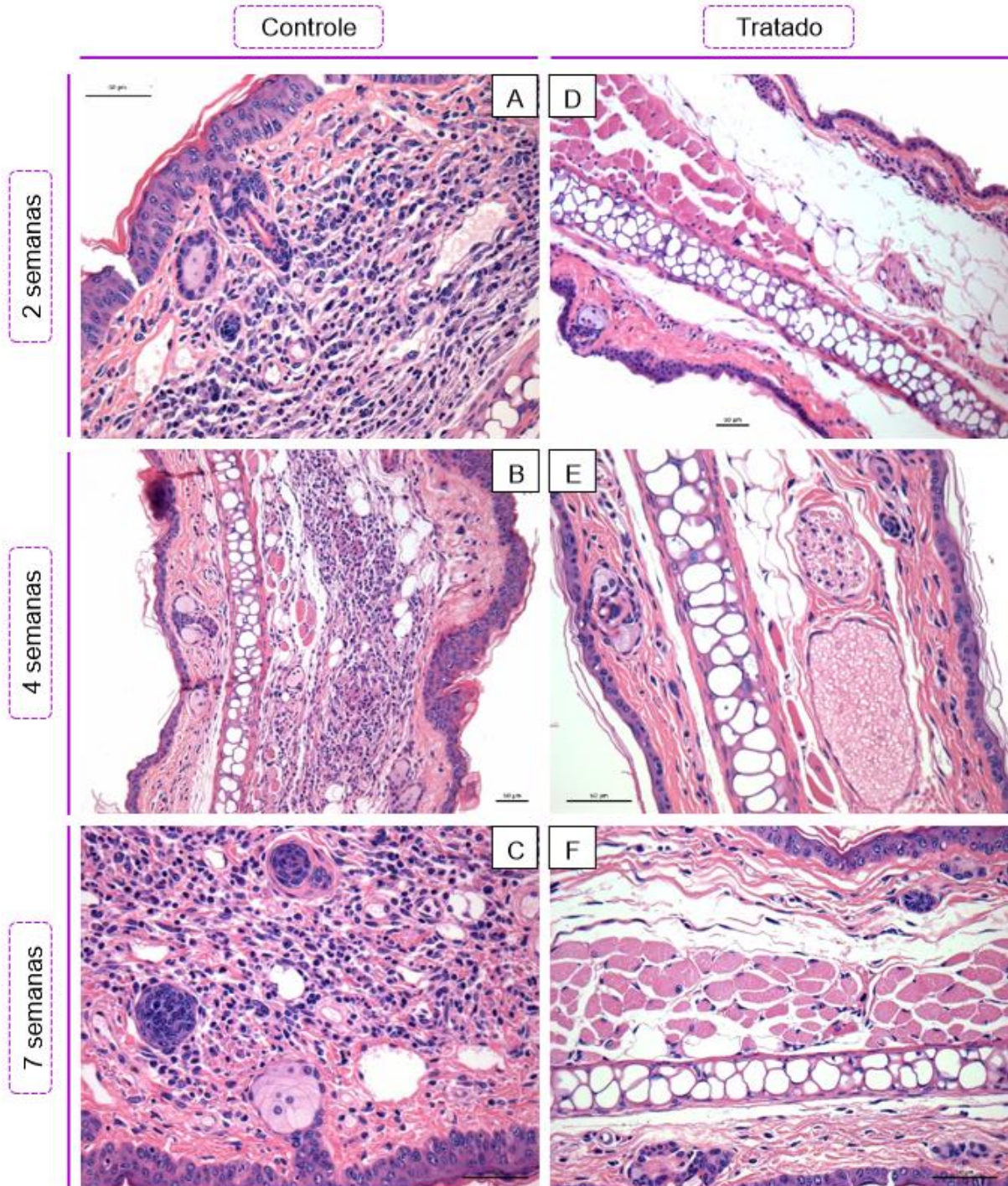


Figura 17 - Cortes histológicas das orelhas de camundongos infectados com *L. braziliensis* e tratados ou não com o 17-DMAG por via intraperitoneal durante 2, 4 ou 7 semanas. Após a eutanásia dos animais infectados na orelha com 10^5 promastigotas em fase estacionária de *L. braziliensis* e tratados (D-F) ou não (A-C) com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG por via intraperitoneal durante duas (A e D), quatro (B e E) ou sete semanas (C e F), as orelhas dos animais foram retiradas, embocadas em parafina, cortadas em micrótomo e coradas com HE para análise histopatológica.

Fonte: Elaborado pela autora

A análise histopatológica das orelhas dos animais mostrou que, em todos os tempos avaliados, os animais do grupo controle apresentaram processo inflamatório, variando de moderado (fig. 17A e B) a intenso (fig. 17C), o que não foi observado no tecido da orelha do grupo tratado, em nenhum dos tempos avaliados (fig. 17D-F), corroborando com o aspecto das lesões nas orelhas dos animais, após cada tempo de tratamento (fig. 16). Após duas semanas observou-se na orelha no grupo controle a presença de infiltrado inflamatório composto, principalmente, por macrófagos e linfócitos (fig. 17A). Após quatro semanas, a lesão da orelha dos animais no grupo controle foi caracterizada pela predominância de neutrófilos e células mononucleadas (fig. 17B). Ao final da sétima semana de tratamento, o infiltrado inflamatório na orelha dos animais do grupo controle apresentou células mono e polinucleadas, além de células epitelióides (fig. 17C). Em conjunto, essas análises corroboram com os resultados mostrados anteriormente (fig. 16), e indicam que, ao longo do tempo de tratamento, o 17-DMAG causa redução progressiva do processo inflamatório no sítio da lesão causada pela infecção por *Leishmania* e que, a partir de duas semanas de tratamento essa inflamação está ausente no local da infecção. Esses resultados evidenciam o potencial leishmanicida *in vivo* deste fármaco, quando aplicado por via intraperitoneal.

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO 17-DMAG, APLICADO POR VIA INTRAPERITONEAL, NO CONTROLE DA INFLAMAÇÃO CAUSADA PELA INFECÇÃO POR *L. braziliensis* EM CAMUNDONGOS BALB/c

Uma vez que foi observado, no ensaio de tratamento intraperitoneal com o 17-DMAG durante duas, quatro ou sete semanas, que os animais do grupo tratado apresentavam uma redução do tamanho da lesão a partir de duas semanas de tratamento (fig. 15 e 16) e que, histologicamente, foi observada a redução gradual do processo inflamatório a partir deste mesmo tempo de tratamento (fig. 17), o efeito do 17-DMAG no controle da inflamação causada pela infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c foi avaliada após 2, 4, 7, 14 e 28 dias de tratamento.

Para avaliar o estado geral dos animais frente o tratamento, eles foram pesados semanalmente e não foram observadas diferenças estatísticas no peso desses animais, quando comparado com o peso daqueles não tratados ($23,87 \pm 0,41$ vs $23,31 \pm 0,32$, respectivamente) (fig. 18A e B) ao longo das quatro semanas de tratamento.

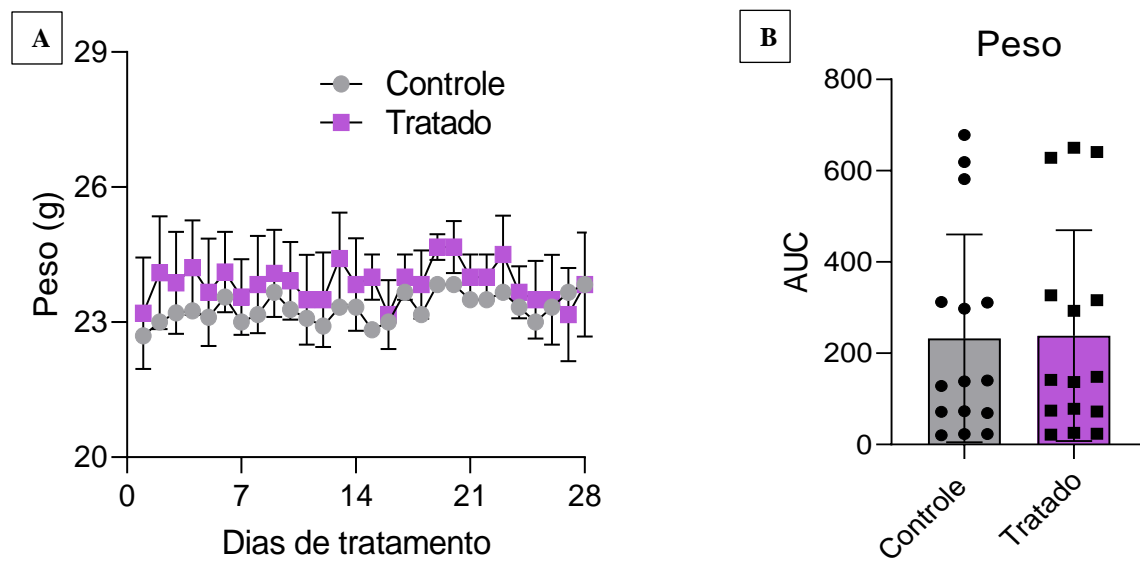


Figura 18 - Avaliação do peso de camundongos infectados por *L. braziliensis* e tratados ou não com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG por via intraperitoneal, ao longo de 28 dias. Camundongos BALB/c foram infectados com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após três semanas de infecção, foram tratados ou não com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG. (A) Mensuração diária do peso dos camundongos dos grupos tratado e controle. (B) Área sob a curva do peso mostrado em “A” - Teste *t* não pareado.

Fonte: Elaborado pela autora

Em relação à resposta ao tratamento, após sete dias e em todos os tempos seguintes avaliados, a diferença da espessura da orelha infectada em relação à contralateral foi menor que a diferença da espessura observada nos animais do grupo controle (fig. 19A). Apesar disso, nesse experimento, não foi observada diferença estatística entre os grupos na análise da área sob a curva (AUC) das medidas das lesões durante o período do tratamento [grupo controle: 0,585 (Q1: 0,239; Q3: 1,435); grupo tratado: 0,49 (Q1: 0,22; Q3: 0,75)] (fig. 19B).

A avaliação da diferença da espessura da orelha infectada, em relação à contralateral nos diferentes tempos do estudo mostrou que, após dois (fig. 19C e D) ou quatro dias de tratamento (fig. 19E e F) não houve diferença entre os grupos controle e tratado (dois dias: $0,0619 \pm 0,013$ vs $0,084 \pm 0,042$, respectivamente; quatro dias: $0,231 \pm 0,158$ vs $0,282 \pm 0,142$, respectivamente). Entretanto, após sete dias de tratamento e em todos os tempos seguintes avaliados, a espessura da orelha dos animais do grupo tratado foi estatisticamente menor que dos animais do grupo controle (fig. 19G-L). Após sete dias de tratamento, a área sob a curva (AUC) da espessura da orelha dos animais do grupo tratado foi duas vezes menor que dos animais do grupo controle ($0,257 \pm 0,202$ vs $0,534 \pm 0,332$, respectivamente - Teste *t* não pareado, * $p < 0,05$) (Fig. 19G e H). Após 14 dias de tratamento, a área sob a curva (AUC) da espessura da orelha dos animais do grupo tratado foi 2,5 vezes menor que dos animais do grupo controle ($0,438 \pm 0,344$ vs $1,11 \pm 0,638$, respectivamente - Teste *t* não pareado, * $p < 0,05$) (Fig.

19I e J). Por fim, após 28 dias de tratamento, a área sob a curva (AUC) da espessura da orelha dos animais do grupo tratado foi mais de 5 vezes menor que dos animais do grupo controle ($0,603 \pm 0,598$ vs $3,295 \pm 0,576$, respectivamente - Teste t não pareado, $** p = 0,005$) (Fig. 19K e L).

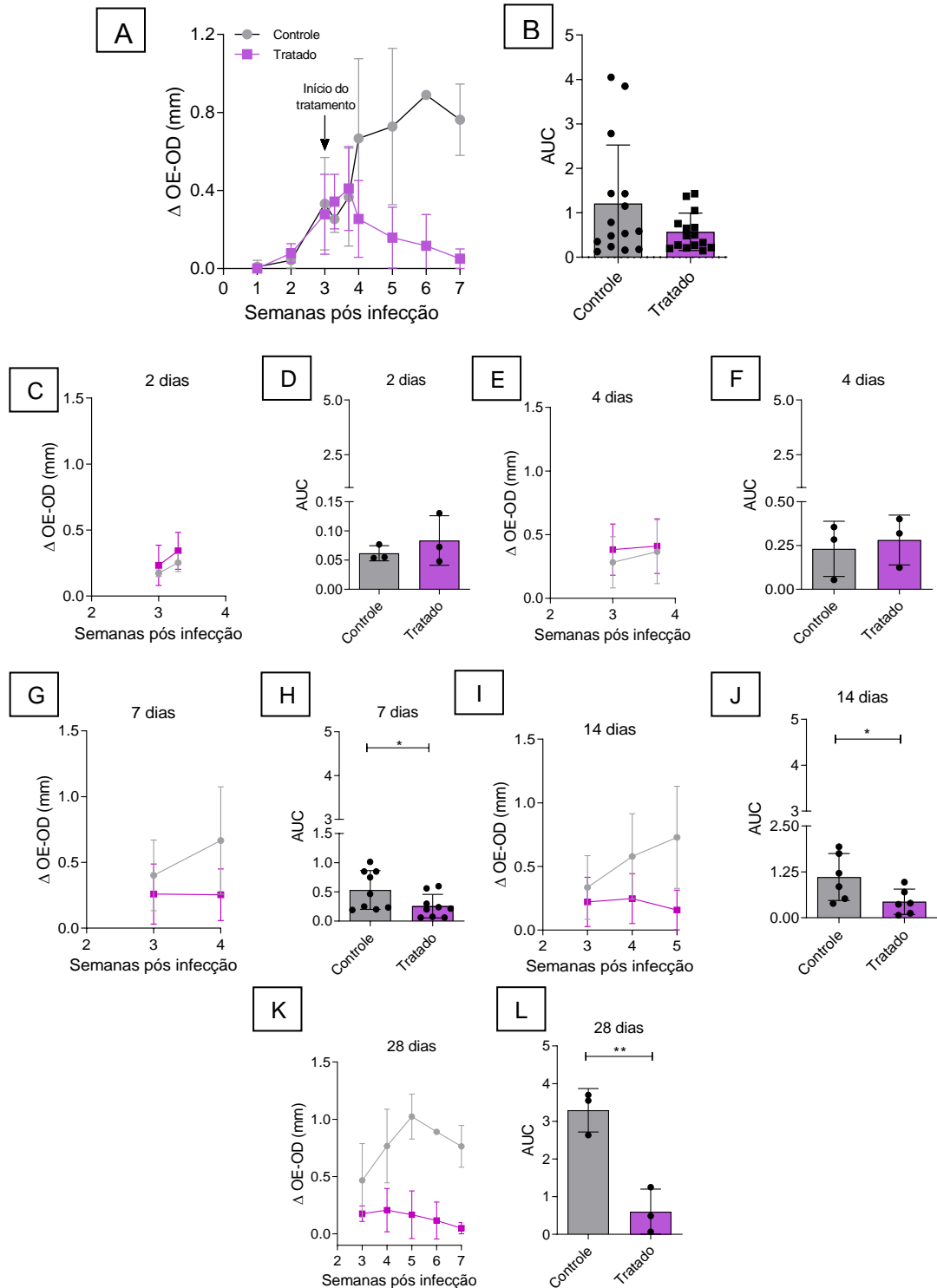


Figura 19 – Efeito da aplicação do 17-DMAG por via intraperitoneal em tempos iniciais de tratamento de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após três semanas de infecção, foram tratados por via intraperitoneal com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG ou glicose, como controle, durante 2, 4, 7, 14 ou 28 dias. Os resultados são expressos como a diferença da espessura da orelha infectada em relação à contralateral. (A) Espessura semanal da lesão na orelha dos animais tratados ou não com o 17-DMAG durante 28 dias. (B) Área sob a curva (AUC) da espessura das lesões mostradas em “A” - Teste Mann-Whitney. (C, E, G, I e K) Espessura semanal da lesão na orelha dos animais tratados ou não com o 17-DMAG durante 2 (C), 4 (E), 7 (G), 14 (I) ou 28 dias (K); (D, F, H, J e L) Área sob a curva (AUC) da espessura das lesões mostradas em “A”, “C”, “E”, “G”, “I” e “K”, respectivamente - Teste *t* não pareado, * $p < 0,05$; ** $p = 0,005$.

Fonte: Elaborado pela autora

As imagens representativas do aspecto das lesões na orelha e do tamanho dos linfonodos dos animais tratados ou não com o 17-DMAG ao longo de 28 dias são mostradas na figura 20. Após dois dias de tratamento com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG por via intraperitoneal, não houve diferença entre o tamanho da lesão da orelha (fig. 20A e K) e o tamanho do linfonodo (fig. 20B e L) dos animais tratados (fig. 20K e L), em comparação com os animais do grupo controle (fig. 20A e B). Após quatro dias de tratamento, o tamanho da lesão na orelha dos animais do grupo controle (fig. 20C) foi maior que no grupo tratado (fig. 20M), apesar de não ter sido observada diferença no tamanho do linfonodo entre os grupos (fig. 20D e N, respectivamente). Após 7 (fig. 20E, F, O e P), 14 (fig. 20G, H, Q e R) ou 28 dias de tratamento (fig. 20I, J, S e T), tanto o tamanho da lesão na orelha (fig. 20E, G, I, O, Q e S), quanto o tamanho dos linfonodos (fig. 20F, H, J, P, R e T) foram menores no grupo tratado (fig. 20O-T), em comparação ao grupo controle (fig. 20E-J).

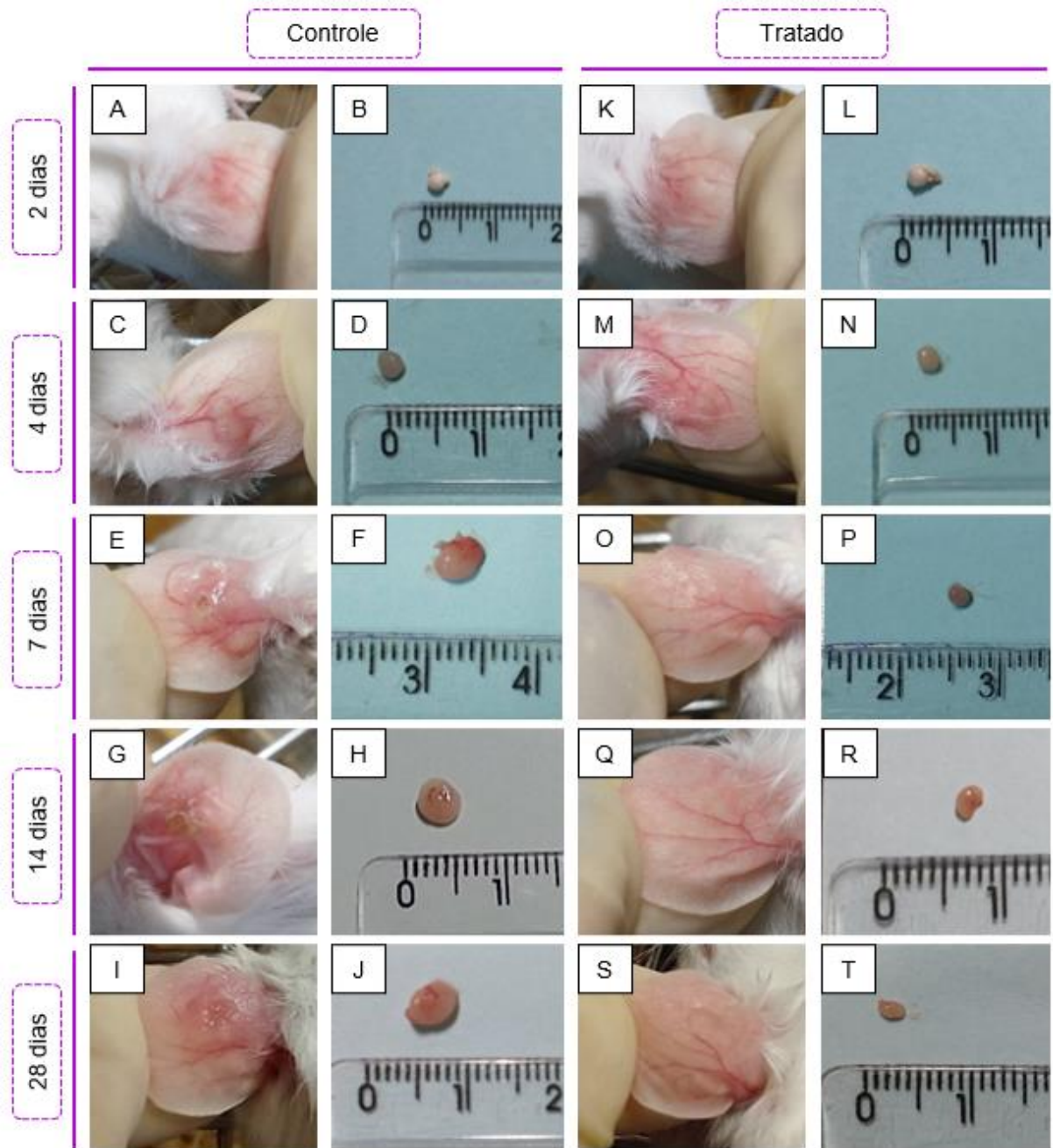


Figura 20 – Imagens representativas das lesões nas orelhas e dos linfonodos de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados ou não com o 17-DMAG por via intraperitoneal durante 2, 4, 7, 14 ou 28 dias. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após três semanas de infecção, foram tratados por via intraperitoneal com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG (K-T) ou glicose (A-J), como controle. Os animais foram eutanasiados e tiveram a orelha (A; C; E; G; I; K; M; O; Q; S) e linfonodo (B; D; F; H; J; L; N; P; R; T) removidos para análise após 2 (A; B; K; L), 4 (C; D; M; N), 7 (E; F; O; P), 14 (G; H; Q; R) ou 28 dias (I; J; S; T) de tratamento.

Fonte: Elaborado pela autora

Adicionalmente, foi realizada a análise histopatológica das orelhas dos animais infectados por *L. braziliensis* e tratados ou não com o 17-DMAG por via intraperitoneal durante 2, 4, 7, 14 ou 28 dias e os resultados são mostrados na figura 21.

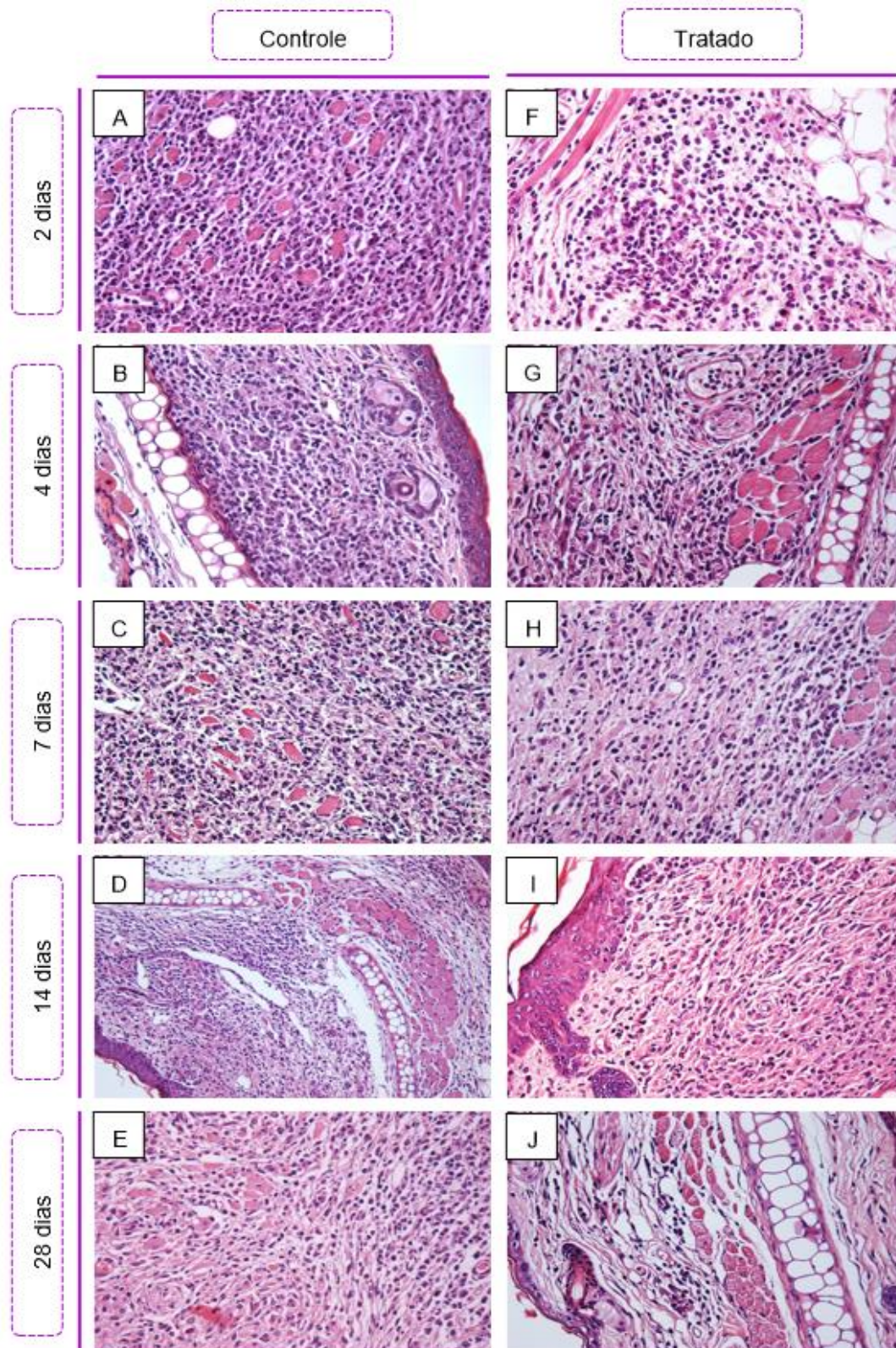


Figura 21 - Cortes histológicas das orelhas de camundongos infectados com *L. braziliensis* e tratados ou não com o 17-DMAG por via intraperitoneal durante 2, 4, 7, 14 ou 28 dias. Após a eutanásia dos animais infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e tratados (F-J) ou não (A-E) com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG por via intraperitoneal durante 2 (A e F), 4 (B e G), 7 (C e H), 14 (D e I) ou 28 dias (E e J), as orelhas dos animais foram retiradas, emblocadas em parafina, cortadas em micróto e coradas com HE para análise histopatológica. Aumento de 40x.

Fonte: Elaborado pela autora

Após 2 dias de tratamento foi observada uma redução da intensidade do infiltrado inflamatório no grupo tratado (fig. 21F), em comparação com o grupo controle (fig. 21A). Além disso, em ambos os grupos houve a predominância de células polimorfonucleares, sendo mais evidente no grupo controle. Após 4 dias de tratamento não foi observada diferença na intensidade do infiltrado inflamatório e, tanto para o grupo controle (fig. 21B) quanto para o grupo tratado (fig. 21G) houve predominância da presença de células polimorfonucleares e linfócitos. Após 7 dias de tratamento, observa-se uma intensa redução da intensidade do infiltrado inflamatório no grupo tratado (fig. 21H), em comparação ao grupo controle (fig. 21C) além de, no grupo controle haver muitos macrófagos e, no grupo tratado, a presença dessas células ter se tornado rara. De maneira similar, após 14 dias de tratamento, a intensidade da inflamação no grupo controle (fig. 21D) é maior que no grupo tratado (fig. 21I) e observa-se a predominância de macrófagos no grupo controle e a presença rara destes no grupo tratado. Por fim, após 28 dias de tratamento, o infiltrado inflamatório no grupo controle (fig. 21E) está presente de maneira difusa, com a presença moderada de macrófagos e células polimorfonucleares enquanto, no grupo tratado, a inflamação é quase inexistente no local da infecção. Em conjunto, essas análises corroboram com os resultados mostrados anteriormente, indicando que o 17-DMAG causa redução do processo inflamatório no sítio da lesão causada pela infecção por *Leishmania* a partir dos primeiros dias de tratamento e evidenciam o potencial leishmanicida *in vivo* deste fármaco, quando aplicado por via intraperitoneal.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE LINFÓCITOS NOS LINFONODOS DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR *L. braziliensis* E TRATADOS COM 17-DMAG POR VIA INTRAPERITONEAL

Em razão das diferenças na composição do infiltrado inflamatório observadas entre o grupo tratado com o 17-DMAG e o grupo controle, foi realizada a imunofenotipagem de linfócitos presentes no linfonodo desses grupos de animais, por meio da citometria de fluxo.

Inicialmente, a curva de redução da lesão com o tratamento com o 17-DMAG por via intraperitoneal foi novamente avaliada, observando-se uma redução na espessura da orelha dos animais tratados, em comparação com o controle, após duas ($0,336 \pm 0,125$ mm vs $0,674 \pm 0,21$ mm, respectivamente – Teste *t* não pareado, * $p < 0,05$), três ($0,11 \pm 0,055$ mm vs $0,406 \pm 0,129$ mm, respectivamente – Teste *t* não pareado, ** $p < 0,005$) ou quatro semanas de tratamento [$0,1$ mm (Q1: 0,06; Q3: 0,11) vs $0,3$ mm (Q1: 0,15; Q3: 0,3), respectivamente – Teste Mann-Whitney, * $p < 0,05$] (fig. 22A). Apesar disso, quando avaliada a área sob a curva (AUC) total das espessuras das orelhas ao longo do ensaio, não foi observada diferença entre o grupo

controle e tratado ($0,852 \pm 0,789$ vs $0,565 \pm 589$, respectivamente – Teste t não pareado) (fig. 22B). Adicionalmente, em concordância com os dados obtidos no ensaio anterior, foi observado que, após quatro dias de tratamento, não houve diferença na AUC da espessura da orelha dos animais dos grupos controle e tratado (fig. 22C). Entretanto, diferentemente do observado no ensaio anterior, após sete dias de tratamento, não houve diferença na AUC dos animais dos grupos controle e tratado (fig. 22D). Por fim, como observado no ensaio anterior, a diferença estatística na AUC da espessura da orelha foi confirmada entre os animais dos grupos controle e tratado após 28 dias de tratamento ($1,118 \pm 0,259$ vs $1,872 \pm 0,417$, respectivamente - Teste t não pareado, $** p < 0,01$) (fig. 22E).

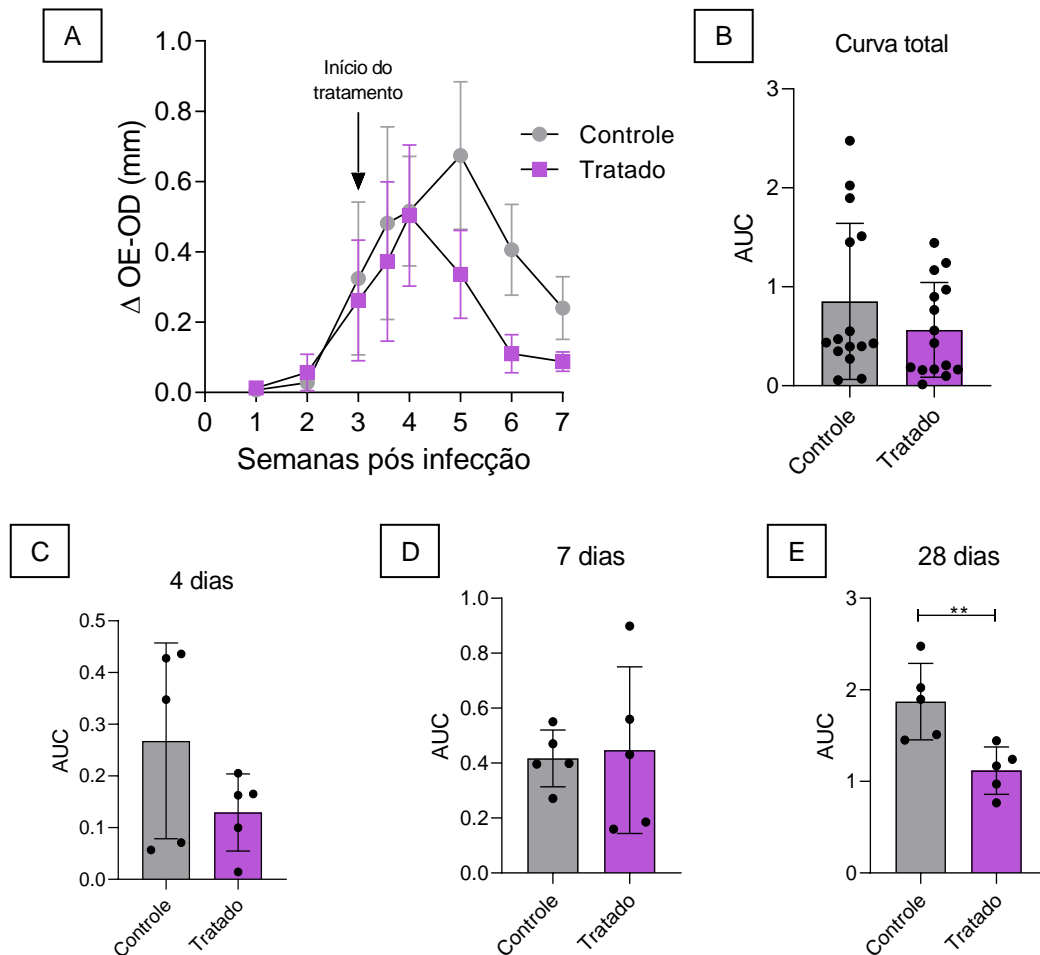


Figura 22 – Efeito do 17-DMAG na espessura da lesão na orelha de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* após 4, 7 ou 28 dias. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após três semanas de infecção, foram tratados por via intraperitoneal com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG ou glicose, como controle, durante 4, 7 ou 28 dias. Os resultados são expressos como a diferença da espessura da orelha infectada em relação à contralateral. (A) Espessura semanal da lesão na orelha dos animais tratados ou não com o 17-DMAG durante 28 dias. (B) Área sob a curva (AUC) da espessura das lesões mostradas em “A” - Teste t não pareado. (C, D e E) Área sob a curva (AUC) da espessura das lesões mostradas após 4 (C), 7 (D) ou 28 dias (E) de tratamento, respectivamente - Teste t não pareado, $* p < 0,05$; $** p < 0,01$.

Fonte: Elaborado pela autora

As imagens representativas do aspecto das lesões na orelha e a contagem de linfócitos do linfonodo retroauricular dos animais tratados ou não com o 17-DMAG durante 4, 7 ou 28 dias semanas são mostradas na figura 23. Após quatro (fig. 23A, D e G), ou sete dias (fig. 23B, E e H) de tratamento com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG por via intraperitoneal observou-se uma redução no tamanho da lesão na orelha dos animais tratados (fig. 23D e E), em comparação com a lesão observada no grupo controle (fig. 23A e B), apesar da medida da espessura das lesões não ter apresentado diferença estatística (fig. 23C). Além disso, não houve diferença no número de linfócitos contados no grupo tratado, em comparação com o grupo controle em nenhum dos dois tempos avaliados (quatro dias: $4,79 \pm 2,25 \times 10^7 / \text{mL}$ vs $4,97 \pm 2,16 \times 10^7 / \text{mL}$, respectivamente; sete dias: $4,23 \pm 1,55 \times 10^7 / \text{mL}$ vs $5,77 \pm 1,55 \times 10^7 / \text{mL}$, respectivamente – Teste *t* não pareado). Após 28 dias de tratamento (fig. 23C, F e I), a lesão na orelha do grupo tratado é inexistente (fig. 23F) e, no grupo controle, é persistente (fig. 23C), apesar de ser menos evidente que nos tempos anteriormente avaliados. Adicionalmente, o número de linfócitos presentes no linfonodo retroauricular dos animais do grupo tratado foi quase nove vezes menor que no grupo controle ($0,988 \pm 0,406 \times 10^7 / \text{mL}$ vs $8,68 \pm 2,2 \times 10^7 / \text{mL}$, respectivamente – Teste *t* não pareado, **** $p < 0,0001$).

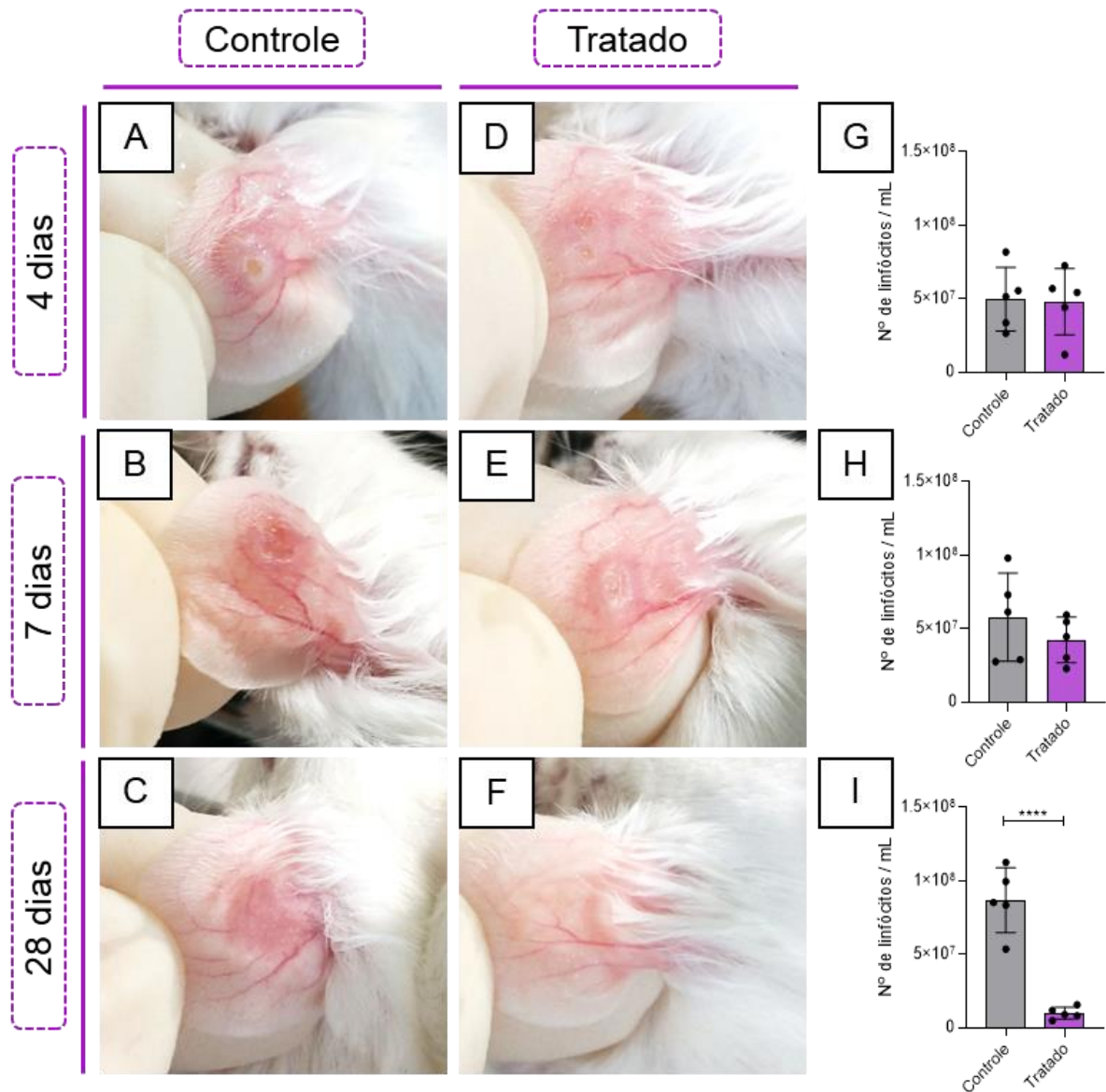


Figura 23 – Imagens representativas das lesões nas orelhas e contagem de linfócitos do linfonodo retroauricular de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados ou não com o 17-DMAG por via intraperitoneal durante 4, 7, ou 28 dias. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após três semanas de infecção, foram tratados por via intraperitoneal com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG (D-F) ou glicose (A-C), como controle. Os animais foram eutanasiados e tiveram a orelha (A-F) e linfonodo (G-I) removidos para análise após 4 (A; D; G), 7 (B; E; H) ou 28 dias (C; F; I) de tratamento. Teste *t* não pareado, **** $p < 0,0001$.

Fonte: Elaborado pela autora

A caracterização imunofenotípica dos linfócitos presentes no linfonodo retroauricular de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados ou não com o 17-DMAG é mostrada na figura 24.

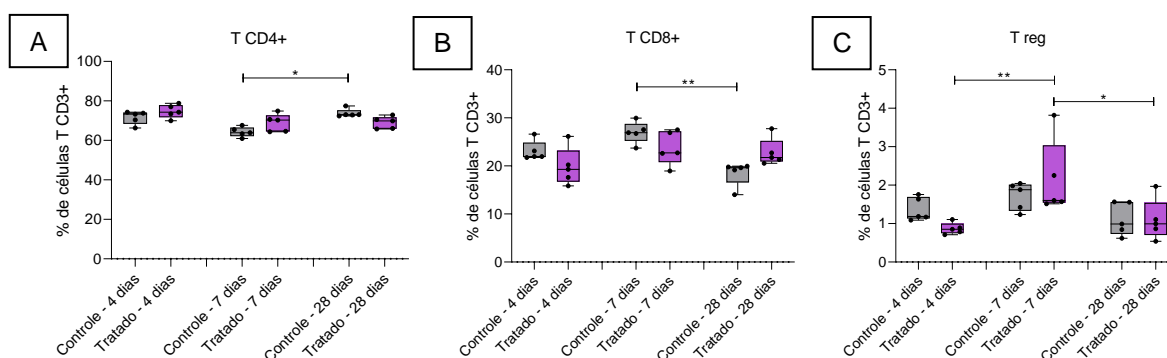


Figura 24 – Caracterização de linfócitos do linfonodo retroauricular de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados ou não com 17-DMAG durante 4, 7 ou 28 dias. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após três semanas de infecção, foram tratados por via intraperitoneal com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG ou glicose, como controle, durante 4, 7 ou 28 dias. Os animais foram eutanasiados e os linfonodos retroauriculares foram macerados e marcados, utilizando anticorpos específicos, para identificação de linfócitos T CD4 (A), T CD8 (B) ou Treg (C). As marcações foram avaliadas por citometria de fluxo. (A e B) Teste Kruskal-Wallis, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (C) Teste One-way ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fonte: Elaborado pela autora

O resultado das análises por citometria de fluxo mostrou que, comparativamente, em todos os tempos avaliados, tanto para o grupo controle quanto para o grupo tratado, a quantidade de células T CD4⁺ total identificadas ($69,87 \pm 4,89\%$ vs $70,89 \pm 4,41\%$, respectivamente) (fig. 24A) foi maior que a quantidade de células T CD8⁺ ($22,85 \pm 4,16\%$ vs $22,12 \pm 3,64\%$, respectivamente) (fig. 24B) e que a de células Treg [$1,42\%$ (Q1:1,09; Q3: 1,75) vs $1,1\%$ (Q1: 0,85; Q3: 1,6), respectivamente] (fig. 24C).

Em nenhum dos tempos avaliados foi observada diferença no percentual de células T CD4⁺ no grupo tratado, em comparação ao grupo controle (fig. 24A). Entretanto, após 28 dias, o percentual de células T CD4⁺ no grupo controle foi maior que o percentual observado neste mesmo grupo, após sete dias [73% (Q1: 72,65; Q3: 75,25) vs $63,85\%$ (Q1: 62,15; Q3: 66,55), respectivamente - Teste Kruskal-Wallis, * $p < 0,05$] (fig. 24A). De maneira similar, no que diz respeito às células T CD8⁺, em nenhum dos tempos avaliados foi observada diferença no percentual destas células no grupo tratado, em comparação ao grupo controle (fig. 24B). Porém, no grupo controle, foi observada uma redução no percentual destas células no 28º dia, quando comparado ao 7º dia [$19,60\%$ (Q1: 16,58; Q3: 19,88) vs $26,9\%$ (Q1: 25,23; Q3: 28,75), respectivamente - Teste Kruskal-Wallis, ** $p < 0,01$] (fig. 24B). Para a população de células T reg, não foi observada diferença no grupo controle, nos diferentes tempos avaliados (fig. 24C). Entretanto, no grupo tratado, foi observado um aumento transitório no percentual destas células (fig. 24C). Após 7 dias de tratamento com o 17-DMAG houve um aumento no percentual de células T reg, em comparação com o tempo de 4 dias de tratamento ($2,15 \pm 0,98\%$ vs $0,87 \pm$

0,15%, respectivamente - Teste One-way ANOVA, ** $p < 0,01$) e, após 28 dias de tratamento, é observada uma nova redução neste percentual, em comparação com o tempo de sete dias de tratamento ($1,09 \pm 0,53$ vs $2,15 \pm 0,98\%$, respectivamente - Teste One-way ANOVA, * $p < 0,05$) (fig. 24C).

4.7 AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE RECIDIVA EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR *L. braziliensis*, APÓS INTERRUPTÃO DO TRATAMENTO COM 17-DMAG POR VIA INTRAPERITONEAL

Inicialmente, a ocorrência da recidiva da infecção foi avaliada em camundongos BALB/c infectados por três semanas, que foram tratados com o 17-DMAG durante quatro semanas (fig. 25C e D), e acompanhados, após finalização do tratamento, por quatro semanas adicionais (Fig. 25E e F). A espessura da orelha dos animais do grupo tratado foi menor que a dos animais do grupo controle após 1 ($0,493 \pm 0,182$ mm vs $0,617 \pm 0,192$ mm, respectivamente – Teste *t* não pareado, * $p < 0,05$), 3 ($0,187 \pm 0,163$ mm vs $0,369 \pm 0,215$ mm, respectivamente – Teste *t* não pareado, * $p < 0,05$), ou 4 semanas de tratamento [$0,1$ mm (Q1: 0,05; Q3: 0,172) vs $0,2$ mm (Q1: 0,175; Q3: 0,23), respectivamente – Teste Mann Whitney, * $p < 0,05$) (fig. 25A). Apenas no tempo de 2 semanas de tratamento não foi observada diferença na espessura da orelha do grupo tratado e controle ($0,422 \pm 0,256$ mm vs $0,62 \pm 0,283$ mm, respectivamente). Adicionalmente, não foi observada diferença estatística quando avaliada a área sob a curva (AUC) da espessura da orelha do grupo tratado, em comparação com o grupo controle, ao longo das quatro semanas de acompanhamento durante e após a finalização do tratamento ($1,456 \pm 781$ vs $2,156 \pm 759$, respectivamente) (fig. 25B). Durante as quatro semanas de tratamento (fig. 25C), não foi observada diferença nas AUCs referente às diferenças entre as espessuras das orelhas dos animais do grupo tratado e as do grupo controle ($1,347 \pm 0,707$ vs $1,998 \pm 0,779$, respectivamente) (fig. 25D). Após a interrupção do tratamento com o 17-DMAG não foram observadas diferenças na espessura das orelhas dos animais do grupo tratado, em comparação com o grupo controle, em nenhuma das semanas avaliadas (fig. 25E). De maneira similar, após a interrupção do tratamento, não foi observada diferença na AUC das medições na orelha dos animais do grupo tratado, em comparação com as do grupo controle ($0,219 \pm 236$ vs $0,317 \pm 0,073$, respectivamente) (fig. 25F).

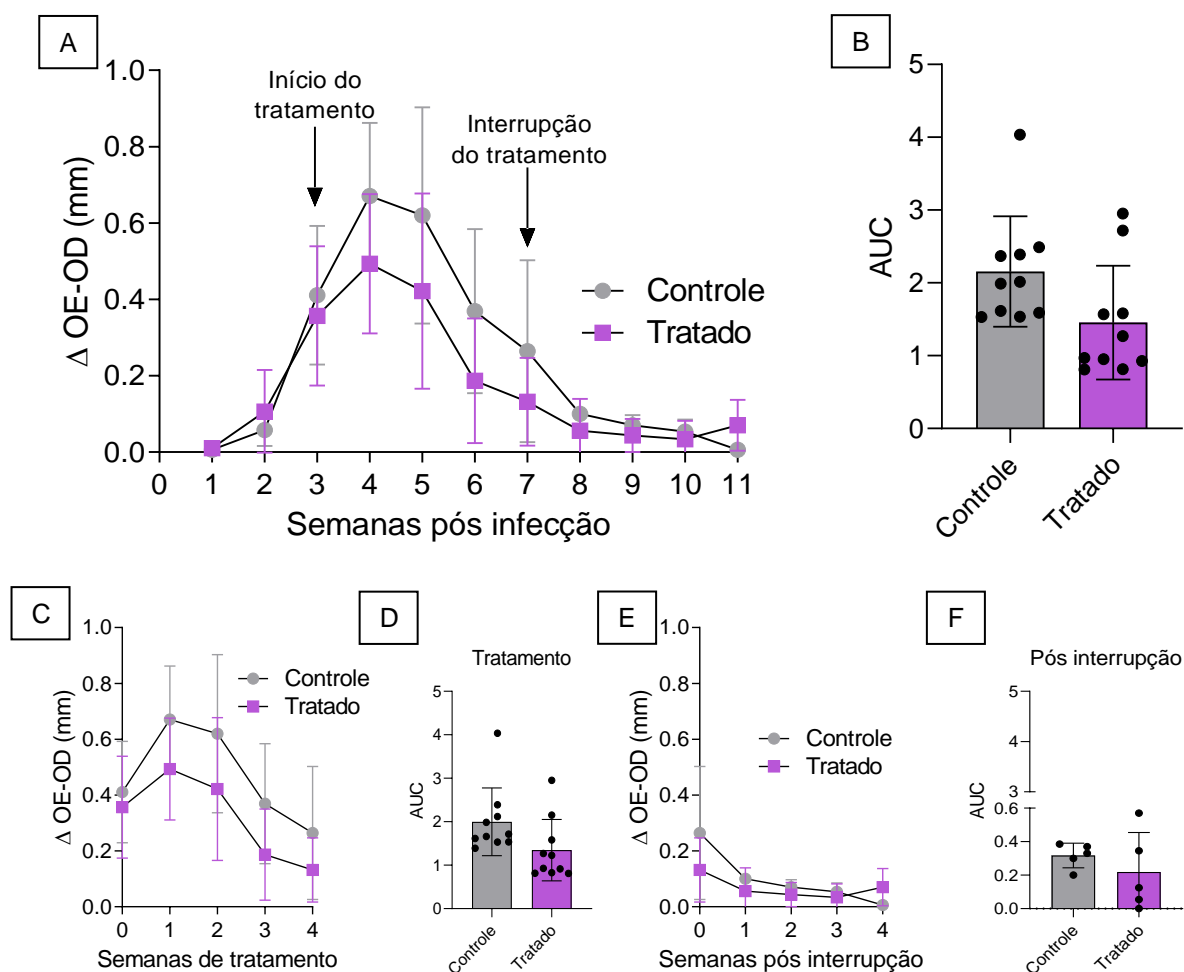


Figura 25 - Avaliação do efeito do 17-DMAG na espessura da lesão na orelha de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* durante e após a interrupção do tratamento. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após três semanas de infecção, foram tratados por via intraperitoneal com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG ou glicose, como controle, durante 28 dias. Após a finalização do tratamento, metade dos animais foi eutanasiada e a outra metade foi acompanhada, semanalmente, durante 28 dias adicionais. Os resultados são expressos como a diferença da espessura da orelha infectada em relação à contralateral. (A) Espessura semanal da lesão na orelha dos animais tratados ou não com o 17-DMAG durante e após a finalização do tratamento. (B) Área sob a curva (AUC) da espessura das lesões mostradas em “A”. (C) Espessura semanal da lesão na orelha dos animais tratados ou não com o 17-DMAG durante o tratamento. (D) AUC da espessura das lesões mostradas em “C”. (E) Espessura semanal da lesão na orelha após a finalização do tratamento com o 17-DMAG. (F) AUC da espessura das lesões mostradas em “E”. Teste *t* não pareado.

Fonte: Elaborado pela autora

Imagens representativas das lesões nas orelhas dos camundongos após o tratamento com o 17-DMAG e após quatro semanas de acompanhamento sem tratamento são mostradas na figura 26. A partir delas, é possível observar que, após quatro semanas, os animais do grupo controle (fig. 26A) apresentaram lesões características, com bordas elevadas e fundo necrótico, enquanto, no grupo tratado, não foi possível observar lesões do mesmo tipo (fig. 26C). Quatro semanas após a interrupção do tratamento, não houve diferença no aspecto das orelhas dos animais do grupo controle (fig. 26B), em comparação com o grupo tratado (fig. 26D).

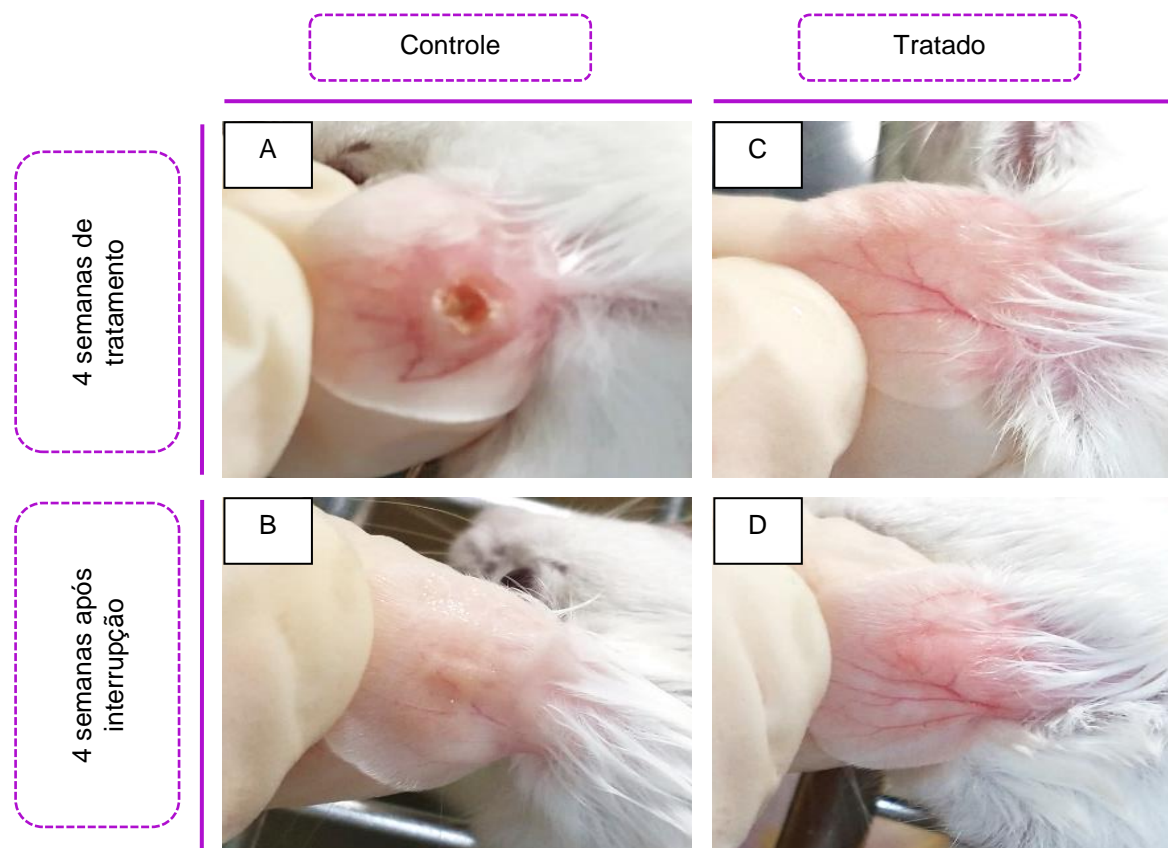


Figura 26 – Imagens representativas das lesões nas orelhas de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados ou não com o 17-DMAG por via intraperitoneal durante e após a finalização do tratamento. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após três semanas de infecção, foram tratados por via intraperitoneal com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG (C e D) ou glicose (A e B), como controle, durante quatro semanas (A e C). Após a interrupção do tratamento, metade dos animais de cada grupo foi eutanasiada e a outra metade foi acompanhada por quatro semanas adicionais, sem tratamento (D) e comparados ao grupo controle não tratado durante todo período (B).

Fonte: Elaborado pela autora

A figura 27 mostra a avaliação da carga parasitária na orelha e linfonodo dos animais que não foram tratados durante todo o experimento, comparada com a carga naqueles que receberam tratamento por quatro semanas e que, após interrupção, foram mantidos por quatro semanas adicionais, sem tratamento (fig. 27). Os resultados mostraram que o grupo tratado durante quatro semanas com 20mg/kg/dia de 17-DMAG por via intraperitoneal apresentou uma redução da carga parasitária na orelha, quando comparado ao grupo controle [4 (Q1: 1; Q3: 53,5) vs 4×10^3 (Q1: 550; Q3: $3,52 \times 10^6$), respectivamente - Teste Mann-Whitney, ** $p < 0,01$] (fig. 27A). Quatro semanas após a suspensão do tratamento (fig. 27B), observou-se que a carga parasitária na orelha do grupo tratado com o 17-DMAG foi persistente e similar à observada após a finalização do tratamento (fig. 27A), enquanto no grupo controle a carga parasitária foi igual a zero [7 (Q1: 1; Q3: 100) vs 1 (Q1: 1; Q3: 1), respectivamente - Teste Mann-Whitney] (fig. 27B). Adicionalmente, foi observado que o 17-DMAG reduziu a carga parasitária no

linfonodo dos animais do grupo tratado a zero enquanto, no grupo controle, a carga parasitária se manteve persistente [1 (Q1: 1; Q3: 1) vs 1×10^3 (Q1: $8,5 \times 10^2$; Q3: $6,85 \times 10^3$), respectivamente - Teste Mann-Whitney, $** p < 0,01$] (fig. 27C). Por fim, apesar de não ter sido observados parasitos no linfonodo dos animais do grupo tratado logo após a finalização do tratamento (fig. 27C), quatro semanas após a interrupção do tratamento, observou-se a presença de parasitos no linfonodo de animais do grupo tratado, entretanto, essa carga parasitária foi 35,7 vezes inferior àquela do grupo controle ($19,6 \pm 18,9$ vs $700 \pm 212,1$, respectivamente) (fig. 27D).

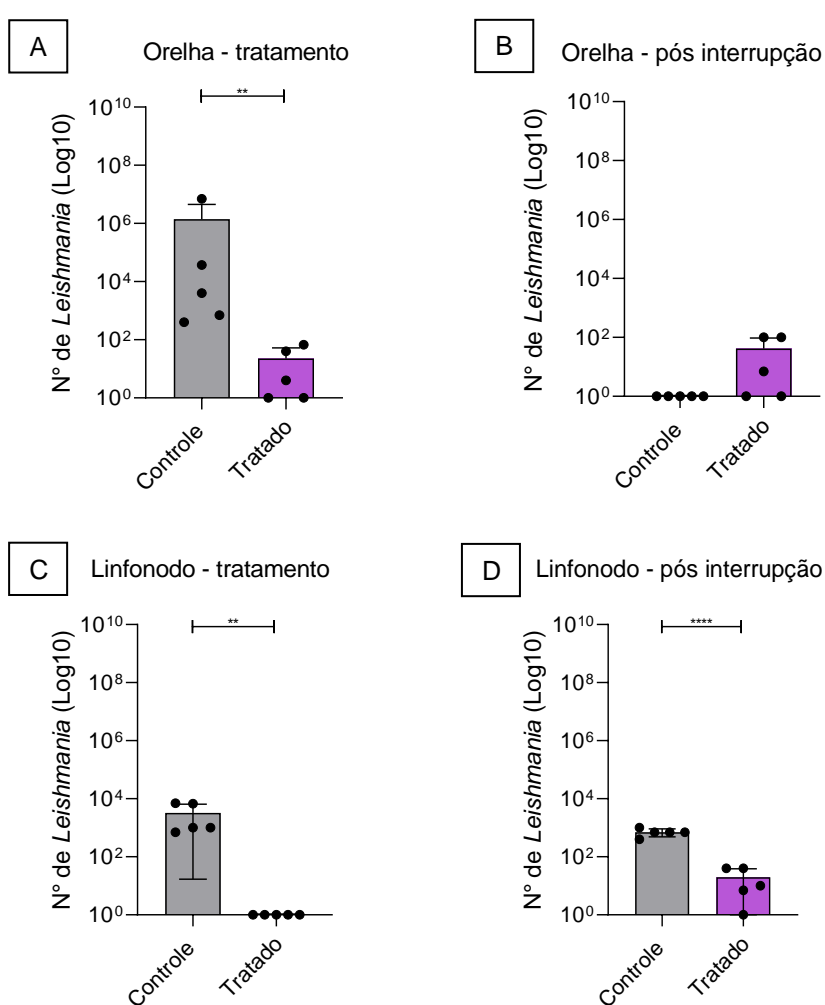


Figura 27 – Avaliação do efeito do 17-DMAG na carga parasitária de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* durante e após a finalização do tratamento com o 17-DMAG por via intraperitoneal. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após três semanas de infecção, foram tratados por via intraperitoneal com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG ou glicose, como controle durante 28 dias. Após a finalização do tratamento, metade dos animais de cada grupo foi eutanasiada e a outra metade foi acompanhada por 28 dias adicionais, sem tratamento. A carga parasitária na orelha (A e B) e linfonodo retroauricular (C e D) dos animais foi avaliada por diluição limitante após quatro semanas de tratamento (A e C) e após quatro semanas adicionais, sem tratamento (B e D). (A, B e C) Teste Mann-Whitney, $** p < 0,01$. (D) Teste *t* não pareado, $**** p < 0,0001$.

Fonte: Elaborado pela autora

4.8 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO TARDIO COM 17-DMAG POR VIA INTRAPERITONEAL NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR *L. braziliensis*

A eficácia do tratamento com início tardio utilizando o 17-DMAG por via intraperitoneal, no controle da infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis* foi avaliada e os resultados são mostrados na figura 28. O tratamento foi iniciado após cinco semanas de infecção, no pico do tamanho das lesões. Os resultados mostraram que, iniciando o tratamento com 17-DMAG tardiamente, após cinco semanas de infecção, não houve diferença no tamanho das lesões na orelha dos animais do grupo tratado, em comparação ao grupo controle, em nenhum dos tempos de tratamento avaliados (1, 2, 3 ou 4 semanas de tratamento) (fig. 28A). Em concordância com esses dados, não foi observada diferença na AUC das medições na orelha dos animais do grupo tratado, em comparação com as do grupo controle ($1,682 \pm 0,65$ vs $1,999 \pm 0,768$) (fig. 28B).

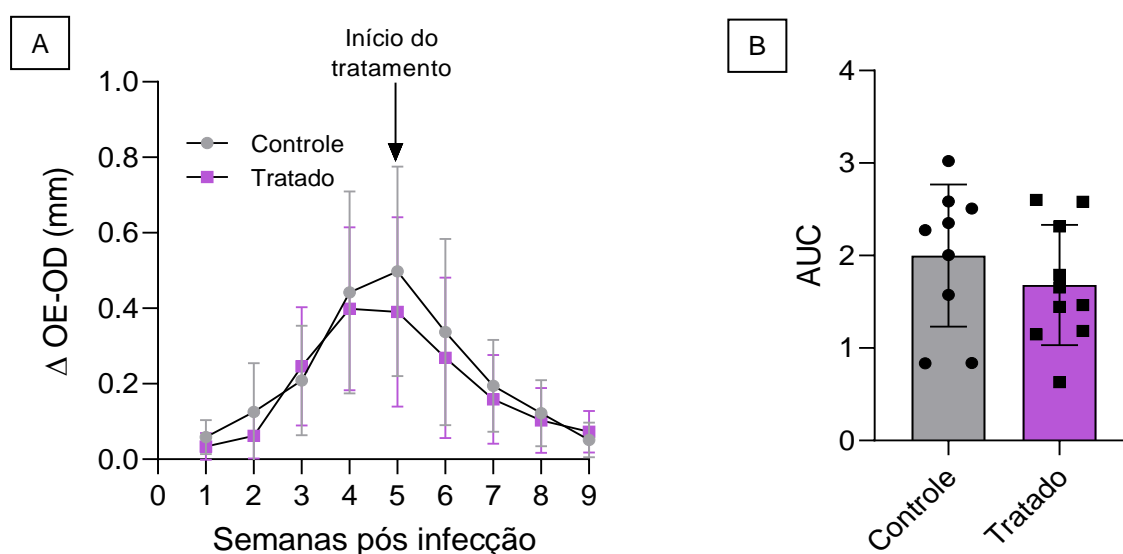


Figura 28 – Avaliação do efeito do tratamento tardio com o 17-DMAG na espessura da lesão na orelha de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após cinco semanas de infecção, foram tratados por via intraperitoneal com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG ou glicose, como controle, durante 28 dias. Os resultados são expressos como a diferença da espessura da orelha infectada em relação à contralateral. (A) Espessura semanal da lesão na orelha dos animais tratados ou não com o 17-DMAG. (B) Área sob a curva (AUC) da espessura das lesões mostradas em “A”. Teste *t* não pareado.

Fonte: Elaborado pela autora

Imagens representativas da lesão na orelha e linfonodo de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados ou não com o 17-DMAG, com início tardiamente, são mostradas na figura 29.

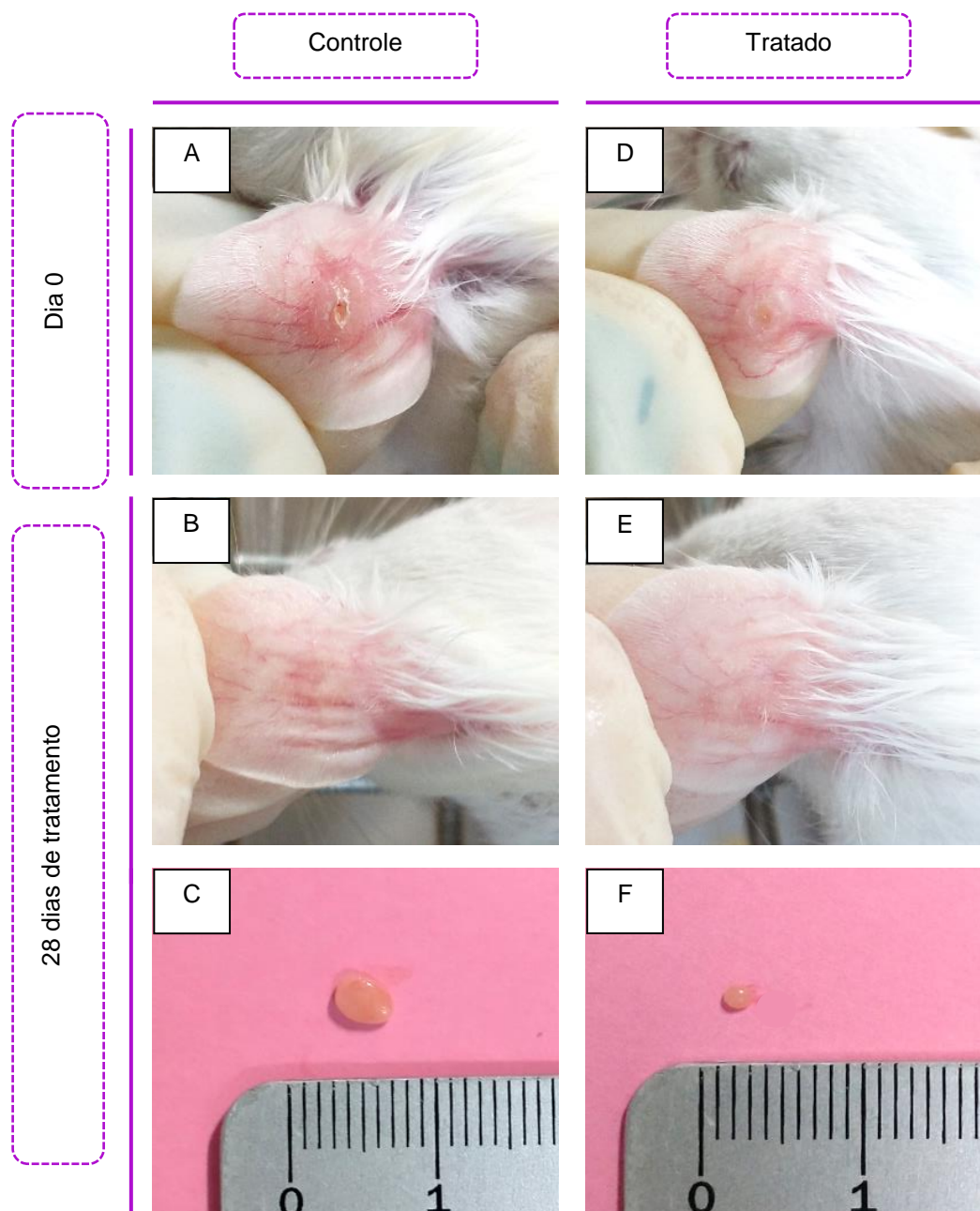


Figura 29 – Imagens representativas das lesões nas orelhas de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados ou não com o 17-DMAG, com início tardio, por via intraperitoneal. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após cinco semanas de infecção, foram tratados por via intraperitoneal com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG (D-F) ou glicose (A-C). As imagens das orelhas (A, B, D e E) foram obtidas no dia 0, quando se iniciou o tratamento (A e D) e no 28º dia de tratamento. As imagens dos linfonodos foram obtidas após a finalização do tratamento.

Fonte: Elaborado pela autora

Em concordância com os dados das mensurações da espessura da orelha, as imagens representativas das lesões evidenciam que, no início do tratamento (dia 0) (fig. 29A e D), não há diferença no aspecto das lesões do grupo tratado (fig. 29A) e do grupo controle (fig. 29D). As lesões nas orelhas dos animais de ambos os grupos reduziram ao longo das semanas de tratamento com o 17-DMAG ou com glicose e, após quatro semanas de tratamento (fig. 29B,

C, E e F) não foi observada diferença no aspecto da orelha infectada dos animais do grupo tratado (fig. 29E), em comparação ao grupo controle (fig. 29B). Entretanto, ao comparar o tamanho do linfonodo (fig. 29C e F) dos animais dos dois grupos, foi observado uma redução no tamanho deste órgão nos animais do grupo tratado (fig. 29F), em comparação com os do grupo controle (fig. 29C).

A análise da carga parasitária na orelha e linfonodo dos animais tratados com o 17-DMAG por quatro semanas, tendo iniciado o tratamento após cinco semanas de infecção são mostrados na figura 30.

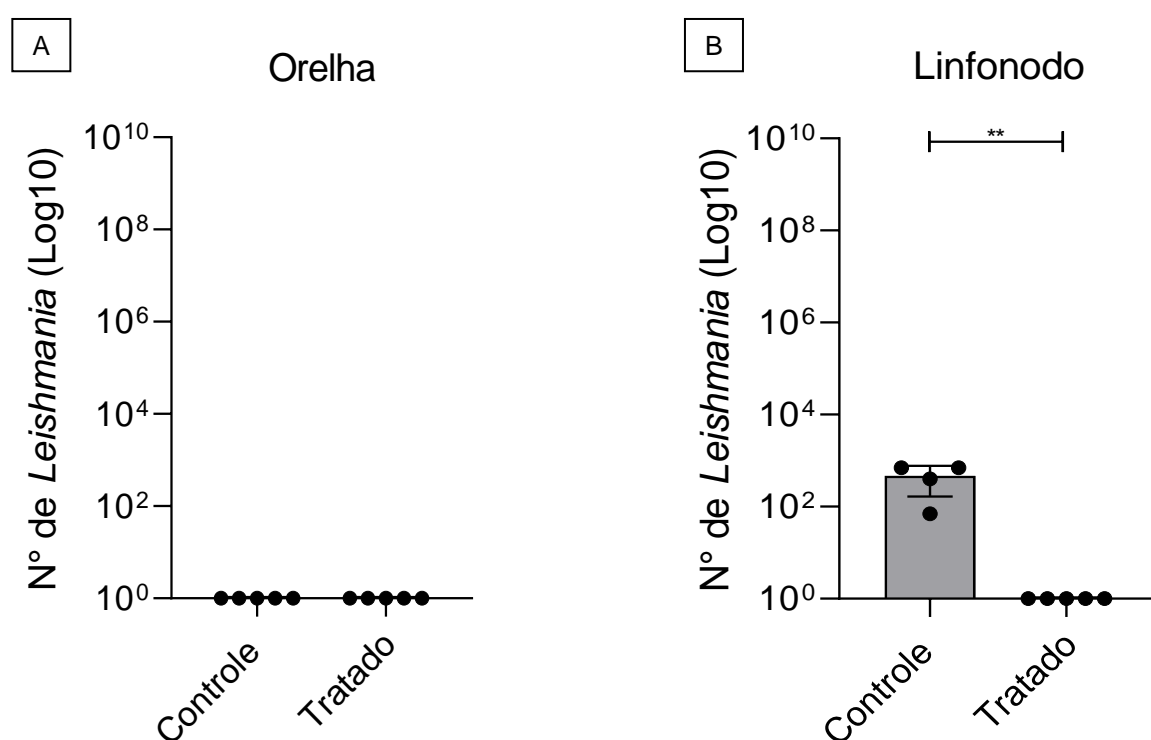


Figura 30 – Avaliação do efeito do tratamento com início tardio utilizando o 17-DMAG na carga parasitária de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados por quatro semanas com o 17-DMAG por via intraperitoneal. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após cinco semanas de infecção, foram tratados por via intraperitoneal com 20 mg/kg/dia de 17-DMAG ou glicose. Após 28 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e tiveram a orelha (A) e linfonodo (B) removidos para análise da carga parasitária por diluição limitante. Teste Mann-Whitney, ** $p < 0,01$.

Após quatro semanas de tratamento com início tardio utilizando o 17-DMAG, não foram identificados parasitos nas orelhas dos animais do grupo tratado, assim como não foram encontrados parasitos na orelha dos animais do grupo controle (fig. 30A). Entretanto, o tratamento tardio com o 17-DMAG durante quatro semanas foi capaz de zerar a carga parasitária dos animais, enquanto foi persistente no linfonodo dos animais do grupo controle [1 (Q1:1; Q3:1) vs 550 (Q1: 152,5; Q3:700), respectivamente] (fig. 30B).

5 DISCUSSÃO

No presente capítulo, avaliamos a eficácia do 17-DMAG, inibidor da Hsp90, no controle da infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. braziliensis*, com aplicação intraperitoneal. Inicialmente, mostramos que o 17-DMAG é mais tóxico sobre *L. braziliensis* que sobre macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c, apresentando valores de índice de seletividade (IS) de 4,75 para formas promastigotas do parasito e de 432,4 para amastigotas intracelulares. Nossos resultados mostraram que o 17-DMAG apresenta alta eficácia na inibição do crescimento axênico de *L. braziliensis* e no controle da infecção *in vitro* de BMMØ por *L. braziliensis*, em concentrações em níveis de nanomolar, muito abaixo daquelas capazes de causar toxicidade à célula hospedeira. Efeito anti-*Leishmania* havia sido previamente descrito por Palma e colaboradores (2019), que mostraram que os inibidores da Hsp90, geldanamicina, e seus derivados sintéticos, 17-AAG e 17-DMAG, causaram a morte de 50% da cultura de promastigotas axênicas de outra espécie do parasito causadora da forma cutânea da leishmaniose, *L. amazonensis*, em concentrações inferiores ao CC₅₀ contra células de linhagem de macrófagos THP-1. Corroborando os resultados apresentados nesse estudo, Petersen e colaboradores (2012) mostraram que o tratamento de macrófagos intraperitoneais inflamatórios de camundongos CBA infectados por *L. amazonensis* com um análogo do 17-DMAG pouco solúvel em água, o 17-AAG, foi eficaz, em concentrações não tóxicas para a célula hospedeira, com o IS próximo de 100. Em um estudo complementar, SANTOS e colaboradores (2014) mostraram que o tratamento *in vitro* de macrófagos intraperitoneais de camundongos BALB/c com 17-AAG infectados por *L. braziliensis* também foi eficaz em concentrações não tóxicas para os macrófagos, com IS em torno de 20. No presente estudo, mostramos que, *in vitro*, o tratamento de macrófagos infectados por *L. braziliensis* com 17-DMAG revelou um IS quase trinta vezes superior ao IS obtido em estudo anterior com o tratamento *in vitro* de macrófagos infectados e tratados com o 17-AAG (SANTOS et al, 2014). Esses dados podem ser justificados pela maior afinidade destes inibidores com a Hsp90 da *Leishmania* do que com a da célula hospedeira (Palma et al., 2019) e colocam o 17-DMAG como um candidato promissor no tratamento da leishmaniose tegumentar.

Uma vez comprovada a baixa toxicidade e alta eficácia do 17-DMAG *in vitro* contra *L. braziliensis*, avaliamos a sua eficácia *in vivo* no controle da infecção de camundongos BALB/c. A partir de sete dias de tratamento e em todos os tempos posteriores avaliados, os animais tratados apresentaram redução da espessura da orelha, do tamanho do linfonodo e da densidade do infiltrado inflamatório na orelha infectada, em comparação aos animais do grupo controle.

Em conjunto, esses resultados sugerem que o 17-DMAG, aplicado *in vivo* por via intraperitoneal, apresenta um perfil leishmanicida e antiinflamatório, agindo na redução da lesão característica da leishmaniose tegumentar experimental. Esses resultados reforçam os dados mostrados em trabalho realizado previamente, que mostrou que o 17-AAG, em modelo *in vivo* de infecção por *L. braziliensis*, similar ao utilizado no presente estudo, é capaz de causar redução da espessura da orelha dos animais infectados e tratados (SANTOS et al., 2014). No presente trabalho, foi observada redução do infiltrado inflamatório em tempos precoces, sugerindo que o tratamento com o 17-DMAG causa redução do recrutamento de células para o local da infecção e para o linfonodo retroauricular. Além disso, é possível que estes achados estejam relacionados aos dados em que o tratamento de macrófagos intraperitoneais inflamatórios infectados por *L. amazonensis* com o 17-AAG causou redução da produção das citocinas próinflamatórias IL-6 e TNF- α e da quimiocinas MCP-1 (PETERSEN et al., 2012). A descrição de uma ação antiinflamatória causada por inibidores da Hsp90, incluindo o 17-DMAG, reforçam nossa hipótese. Tem sido descrito que esses inibidores levam à redução da inflamação e de seus efeitos deletérios em diferentes doenças autoimunes e inflamatórias, como aterosclerose, derrame e colite (BLANCO-COLIO et al., 2010; SHIMP et al., 2012; Qi et al., 2014; TUKAJ et al., 2014; TUKAJ AND GRZEGORZ, 2016; UDDIN et al., 2020). Foi sugerido que esse efeito antiinflamatório do 17-DMAG está relacionado à inibição da proteína Hsp90 que, conseqüentemente, reduziria a expressão das proteínas Akt e IKK – proteínas cliente da Hsp90 – e resultaria na redução da translocação do fator de ativação da via NF- κ B para o núcleo, culminando no bloqueio desta via de indução da inflamação (SHIMP et al., 2012). Adicionalmente, uma vez que a resposta inflamatória é mantida no local da lesão devido à presença de parasitos, ainda que com baixa carga parasitária (MOUGNEAU et al., 2011; SCOTT; NOVAIS, 2016; SCORZA et al., 2017), uma alternativa é que a ação anti-*Leishmania* do 17-DMAG seja capaz de eliminar o parasito do local da infecção e, conseqüentemente, reduzir o processo inflamatório secundário à ela.

Complementarmente, caracterizamos os linfócitos presentes no linfonodo retroauricular dos animais infectados e tratados. A imunofenotipagem dos linfócitos mostrou que, tanto para o grupo controle quanto para o grupo tratado, houve um maior percentual de células T CD4⁺, seguido pelas células T CD8⁺ e T reg, respectivamente, em todos os tempos avaliados, resultados que corroboram com dados da literatura. Efetivamente, foi mostrado que a subpopulação de linfócitos T CD4⁺, responsável pela produção de citocinas e quimiocinas que ativam e direcionam outros tipos celulares para o local da inflamação, é predominante no sítio da infecção por *L. braziliensis* (SANTOS; BRODSKYN, 2014; CARVALHO et al., 2022; de

OLIVEIRA et al., 2023). Em nenhum dos tempos avaliados foi observada diferença no percentual das células caracterizadas (T CD4⁺, T CD8⁺ ou T reg), entre os grupos controle e tratados. Apesar disso, nossos resultados mostraram que o tratamento com o 17-DMAG causou um aumento transitório no percentual de células T reg após 7 dias de tratamento, o que não foi observado nos dias 4 e 28. As células T reg são descritas na infecção por *Leishmania* spp. exercendo a função de regular a inflamação causada pela liberação de citocinas e quimiocinas por outros subtipos celulares, como as células T CD4⁺ e T CD8⁺ (BELKAID et al., 2002; PETERS; SACKS, 2006; RUIZ; BECKER, 2007; FALCÃO et al., 2012). Dessa forma, podemos especular que, no sétimo dia de tratamento, o fármaco esteja agindo simultaneamente por meio de uma ação direta contra a *Leishmania* e, em paralelo, induzindo o aumento da quantidade de células T reg. Essa subpopulação de linfócitos poderia estar regulando a inflamação no local da infecção e auxiliando na redução da lesão, que é observada a partir deste tempo de tratamento. No 28º dia após o tratamento, com a lesão praticamente inexistente no local da infecção, o percentual de células T reg encontra-se novamente em níveis similares ao tempo de 4 dias. Esse achado pode ser justificado pela ausência da lesão e, conseqüentemente, da inflamação no local. Para melhor caracterizar o efeito do tratamento com o 17-DMAG sobre a resposta imune em animais infectados por *L. braziliensis*, novos experimentos precisam ser realizados, ampliando as possibilidades de identificação de diferentes tipos celulares a partir da imunomarcagem de *clusters differentiation*, bem como a quantificação de citocinas e quimiocinas produzidas por esses diferentes tipos celulares.

Avaliamos a ocorrência de recidiva da infecção em animais tratados durante 28 dias com o 17-DMAG, quatro semanas após a interrupção do tratamento. Primeiramente, observamos que os animais tratados apresentaram uma intensa redução na carga parasitária da orelha e não apresentaram parasitos no linfonodo, enquanto, no grupo controle, foi possível observar concentrações elevadas de parasitos em ambos os tecidos após quatro semanas. A redução intensa da carga parasitária nos animais tratados pode estar relacionada ao potencial efeito leishmanicida do 17-DMAG, similarmente ao efeito antiparasitário descrito para modelos animais de infecção por *Babesia microti*, *Trypanosoma evansi* e *T. brucei* e tratados com geldanamicina, 17-AAG ou 17-DMAG (PALLAVI et al., 2010b; ROY et al., 2012; MEYER; SHAPIRO, 2013; GUSWANTO et al., 2018b). Após quatro semanas da interrupção do tratamento, observamos que a carga parasitária na orelha foi similar àquela detectada ao final das quatro semanas de tratamento diário, sem diferença estatística em relação ao grupo controle, no qual não detectamos parasitos. A ausência de parasito nesse momento após a infecção está de acordo com o modelo de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*, que apresenta

ausência de carga parasitária no local da infecção, em tempos mais tardios, porém, com persistência de parasitos no linfonodo de drenagem (DE MOURA et al., 2005; OLIVEIRA AND BARRAL-NETTO, 2005). Após quatro semanas da interrupção do tratamento, identificamos no linfonodo drenante dos animais uma carga parasitária estatisticamente inferior àquele presente em animais do grupo controle, reforçando o efeito anti-*Leishmania* do 17-DMAG. Esses resultados nos levam a sugerir que o 17-DMAG, durante o período de tratamento, pode estar reduzindo o recrutamento das células infectadas do local da infecção para o linfonodo drenante e, uma vez que o tratamento é interrompido, esse efeito seria revertido. Apesar de não termos avaliado os mecanismos de migração celular em nosso estudo, especulamos que o 17-DMAG estaria inibindo a migração das células infectadas e inflamatórias do local da lesão para o linfonodo, similar ao seu efeito inibitório observado sobre a migração de células cancerígenas, evitando a ocorrência de metástase (CHEN; ZISMANOV et al.; MOSER et al., 2007). Entretanto, estudos adicionais precisam ser conduzidos para comprovar esta hipótese, avaliando comparativamente a migração e a expressão de moléculas relacionadas à migração em células infectadas por *L. braziliensis*, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, antes e após tratamento com o 17-DMAG.

Por fim, avaliamos a carga parasitária em animais tratados ou não com o 17-DMAG, começando o tratamento após cinco semanas de infecção, no pico da curva da lesão, que melhor simula o estágio da lesão presente em pacientes que procuram o posto de saúde para iniciar um tratamento (DE MOURA et al., 2005; OLIVEIRA; BARRAL-NETTO, 2005; UNGER, 2009). Neste modelo de tratamento, não observamos diferença na espessura da orelha entre os grupos controle e tratado ao longo das quatro semanas de tratamento. Esse resultado era esperado, uma vez que o modelo da infecção de BALB/c por *L. braziliensis* apresenta uma queda da espessura da orelha, após atingir o pico da lesão (DE MOURA et al., 2005; OLIVEIRA; BARRAL-NETTO, 2005). Apesar disso, a diferença no tamanho do linfonodo dos animais do grupo tratado, em comparação com o grupo controle, indica que há redução da reatividade dos linfócitos e diminuição do recrutamento de células inflamatórias, como discutido anteriormente, com provável redução da carga parasitária neste órgão, como foi observado nos resultados que iniciamos o tratamento mais precocemente. Diferente dos animais do grupo controle, com o tratamento iniciado no momento do pico da lesão, os parasitos foram completamente eliminados não somente na orelha, mas também no linfonodo dos animais tratados com o 17-DMAG, indicando que há uma menor chance de ocorrência de recidiva no início mais tardio do tratamento. Nossos dados estão de acordo com MACHADO et al. (2002) e Unger et al. (2009), que mostraram que pacientes com leishmaniose cutânea apresentando

lesões ulceradas, em estágio mais avançado de desenvolvimento da lesão, apresentaram menores taxas de falha terapêutica com antimoniais pentavalentes, comparados com aqueles que iniciaram o tratamento em fase mais precoce de evolução da lesão, apresentando apenas nódulos ou pápulas e que, adicionalmente, a terapia iniciada precocemente em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, não garante a cicatrização das lesões nem previne o desenvolvimento de úlceras nestes locais. Para investigar melhor o efeito da aplicação tópica do 17-DMAG no controle da infecção por *L. braziliensis*, novos ensaios serão realizados, com o objetivo de determinar a carga parasitária na orelha e linfonodos drenantes em animais tratados mais tardiamente, além de avaliar a recidiva da infecção após quatro semanas de interrupção do tratamento com 17-DMAG iniciado tardiamente.

Em conjunto, nossos dados sugerem que o tratamento com o 17-DMAG é eficaz no controle *in vitro* e *in vivo* da infecção por *L. braziliensis*, levando à redução do tamanho da lesão causada pela infecção, do tamanho do linfonodo e da densidade de células no infiltrado inflamatório no local da lesão. Além disso, o tratamento com o 17-DMAG promoveu um aumento transitório de células T reg no linfonodo dos animais, apesar de não ter sido observada diferença em comparação ao grupo controle. Por fim, o tratamento com este fármaco causou a redução da carga parasitária, tanto na orelha quanto no linfonodo drenante dos animais infectados e tratados. Dessa forma, estudos adicionais são necessários para investigar a possível contribuição do 17-DMAG na morte celular, na modulação da resposta imunoinflamatória e na redução do recrutamento de células infectadas e inflamatórias do local da lesão para o linfonodo de drenagem no mecanismo de ação anti-*Leishmania*.

6 CONCLUSÃO

O tratamento por via intraperitoneal com o 17-DMAG na dose de 20 mg/kg/dia é eficaz no controle da infecção *in vivo* de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*, sem ocorrência de toxicidade quando aplicado por até quatro semanas.

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Verificar a ocorrência de recidiva em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*, após finalização do tratamento com início tardio usando o 17-DMAG;
- ✓ Caracterizar a resposta imune de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados com 17-DMAG;
- ✓ Avaliar o efeito do 17-DMAG na migração e na expressão de moléculas relacionadas a migração de BMMØ infectados ou não com *L. braziliensis*;
- ✓ Estabelecer esquemas terapêuticos eficazes no controle da infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis* utilizando o 17-DMAG aplicado por via intraperitoneal, associado ao 17-DMAG aplicado por via tópica.

REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 10, 1–40, 2016. doi:10.1371/journal.pntd.0004349.
- Belkaid, Y. et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. **Nature**, 420, 499–502, 2002. doi:10.1038/nature01199.1.
- BLANCO-COLIO; L. M.; MADRIGAL-MATUTE, J., Lo, O.; Martí, J. L. Heat shock protein 90 inhibitors attenuate inflammatory responses in atherosclerosis. 330–337, 2010. doi:10.1093/cvr/cvq046.
- CARVALHO, A. M., BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Protection and Pathology in Leishmania braziliensis Infection. *Pathogens* 11, 1–11. doi:10.3390/pathogens11040466.
- CHEN, T. L. et al. Hsp90 inhibition increases SOCS3 transcript and regulates migration and cell death in chronic lymphocytic leukemia. 7.
- DE MENEZES, J. P. B. et al. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **Biomed Res. Int.** 2015, 15–18. doi:10.1155/2015/815023.
- DE MOURA, T. R. et al. (2005). Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis. **Infect. Immun.** 73, 5827–5834. doi:10.1128/IAI.73.9.5827-5834.2005.
- DE OLIVEIRA, B. C. et al. Central and Effector Memory Human CD4+ and CD8+ T Cells during Cutaneous Leishmaniasis and after In Vitro Stimulation with Leishmania (Viannia) braziliensis Epitopes. **Vaccines** 11, 2023. doi:10.3390/vaccines11010158.
- EGORIN, M. J. et al. Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 707545) in CD 2f 1 mice and fischer 344 rats. **Cancer Chemother. Pharmacol.** 49, 7–19, 2002. doi:10.1007/s00280-001-0380-8.
- Falcão, S. C., de Moura, T. R., Clarêncio, J., Brodskyn, C., Barral, A., and de Oliveira, C. I. (2012). The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with Leishmania braziliensis. **Int. J. Parasitol.** 42, 771–780. doi:10.1016/j.ijpara.2012.05.006.
- GUSWANTO, A. et al. 17-DMAG inhibits the multiplication of several Babesia species and Theileria equi on in vitro cultures, and Babesia microti in mice. **Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.** 8, 104–111. doi:10.1016/j.ijpddr.2018.02.005.
- Machado, P. et al. Early Treatment of Cutaneous Leishmaniasis • **CID**, 34, 15, 2002. <http://cid.oxfordjournals.org/>
- MASMOUDI, A et al. Old World cutaneous leishmaniasis: Diagnosis and treatment. **J. Dermatol. Case Rep.** 7, 31–41, 2013. doi:10.3315/jdcr.2013.1135.

MEYER, K. J.; SHAPIRO, T. A. Potent antitrypanosomal activities of heat shock protein 90 inhibitors in vitro and in vivo. **J. Infect. Dis.** 208, 489–499, 2013. doi:10.1093/infdis/jit179.

MOSER, C. et al. Blocking heat shock protein-90 inhibits the invasive properties and hepatic growth of human colon cancer cells and improves the efficacy of oxaliplatin in p53 -deficient colon cancer tumors in vivo. **Mol Cancer Ther.** 2868–2879, 2007. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0410.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunol. Rev.** 240, 286–296, 2011. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00983.x.

OLIVEIRA, C. I. de; BARRAL-NETTO, M. O Modelo Experimental nas Infecções Causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. *Gaz. méd. Bahia* 1, 35–45, 2005.

PALLAVI, R. et al. Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: Biochemical characterization of HSP90 from *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma evansi* and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. **J. Biol. Chem.** 285, 37964–37975, 2010. doi:10.1074/jbc.M110.155317.

Palma, L. C. et al. A docking-based structural analysis of geldanamycin-derived inhibitor binding to human or *Leishmania* Hsp90. **Science. Rep.** 9, 14756, 2019. doi:10.1038/s41598-019-51239-0.

PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. **Immunol. Rev.** 213, 159–179, 2006. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00432.x.

PETERSEN, A. L. de O. et al. (2012). 17-AAG Kills Intracellular *Leishmania amazonensis* while Reducing Inflammatory Responses in Infected Macrophages. **PLoS One** 7, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0049496.

QI, J., et al. 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin Attenuates Inflammatory Responses in Experimental Stroke. 37, 1713–1718.

ROY, N; NAGESHAN, R. K.; RANADE, S.; TATU, U. Heat shock protein 90 from neglected protozoan parasites. **Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.** 1823, 707–711, 2012. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.12.003.

RUIZ, J. H.; BECKER, I CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 29, 671–678. doi:10.1111/j.1365-3024.2007.00991.x.

SANTOS, C. DA S.; BRODSKYN, C. I. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. *Front. Public Heal.* 2, 1–6, 2014. doi:10.3389/fpubh.2014.00165.

SANTOS, D. M. et al. Chemotherapeutic Potential of 17-AAG against Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, 2014a. doi: 10.1371/journal.pntd.0003275.

SANTOS, D. M., et al. Chemotherapeutic Potential of 17-AAG against Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 8, 2014b. doi:10.1371/journal.pntd.0003275.

SAUSVILLE, E. A. Geldanamycin analogs. *J. Chemother.* 16, 68–69, 2004. doi:10.1179/joc.2004.16.supplement-1.68.

SCORZ; B. M., CARVALHO; E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **Int. J. Mol. Sci.** 18, 2017. doi:10.3390/ijms18061296.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nat. Rev. Immunol.** 16, 581–592, 2016. doi:10.1038/nri.2016.72.

Shimp, S. K. et al. HSP90 inhibition by 17-DMAG reduces inflammation in J774 macrophages through suppression of Akt and nuclear factor-kappa β . **Inflamm. Res.** 61, 521–533, 2012. doi:10.1007/s00011-012-0442-x.

TUKAJ, S.; GRZEGORZ, W. Anti-Hsp90 therapy in autoimmune and inflammatory diseases: a review of preclinical studies. 213–218, 2016. doi:10.1007/s12192-016-0670-z.

TUKAJ, S. et al. Immunomodulatory effects of heat shock protein 90 inhibition on humoral immune responses. **Experimental Dermatology**, 585–590, 2014. doi:10.1111/exd.12476.

UDDIN, M. A. et al. Medicine in Drug Discovery Effects of Heat Shock Protein 90 Inhibition In the Lungs. **Med. Drug Discov.** 6, 100046. doi:10.1016/j.medidd.2020.100046.

UNGER, A. et al. Association of Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis Prior to Ulcer Development with High Rate of Failure in Northeastern Brazil. **Am J Trop Med Hyg** 80, 574–579, 2009.

WHITESELL, L.; LIN, N. U. HSP90 as a platform for the assembly of more effective cancer chemotherapy. **Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.** 1823, 756–766, 2012. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.12.006.

WHO. Weekly epidemiological record. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 4, 73–80, 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/who-er9543%0Ahttp://www.who.int/wer%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2910704&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

ZISMANOV, V., DRUCKER, L.; GOTTFRIED, M. **Combined inhibition of Hsp90 and the proteasome affects NSCLC proteostasis and attenuates cell migration.** 998–1006. doi:10.1097/CAD.000000000000140.

5 CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOTERÁPICO DO 17-DMAG, APLICADO POR VIA TÓPICA, NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR *Leishmania braziliensis*.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose cutânea (LC), foco do presente trabalho, é definida como uma doença negligenciada, causada por parasitos do gênero *Leishmania* spp. e caracterizada pelo aparecimento de lesões na pele, de maneira localizada ou disseminada pelo corpo, na forma de pápula, nódulo ou úlcera (AKHOUNDI et al., 2016b; ESPUELAS et al., 2016; WHO, 2020). Os medicamentos atualmente aplicados para tratamento da LC apresentam diversas limitações que incluem, por exemplo, efeitos colaterais severos e a via de administração invasiva, evidenciando a necessidade da busca por novos fármacos (DE MENEZES et al., 2015a). Nesse cenário, tratamentos não invasivos, como os aplicados por via oral ou tópica, podem ser de grande interesse para a área da pesquisa, buscando superar essa limitação.

Tratamentos tópicos são frequentemente indicados para o tratamento de doenças que apresentam manifestações cutâneas como sinais clínicos, sejam eles vermelhidão, coceira ou a presença de lesões (ESPUELAS et al., 2016; NASSIF et al., 2017b; PAHO, 2022). Esses tratamentos apresentam diversas vantagens, como por exemplo a aplicação fácil e indolor, podendo ser aplicado pelo próprio paciente, não havendo assim a necessidade de deslocamento do paciente a hospitais ou postos de saúde diariamente para cumprimento do ciclo de tratamento, como ocorre para o tratamento sistêmico da LC e que, frequentemente, levam ao abandono do tratamento pelo paciente, culminando em falha terapêutica (CARNEIRO et al., 2012; DE MENEZES et al., 2015a; ESPUELAS et al., 2016; VAN BOCXLAER et al., 2016b; ANSELMO et al., 2018). Além disso, devido ao fato de que a aplicação tópica de quimioterápicos constitui um sistema de entrega localizada de fármacos, esse tipo de alternativa terapêutica inclui vantagens quando comparado à via de aplicação não invasiva oral como, por exemplo, evitar a degradação gástrica e o metabolismo hepático dos medicamentos que passam pelo sistema digestório (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2014; ANSELMO et al., 2018). Adicionalmente, outra vantagem da aplicação de medicamentos por via tópica, em comparação aos medicamentos atualmente utilizados no tratamento da LC, consiste no fato de que, por ser uma via de entrega local, as chances de apresentação de efeitos colaterais ou toxicidade sistêmica pelos pacientes é drasticamente reduzida (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2014;

ANSELMO et al., 2018). Dessa forma, a investigação de novos quimioterápicos com potencial aplicação por via tópica pode constituir uma importante inovação no tratamento da LC.

Estudos prévios realizados por nossa equipe demonstraram que inibidores da Proteína de Choque Térmico 90 (Hsp90) apresentam efeito leishmanicida *in vitro* e *in vivo* (PETERSEN et al., 2012b; SANTOS et al., 2014b; PALMA et al., 2019). Palma et al. (2021) mostraram que os inibidores desta chaperona, geldanamicina, 17-AAG e 17-DMAG, levam promastigotas axênicas de *L. amazonensis* à morte em concentrações que não causam toxicidade às células hospedeiras, THP-1. Adicionalmente, Petersen et al. (2012) mostraram que o 17-AAG, *in vitro*, é capaz de reduzir o percentual de infecção de macrófagos intraperitoneais inflamatórios de camundongos CBA por *L. amazonensis*, bem como a carga parasitária da infecção. Além disso, Santos et al. (2014) mostraram que o tratamento com 17-AAG *in vitro* reduziu a viabilidade de promastigotas axênicas, o percentual de infecção e a carga parasitária de macrófagos intraperitoneais inflamatórios de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e, *in vivo*, reduziu o tamanho da lesão e a carga parasitária na orelha dos animais tratados, em comparação ao grupo controle, mas não reduziu a carga parasitária no linfonodo desses animais. Assim, devido ao 17-DMAG ser um análogo hidrossolúvel do 17-AAG e com melhores propriedades farmacocinéticas (EGORIN et al., 2002b; SAUSVILLE, 2004; WHITESELL; LIN, 2012b), que apresentou resultados preliminares superiores aos observados com o 17-AAG (capítulo 1), acreditamos que a sua utilização como tratamento tópico pode se apresentar como um avanço na terapia da LC e constituir uma importante ferramenta para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes acometidos pela doença.

Dessa forma, no presente capítulo, foi avaliada a eficácia da aplicação tópica do 17-DMAG no controle da infecção *in vivo* de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*. A base semissólida escolhida para a incorporação deste fármaco e posterior aplicação por via tópica foi o hidrogel, definido como um sistema de rede tridimensional, frouxamente reticulada, formada a partir da hidratação de grupos hidrofílicos presentes no polímero de sua composição, que são capazes de absorver e reter quantidade significativa de água e que, ao contrário do gel, esses polímeros estão inchados pela água, mas não dissolvidos nela (CARPI, 2011; HRUBÝ et al., 2008; JAGUR-GRODZINSKI, 2010; OKAY, 2009). Foi produzido hidrogel utilizando o polímero carboximetilcelulose (CMC) como base, uma vez que a sua configuração em formato de uma malha polimérica, apresenta como principais vantagens uma liberação sustentada do princípio ativo ao longo do tempo e uma longa duração na superfície da pele (HAMIDI et al., 2008; BHOWMIK et al., 2012; ANSELMO et al., 2018; SINGH et al., 2019). A nossa hipótese é que a aplicação por via tópica do 17-DMAG incorporado em hidrogel no tratamento do

modelo murino da LC pode auxiliar no controle da infecção causada por *L. braziliensis*, eliminando os parasitos no local da lesão e acelerando o processo de cicatrização das lesões.

2 OBJETIVOS

- ✓ Avaliar, *in vitro*, a toxicidade do 17-DMAG sobre células de linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT);
- ✓ Produzir e avaliar a estabilidade do 17-DMAG em base semissólida de hidrogel;
- ✓ Avaliar o perfil de liberação do 17-DMAG da base semissólida de hidrogel;
- ✓ Avaliar a toxicidade do 17-DMAG em hidrogel, aplicado por via tópica, sobre camundongos BALB/c;
- ✓ Avaliar a eficácia do 17-DMAG em hidrogel, aplicado por via tópica, no controle da infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Camundongos BALB/c fêmeas foram fornecidos e mantidos em gaiolas no biotério do Instituto Gonçalo Moniz (IGM - FIOCRUZ / BA) com ração e água *ad libitum* e utilizados nos experimentos ao atingir idade entre seis e oito semanas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos nº 007/2015 e 007/2020 aprovados pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais do Instituto Gonçalo Moniz (IGM - FIOCRUZ / BA).

3.2 PARASITOS

Promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) foram cultivadas em meio Schneider completo [*Schneider's Insect Medium* (Sigma-Aldrich) suplementado com 50 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich) e 20% de soro bovino fetal (Gibco®)] em estufa B.O.D. a 24 °C. O crescimento da cultura axênica foi acompanhado com contagens em câmaras de Neubauer sob microscópio óptico invertido, até a sétima passagem. Ao atingir a fase estacionária de crescimento (concentração maior que 10⁸ parasitos / mL), as promastigotas foram utilizadas para os experimentos de infecção *in vivo*. A infectividade da cepa utilizada foi mantida por isolamento e passagens sucessivas dos parasitos em camundongos BALB/c, conforme descrito a seguir.

Para manutenção da cepa, mensalmente dois camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas axênicas em fase estacionária de *L. braziliensis*. Para isso, inicialmente, após atingir a fase estacionária de crescimento, foi realizada uma centrifugação diferencial a 125 x G por 5 min, a 4 °C, para separação dos parasitos móveis e afilados, que permanecem no sobrenadante após a centrifugação. Em seguida, estes parasitos foram lavados com solução salina (NaCl a 0,9%), seguido por centrifugação a 750 x G, 10 min, 4 °C por três vezes. O *pellet* foi ressuspensão em um volume de 1 mL e, após contagem em câmara de Neubauer, a suspensão foi ajustada para concentração de 5x10⁶ parasitos em 20 µL de solução salina para ser inoculada em uma das patas traseiras de camundongos BALB/c, utilizando seringa de insulina 0,5 mL com agulha 8,0 x 0,30 mm, 30g (PROCARD). Após um mês de infecção ou quando a lesão na pata se tornou visível, os camundongos BALB/c foram eutanasiados com tiopental (50 mg/kg) via intraperitoneal e tiveram o linfonodo drenante removido de forma asséptica. Por fim, este linfonodo foi macerado em um dos poços de uma placa de seis poços, em meio Schneider

completo, utilizando o fundo de um êmbolo de uma seringa, liberando assim as células do linfonodo, incluindo macrófagos infectados, da cápsula do órgão. As células foram cultivadas em meio Schneider completo e incubadas em estufa B.O.D a 24 °C por uma semana, permitindo a liberação das amastigotas dos macrófagos e a sua diferenciação em formas promastigotas, que foram mantidas em culturas axênicas com passagens sucessivas, até a sétima passagem, conforme descrito acima.

3.3 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA TOXICIDADE DO 17-DMAG SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCaT)

Uma vez que objetivamos testar o efeito do tratamento com aplicação tópica do 17-DMAG em modelo murino de leishmaniose tegumentar, inicialmente, avaliamos a toxicidade deste composto às células da pele, utilizando como modelo a linhagem de células de queratinócitos humanos, HaCaT. Para isso, inicialmente, as células foram plaqueadas na concentração de 5×10^4 em placas de 96 poços, contendo 100 μ L de meio DMEM *high* completo [DMEM *high glucose* (Gibco) suplementado com 22,8 mM de HEPES (Sigma), 27 mM de bicarbonato de sódio (Sigma), 10% de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM de Glutamina (Sigma) e 10 μ g/mL de ciprofloxacino] (DMEM *high* completo) por poço. Após 24 h de incubação em estufa a 37 °C, com 95% de umidade e 5% de CO₂, com as células aderidas ao assoalho dos poços, o meio de cultura foi substituído por 200 μ L de meio DMEM *high* completo fresco contendo diferentes concentrações de 17-DMAG, variando de 50 μ M a 0,024 μ M, após realização de diluições seriadas de 1:2. Após 48 h de exposição, foi adicionado 10% de Alamar Blue (Invitrogen) (v/v) nos poços e as células foram reincubadas por mais 24 h. Ao final de 72 h de exposição ao composto, a leitura das placas para avaliação da redução do Alamar Blue foi realizada utilizando espectrofotômetro SPECTRAmax-340PC sob comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

3.4 INCORPORAÇÃO DO 17-DMAG EM BASE SEMISSÓLIDA DE HIDROGEL

Para possibilitar a aplicação do 17-DMAG por via tópica, foram produzidas bases semissólidas de hidrogéis. Para isso, inicialmente 13,2 mg de 17-DMAG foram diluídos em 40 mL de água destilada, originando a concentração de 0,33 mg do 17-DMAG por mL de água. Em seguida, foram realizadas duas diluições seriadas de 1:2 a partir desta primeira solução, totalizando $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da concentração inicial (isto é, 0,16 mg/mL e 0,08 mg/mL). Para gelificação

das amostras em diferentes concentrações, 2% de carboximetilcelulose (CMC) (isto é, 400 mg para cada 20 mL do fármaco diluído em água destilada) foi adicionado lentamente, sob leve agitação magnética, a 37 °C. Vale ressaltar que, em teste prévio realizado, confirmamos que 1 mL de água destilada, após adição CMC, forma 1 g de hidrogel. Por fim, foi obtido o 17-DMAG incorporado na base semissólida de hidrogel nas concentrações de 0,33 mg/g; 0,16 mg/g e 0,08 mg/g. Com o objetivo de testar doses intermediárias, hidrogéis contendo 17-DMAG também foram produzidos nas concentrações de 0,30 mg/g; 0,25 mg/g; 0,20 mg/g, 0,15 mg/g, 0,10 mg/g e 0,05 mg/g. Como controle, hidrogel sem 17-DMAG também foi produzido, adicionando-se 2% de CMC em água destilada, sob leve agitação, a 37 °C. Para cada experimento *in vivo*, novos lotes de hidrogéis contendo 17-DMAG em diferentes concentrações foram produzidos.

3.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO 17-DMAG EM BASE SEMISSÓLIDA DE HIDROGEL

Após o preparo das amostras de hidrogel contendo 17-DMAG nas concentrações de 0,33 mg/g; 0,16 mg/g e 0,08 mg/g, as amostras foram mantidas protegidas da luz à 4 °C. Após os tempos de 1, 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias, a estabilidade do composto, inferida pela manutenção da concentração ao longo do tempo, foi avaliada. Antes de cada quantificação, uma curva de calibração foi construída, utilizando o 17-DMAG diluído seriadamente em água destilada (1:2), em concentrações variáveis de 0,0625 mg/mL a 0,0010 mg/mL. Após os tempos citados, uma alíquota de cada amostra foi diluída em água destilada na proporção de 1:3 ou 1:6, de forma que a concentração final estivesse dentro do intervalo da curva construída. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 2 min, a 125 x G, em temperatura ambiente e, por fim, 200 µL foram distribuídos por poço, em triplicata, numa placa de 96 poços. Para controle da leitura em diferentes placas, foi utilizado um padrão interno do 17-DMAG na concentração de 0,03 mg/mL. A placa contendo as amostras e os pontos da curva de calibração foi lida utilizando o espectrofotômetro SPECTRAMax-340PC, sob o comprimento de onda de 340 nm.

Para avaliar a estabilidade do 17-DMAG em base semissólida de hidrogel sob diferentes condições de temperatura, novos lotes foram produzidos nas concentrações de 0,30 mg/g; 0,25 mg/g; 0,20 mg/g e 0,15 mg/g e armazenados, protegidos da luz, a 4 °C, 25 °C (temperatura ambiente) ou 37 °C (em estufa bacteriológica). A estabilidade do composto sob essas condições foi avaliada após 1, 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias de incubação, utilizando a mesma metodologia acima citada, analisando-se a variação da concentração deste fármaco ao longo do tempo.

3.6 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DO 17-DMAG A PARTIR DA BASE SEMISSÓLIDA DE HDROGEL

Com o objetivo de avaliar o perfil de liberação do 17-DMAG da base semissólida de hidrogel, foram utilizadas Células de Franz (Transdermal System DHC-6T, Logan Instruments Corp. ®, EUA). Para isso, inicialmente, 5 mg de hidrogel com o composto na concentração de 0,33 mg/g foram colocados, em triplicata, em compartimentos doadores de células de Franz. Nos compartimentos receptores, foram colocados 10 mL de PBS (Invitrogen) 1x, pH 7,4, mantidos sob agitação magnética a 37 °C. Uma membrana de diálise (MW = 6000-8000) foi colocada entre os dois compartimentos. A quantidade de droga que é liberada ao longo do tempo, atravessa a membrana de diálise hidratada até o compartimento receptor. Após os tempos de 15 min; 30 min; 1 h; 2 h; 4 h; 8 h; 12 h e 24 h, o volume de PBS do compartimento receptor foi removido, congelado e substituído por PBS 1x, pH 7,4, novo. A quantidade de 17-DMAG presente nas amostras coletadas nos diferentes tempos foi mensurada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC - Shimadzu LC20-A). A representação esquemática do modelo de Células de Franz é mostrada na figura 31.

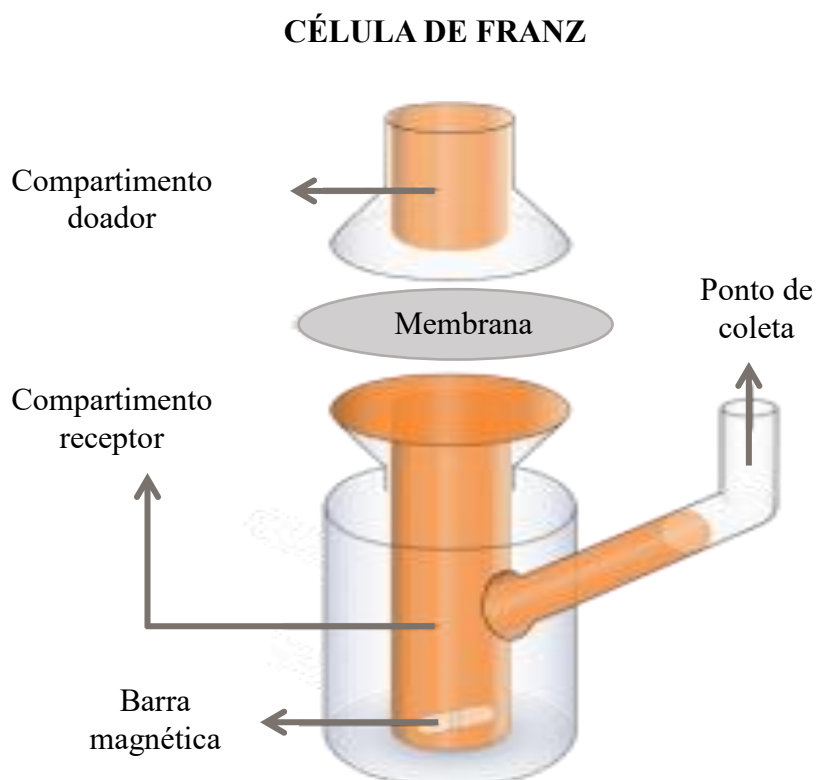


Figura 31 – Esquema representativo dos compartimentos funcionais das Células de Franz.
Fonte: Adaptado de (PHARMARON, 2023)

3.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO 17-DMAG EM BASE SEMISSÓLIDA DE HIDROGEL, APLICADO POR VIA TÓPICA, SOBRE CAMUNDONGOS BALB/c

A toxicidade *in vivo* da exposição tópica ao 17-DMAG em hidrogel foi avaliada em dois ensaios distintos. No primeiro, camundongos BALB/c saudáveis foram expostos diariamente, durante quatro semanas por via tópica, na orelha, ao hidrogel contendo 17-DMAG nas concentrações de 0,15 mg/g, 0,20 mg/g, 0,25 mg/g, 0,30 mg/g, ou com o hidrogel branco, isto é, sem o 17-DMAG, como controle. No segundo ensaio, camundongos BALB/c saudáveis, utilizando colares elizabetanos manualmente produzidos (figura 32), foram expostos diariamente, durante quatro semanas por via tópica, na orelha, ao hidrogel contendo 17-DMAG nas concentrações de 0,05 mg/g, 0,10 mg/g, 0,15 mg/g, 0,20 mg/g, ou com o hidrogel branco, como controle. Além disso, para evitar o contato da orelha exposta ao hidrogel contendo ou não o fármaco com o colar elizabetano, foram utilizados adesivos curativos *tegaderm* na orelha, em recortes com dimensões de 1 cm x 0,5 cm. Para ambos os ensaios foram avaliados, semanalmente, o aspecto local e a espessura da orelha exposta, em comparação à contralateral, utilizando o paquímetro analógico Köeppen – exatidão $\pm 0,1$ mm. Ao final da exposição, os animais foram eutanasiados com tiopental (50 mg/kg) por via intraperitoneal e aqueles do segundo ensaio tiveram a orelha, fígado, baço e rins removidos para análise histopatológica.

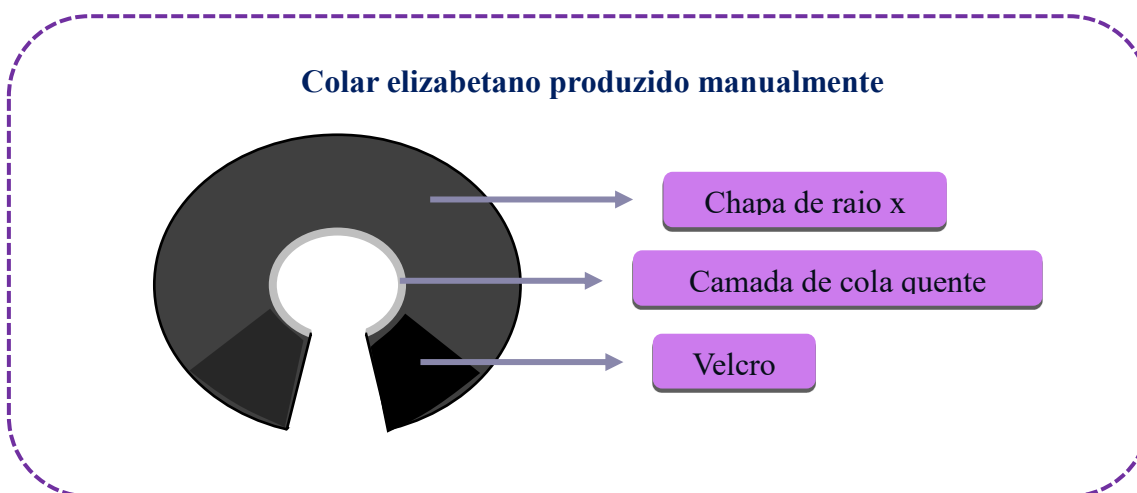


Figura 32 – Desenho esquemático de colar elizabetano utilizado nos camundongos.

Fonte: Elaborado pela autora

Para a produção dos colares elizabetanos (figura 32), inicialmente, chapas de raio-X doadas por colegas de laboratório foram higienizadas com gaze embebida em álcool 70% e cortadas nas dimensões de 2 cm de diâmetro interno e 4,8 cm de diâmetro externo, utilizando um molde previamente testado e preparado. Em seguida, com o auxílio de cola quente, dois

pequenos pedaços de velcro foram colados e grampeados, um de cada lado, nas extremidades abertas do colar elizabetano. Por fim, para proteção do pescoço dos animais em contato com o colar elizabetano, uma camada de cola quente foi adicionada na circunferência interna dos colares. É importante ressaltar que o hábito de autolimpeza, natural do comportamento dos camundongos, não foi afetado, uma vez que, diariamente, antes da troca dos tratamentos, os colares elizabetanos eram retirados e os animais permaneciam sem eles, de 2 a 4 h antes da reposição diária do tratamento.

Complementarmente, após os resultados obtidos nas análises de toxicidade *in vivo*, um ensaio adicional foi realizado, para avaliar a toxicidade da CMC, aplicada localmente na pele da orelha dos animais. Para isso, camundongos BALB/c saudáveis, utilizando colares elizabetanos, foram expostos diariamente, durante quatro semanas por via tópica, na orelha, ao hidrogel contendo 1% ou 2% de CMC, além de um grupo exposto apenas ao adesivo curativo *tegaderm*. Este ensaio teve como objetivo avaliar se a toxicidade observada nos animais do grupo controle dos experimentos de toxicidade anteriores, expostos apenas ao hidrogel branco (sem 17-DMAG) ocorreu devido à presença da CMC ou à manipulação diária da orelha desses animais.

3.8 AVALIAÇÃO DA REVERSIBILIDADE DA TOXICIDADE DO 17-DMAG EM HIDROGEL EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR *L. braziliensis*

Vinte camundongos BALB/c com idade entre seis e oito semanas foram infectados na orelha com 10^5 promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária, após sucessivas lavagens, conforme descrito no tópico 3.2, utilizando micro-seringa (BD Ultra-Fine™ II – 0,5 mL). Após quinze dias de infecção, os animais tiveram a espessura da orelha medida com paquímetro analógico e foram distribuídos igualmente em quatro grupos: i) grupo tratado com 0,33mg/g de 17-DMAG em hidrogel, ii) grupo tratado com 0,16 mg/g, iii) grupo tratado com 0,08 mg/g e iv) grupo controle, exposto ao hidrogel branco, não contendo o composto. Os animais foram tratados diariamente com o hidrogel e a evolução da lesão foi acompanhada semanalmente, com mensuração da espessura da orelha utilizando o paquímetro. Após três semanas, o tratamento foi interrompido e os animais foram acompanhados com medições semanais da espessura da orelha por seis semanas adicionais, para avaliar a reversibilidade da toxicidade causada pelo tratamento.

3.9 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG EM BASE SEMISSÓLIDA DE HIDROGEL, APLICADO POR VIA TÓPICA, NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR *L. braziliensis*

A eficácia do tratamento por via tópica com 17-DMAG em hidrogel *in vivo* foi avaliada em dois ensaios distintos. Para cada ensaio, inicialmente, vinte e cinco camundongos BALB/c com idade de 6 a 8 semanas foram contidos e tiveram inoculados na orelha, num volume de 10 μ L de solução salina, 5×10^5 parasitos de *L. braziliensis* em fase estacionária e enriquecidos com a fração metacíclica, obtidas conforme descrito no tópico 3.4, utilizando micro-seringa (BD Ultra-Fine™ II – 0,5 mL). Após três semanas de infecção, para ambos os ensaios, o tratamento com 17-DMAG em base semissólida de hidrogel, por via tópica, foi iniciado. No primeiro ensaio, os animais infectados foram tratados por via tópica diariamente, durante quatro semanas, com hidrogel contendo 17-DMAG nas concentrações de 0,15 mg/g, 0,20 mg/g, 0,25 mg/g, ou com o hidrogel branco, isto é, sem o 17-DMAG, como controle. Um grupo de animais infectados e não expostos a nenhum dos tratamentos foi adicionalmente acompanhado. No segundo ensaio, os animais infectados utilizaram colares elizabetanos e foram tratados por via tópica diariamente, durante quatro semanas, com hidrogel contendo 17-DMAG nas concentrações de 0,05 mg/g, 0,10 mg/g, 0,15 mg/g ou com o hidrogel branco, isto é, sem o 17-DMAG, como controle. Para ambos os ensaios, a lesão dos camundongos foi avaliada, semanalmente, quanto ao aspecto local e a espessura da orelha exposta, em comparação à contralateral, utilizando o paquímetro analógico Köeppen – exatidão $\pm 0,1$ mm. Ao final da exposição, os animais foram eutanasiados com tiopental (50 mg/kg) e a orelha e o linfonodo retroauricular foram removidos para análise histopatológica. Adicionalmente, o peso dos animais utilizando colares elizabetanos foi avaliado semanalmente, com o intuito de verificar se esse aparato poderia estar prejudicando a alimentação e hidratação dos animais.

3.10 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS DE CAMUNDONGOS BALB/c SAUDÁVEIS OU INFECTADOS POR *L. braziliensis* E TRATADOS OU NÃO COM 17-DMAG POR VIA TÓPICA

Após a remoção, os tecidos extraídos dos animais, como orelha, baço, fígado, rins e linfonodo, foram incubados por 48 h em solução de formalina ácida (5% de ácido acético glacial, 10% de formaldeído e 85% de etanol absoluto), que permite a fixação e manutenção da integridade do tecido. Em seguida, a formalina ácida foi substituída por álcool 70% e as amostras foram enviadas para a Plataforma de Histotecnologia do IGM, onde o material foi processado e preparado para análise. Brevemente, as amostras foram banhadas em solução de

eosina e, em seguida, mantidas em álcool 70% até o seu emblocamento em parafina. Após o emblocamento, os tecidos foram cortados com um micrótomo e, por fim, os cortes finos e uniformes com espessura de 3 a 4 μm foram corados com hematoxilina e eosina (coloração HE), seguindo o protocolo da Plataforma. As análises histopatológicas dos tecidos foram realizadas sob a supervisão de Dr. Washington Luis Conrado dos SANTOS ou Dra. Isadora dos SANTOS Lima, patologistas colaboradores do projeto.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em caso de distribuição gaussiana dos dados foi utilizado o teste t de Student para comparação entre dois grupos, ou o teste One-way ANOVA com o pós-teste de Tukey, para comparação entre três ou mais grupos. Em caso de distribuição não gaussiana, foi utilizado o teste U de Mann-Whitney, para comparação entre dois grupos, ou o teste de Kruskal-Wallis, para comparação entre três ou mais grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p < 0,05$. As análises estatísticas e a construção dos gráficos serão realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software Inc).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA TOXICIDADE DO 17-DMAG SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM DE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCaT)

A avaliação do efeito tóxico de diferentes concentrações do 17-DMAG sobre células de linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) mostrou que, nas maiores concentrações testadas (50 e 25 μM), o composto causou a morte de 100% das células. Somente nas concentrações iguais ou inferiores a 12,5 μM , o composto testado apresentou pouco ou nenhum efeito sobre as células HaCaT, não interferindo, assim, na viabilidade celular (fig. 33). A concentração de 17-DMAG necessária para causar citotoxicidade em 50% da cultura de HaCaT (CC_{50}) foi de 13,68 μM (Q1: 10,03; Q3: 13,75), mais que quatro vezes superior à concentração necessária para causar citotoxicidade sobre BMM Φ , de 3,2 μM (fig. 12, capítulo 1). Esse resultado indica que o 17-DMAG causa toxicidade às células HaCaT apenas em concentrações elevadas, o que viabiliza a sua utilização na pele para avaliação da eficácia do composto com aplicação por via tópica (fig. 33).

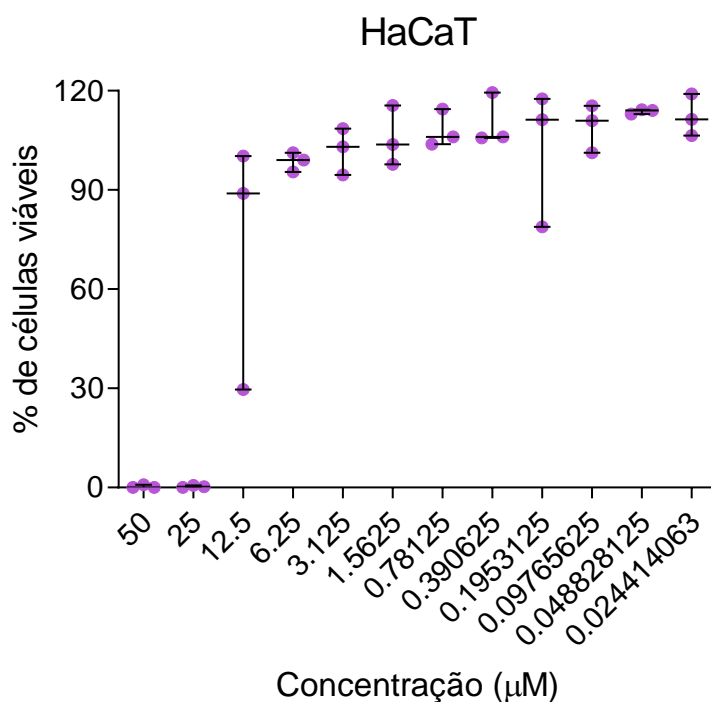


Figura 33 – Teste da toxicidade do 17-DMAG sobre células de linhagem de queratinócitos HaCaT. Células HaCaT foram plaqueadas na concentração de 5×10^4 células por poço, em placa de 96 poços, e incubadas com diferentes concentrações do 17-DMAG, em 200 μL de meio DMEM *high* completo. Após 48 h de exposição, 20 μL de Alamar Blue foram adicionados aos poços e as células foram reincubadas por mais 24 h. Após 24 h adicionais, a placa foi lida em espectrofotômetro (SPECTRAmax-340PC) e a redução do Alamar Blue foi avaliada sob os comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O resultado refere-se ao valor da mediana, com 95% de intervalo de confiança, de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Fonte: Elaborado pela autora

4.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO 17-DMAG EM BASE SEMISSÓLIDA DE HIDROGEL

Para avaliar a possibilidade do 17-DMAG ser utilizado em tratamento tópico, a sua estabilidade, incorporado em hidrogel, analisada de acordo com a variação da concentração do composto ao longo do tempo, foi avaliada ao longo de 90 dias, (fig. 34).

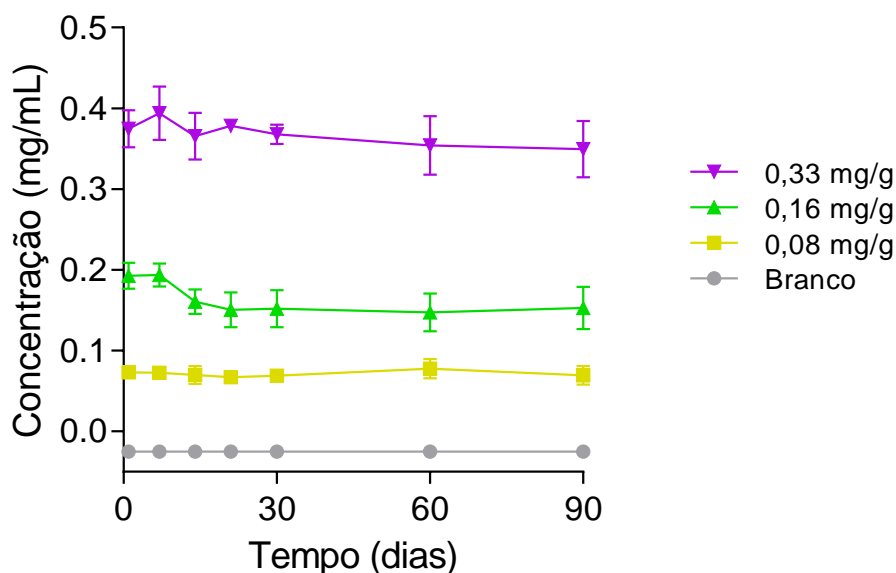


Figura 34 - Estabilidade do 17-DMAG em base semissólida de hidrogel. O 17-DMAG foi diluído em água destilada nas concentrações de 0,08 mg/g; 0,16 mg/g e 0,33 mg/g e transformado em hidrogel através da adição de 2% de carboximetilcelulose (CMC). Como controle, foi produzido um hidrogel branco, com adição do CMC em água destilada. Após os tempos de 1, 7, 14, 21, 30, 60 ou 90 dias de armazenamento a 4 °C, a estabilidade do 17-DMAG no hidrogel foi avaliada em espectrofotômetro (SPECTRAMax-340PC) sob o comprimento de onda de 340 nm. O resultado é mostrado como a média de três experimentos independentes.

Fonte: Elaborado pela autora

A concentração do 17-DMAG permaneceu inalterada ou com baixa variação em todos os tempos avaliados (1, 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias), após sua incorporação em base semissólida de hidrogel, nas concentrações de 0,08 mg/g; 0,16 mg/g e 0,33 mg/g, indicando a manutenção da sua estabilidade ao longo do tempo (fig. 34). Adicionalmente, após o último tempo de avaliação da estabilidade do 17-DMAG em hidrogel (90º dia), armazenado a 4 °C, a viscosidade e coloração do hidrogel contendo diferentes concentrações do 17-DMAG permaneceram inalteradas (fig. 35).

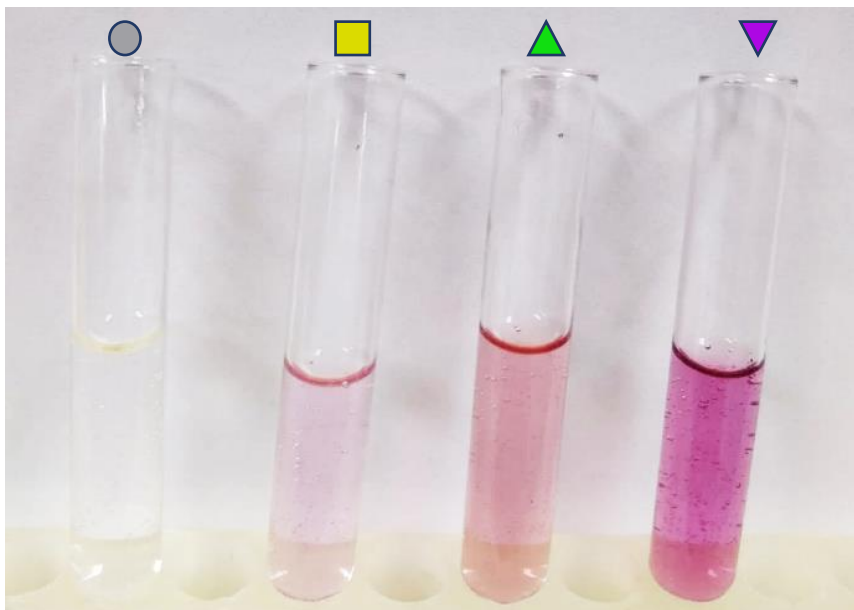


Figura 35 – Aspecto da solução de 17-DMAG incorporado em hidrogel após 90 dias de armazenamento a 4 °C. O 17-DMAG foi incorporado nas concentrações de 0,08 mg/g (■); 0,16 mg/g (▲) e 0,33 mg/g (▼) ou não foi incorporado (●) em hidrogel e a estabilidade foi avaliada a 4 °C ao longo de 90 dias. Ao final do experimento, o aspecto da solução de 17-DMAG incorporado em hidrogel foi avaliado.

Fonte: Elaborado pela autora

Em conjunto, esses resultados evidenciam a possibilidade da utilização do composto para aplicação tópica durante tratamento da leishmaniose tegumentar experimental, uma vez que a molécula a 4 °C não é degradada ao longo do tempo, quando incorporado nesta base semissólida.

Adicionalmente, a influência da temperatura sobre a estabilidade do 17-DMAG em hidrogel foi avaliada, analisando-se a variação da concentração do composto ao longo do tempo. Os resultados mostraram que, apenas quando estocado a 37 °C houve diminuição da concentração da molécula no hidrogel, indicando a perda de estabilidade nesta temperatura (fig. 36).

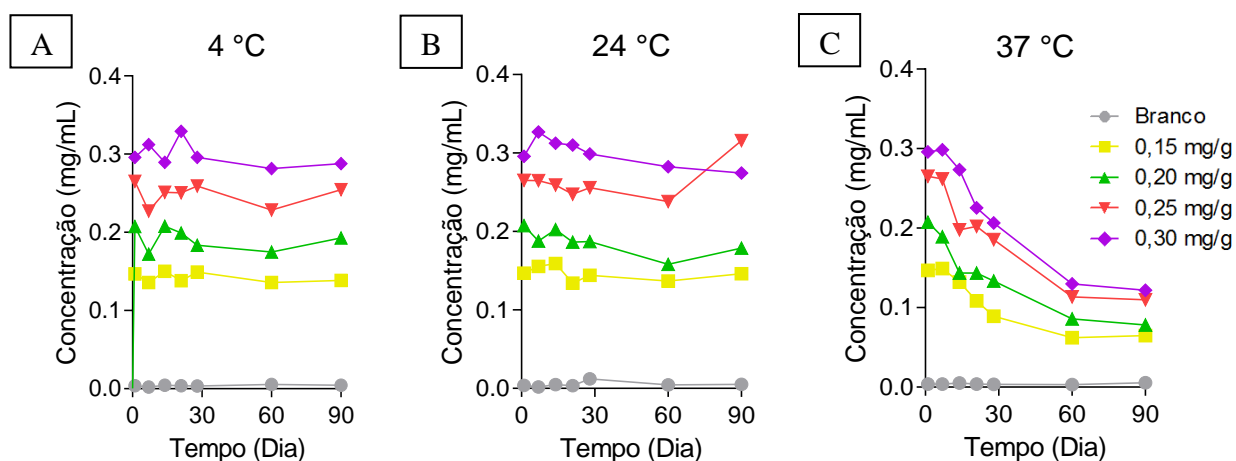


Figura 36 – Avaliação da influência da temperatura na estabilidade do 17-DMAG livre incorporado em base semissólida de hidrogel. O 17-DMAG foi diluído em água destilada nas concentrações de 0,15 mg/g; 0,20 mg/g; 0,25 mg/g e 0,30 mg/g e incorporado em hidrogel através da adição de 2% de carboximetilcelulose (CMC). Como controle, foi produzido um hidrogel branco, com adição do CMC em água destilada. As amostras foram estocadas a 4 °C (A), 24 °C (B) ou 37 °C (C) e, após os tempos de 1, 7, 14, 21, 30, 60 ou 90 dias, a estabilidade do 17-DMAG no hidrogel foi avaliada em espectrofotômetro (SPECTRAMax-340PC) sob o comprimento de onda de 340 nm. Cada ponto representa a média de um experimente, lido em triplicata.

Fonte: Elaborado pela autora

Semelhante ao que foi observado na avaliação da estabilidade do 17-DMAG em hidrogel a 4 °C (fig. 34), foi observada pouca ou nenhuma alteração na estabilidade do composto, em nenhuma das concentrações testadas, quando as amostras foram armazenadas à 4 °C (fig. 36A), ao longo de 90 dias. Adicionalmente, resultado similar foi observado quando as amostras de 17-DMAG foram armazenadas à temperatura ambiente de 24 °C (fig. 36B), ao longo de 90 dias. Entretanto, a exposição do 17-DMAG em hidrogel à temperatura de 37 °C alterou a sua estabilidade em todas as concentrações testadas ao longo do tempo avaliado (fig. 36C). Foi observado que, a partir da segunda semana de armazenamento das amostras nesta temperatura, ocorreu a redução da concentração deste composto (fig. 36C). Quando à 37 °C, a redução da estabilidade ocorreu de maneira constante até o 60º dia de avaliação. Entre o 60º e o 90º dia houve pouca ou nenhuma alteração da concentração do composto em todas as concentrações testadas (fig. 36C). Adicionalmente, após o 90º dia de avaliação da estabilidade do 17-DMAG em hidrogel o aspecto das amostras foi avaliado e é mostrado na figura 37.

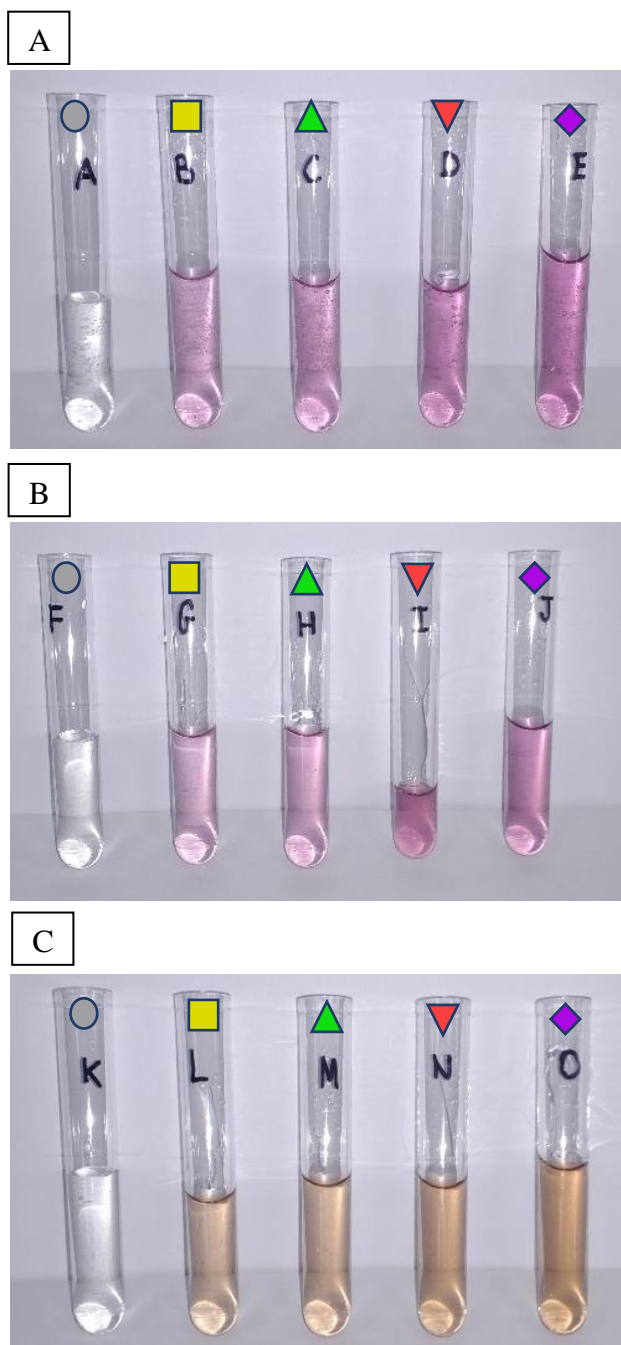


Figura 37 - Aspecto da solução de 17-DMAG incorporado em hidrogel após 90 dias de armazenamento a 4 °C, 24 °C ou 37 °C. O 17-DMAG foi incorporado em hidrogel nas concentrações de 0,15 mg/g (■); 0,20 mg/g (▲); 0,25 mg/g (▼) e 0,30 mg/g (◆) e incubados a 4 °C (A), 24 °C (B) ou 37 °C (C). Como controle, hidrogel branco, sem 17-DMAG (●) foi preparado com a adição de 2% de CMC em água destilada. A estabilidade foi avaliada ao longo de 90 dias e, ao final do experimento, o aspecto da solução de 17-DMAG incorporado em hidrogel foi avaliado.

Fonte: Elaborado pela autora

Em concordância com os resultados de estabilidade do 17-DMAG em hidrogel mostrados anteriormente, nas concentrações de 0,15 mg/g; 0,20 mg/g; 0,25 mg/g e 0,30 mg/g, a cor e a viscosidade das amostras incubadas a 4 °C (fig. 37A) ou a 24 °C (fig. 37B) permaneceram inalteradas ao longo de 90 dias. Porém, quando incubadas a 37 °C (fig. 37C), todas as concentrações testadas apresentaram modificação da coloração e diminuição da

viscosidade em relação às outras amostras, indicando que houve redução da estabilidade da molécula nesta temperatura. Em conjunto, esses dados mostram que, para utilização do 17-DMAG livre em base semissólida de hidrogel no tratamento local de lesões causadas pela leishmaniose tegumentar, o composto deve ser estocado refrigerado ou à temperatura ambiente, pois pode perder eficácia caso seja submetido a temperaturas mais elevadas.

4.3 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DO 17-DMAG A PARTIR DA BASE SEMISSÓLIDA DE HDROGEL

O gráfico mostrado na figura 38 mostra o percentual cumulativo de difusão do 17-DMAG a partir de hidrogel, ao longo de 24 h, determinado por meio da utilização da Células de Franz.

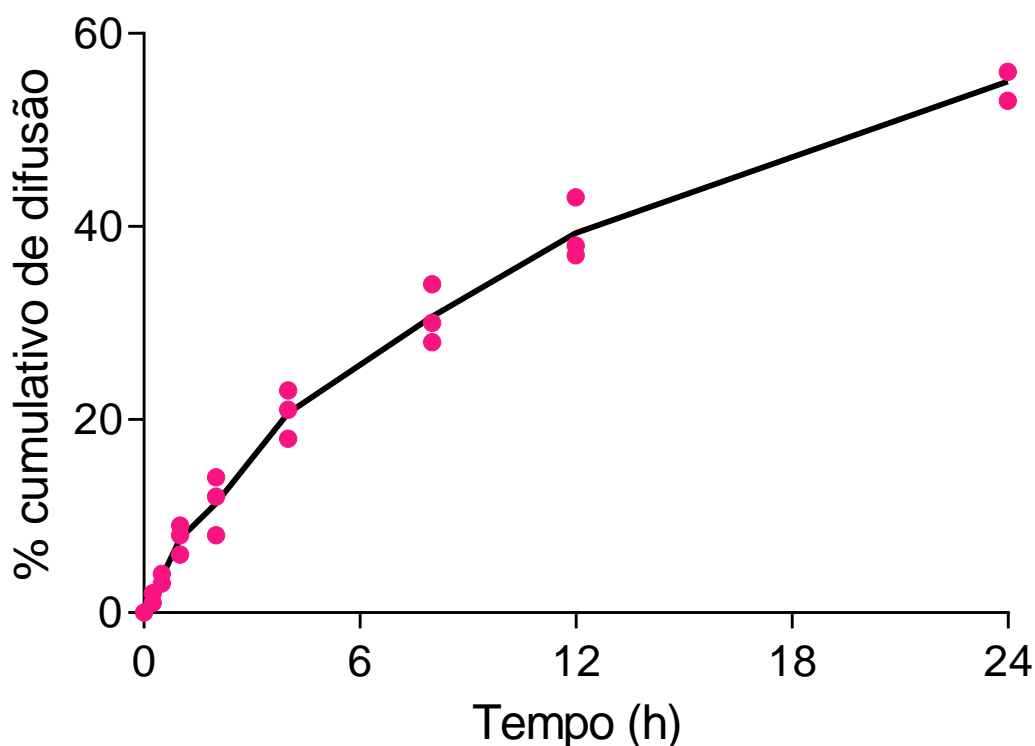


Figura 38 – Cinética da liberação do 17-DMAG da base semissólida do hidrogel. O 17-DMAG foi incorporado na concentração de 0,33 mg/g em hidrogel, como descrito em Material e Métodos. Cinco gramas do hidrogel contendo 17-DMAG foram colocados no compartimento doador da Célula de Franz e 10 mL de PBS pH 7,4 foram colocados no compartimento receptor. Após os tempos de 15 min, 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 ou 24 h, o PBS do compartimento receptor foi coletado e 10 mL de PBS novo foi adicionado. Por fim, a concentração do 17-DMAG que atravessou a membrana de diálise colocada entre os compartimentos foi quantificada por HPLC. Resultado de um experimento realizado em triplicata.

Fonte: Elaborado pela autora

Os resultados mostram que cerca de 40% do 17-DMAG foi liberado do hidrogel até o tempo de 12 h, apesar de não haver diferenças estatísticas entre os grupos. A liberação do composto a partir desta base semissólida foi inicialmente rápida e intensa, porém a intensidade de liberação entre 12 e 24 h de incubação foi reduzida (fig. 38). Ao final de 24 h de difusão, aproximadamente 60% do 17-DMAG foi liberado do hidrogel.

4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO 17-DMAG EM BASE SEMISSÓLIDA DE HIDROGEL, APLICADO POR VIA TÓPICA, SOBRE CAMUNDONGOS BALB/c

A toxicidade do 17-DMAG em hidrogel, aplicado por via tópica em camundongos BALB/c saudáveis foi avaliada em dois ensaios: (i) sem o uso de colar elizabetano (fig. 39 e 40) ou (ii) com o uso do colar elizabetano (fig. 41 e 42).

A mensuração semanal da espessura das orelhas dos animais expostos por via tópica ao 17-DMAG, incorporado em hidrogel, sem o uso de colares elizabetanos, mostrou que não houve aumento da espessura da orelha dos animais expostos diariamente à concentração de 0,15 mg/g ao longo das quatro semanas de exposição e que o mesmo foi observado para os animais do grupo controle (expostos apenas ao hidrogel branco, isto é, sem o fármaco) (fig. 39A). De maneira similar, quando expostos ao 17-DMAG nas concentrações de 0,20 ou 0,25 mg/g por via tópica, não foi observado aumento significativo da espessura da orelha dos animais tratados ao longo das semanas de exposição, em comparação com o grupo controle ($0,033 \pm 0,032$ mm vs $0,039 \pm 0,032$ mm vs $0,00 \pm 0,00$ mm, respectivamente) (fig. 39A). Apenas os animais expostos por via tópica à maior concentração do fármaco, de 0,30 mg/g, apresentaram aumento expressivo e significativo da espessura da orelha, gradual, ao longo de quatro semanas de exposição, quando comparados ao grupo controle ($0,117 \pm 0,121$ mm vs $0,00 \pm 0,00$ mm, respectivamente – Teste One-way ANOVA, $*p < 0,05$) (fig. 39A). A figura 39B mostra as áreas sob as curvas (AUCs) das medidas semanais das espessuras das orelhas dos animais expostos e controle, e confirma que apenas na maior concentração testada o 17-DMAG causou aumento do tamanho da espessura da orelha, indicativo de toxicidade (fig. 39B) ($0,432 \pm 0,192$ vs $0,000 \pm 0,000$, respectivamente - Teste Kruskal-Wallis, $*p < 0,05$). Os valores das AUC das mensurações dos grupos expostos ao 17-DMAG nas concentrações de 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 mg/g ou controle foram de, respectivamente: $0,000 \pm 0,000$; $0,125 \pm 0,06$; $0,155 \pm 0,058$; $0,432 \pm 0,192$ e $0,000 \pm 0,000$.

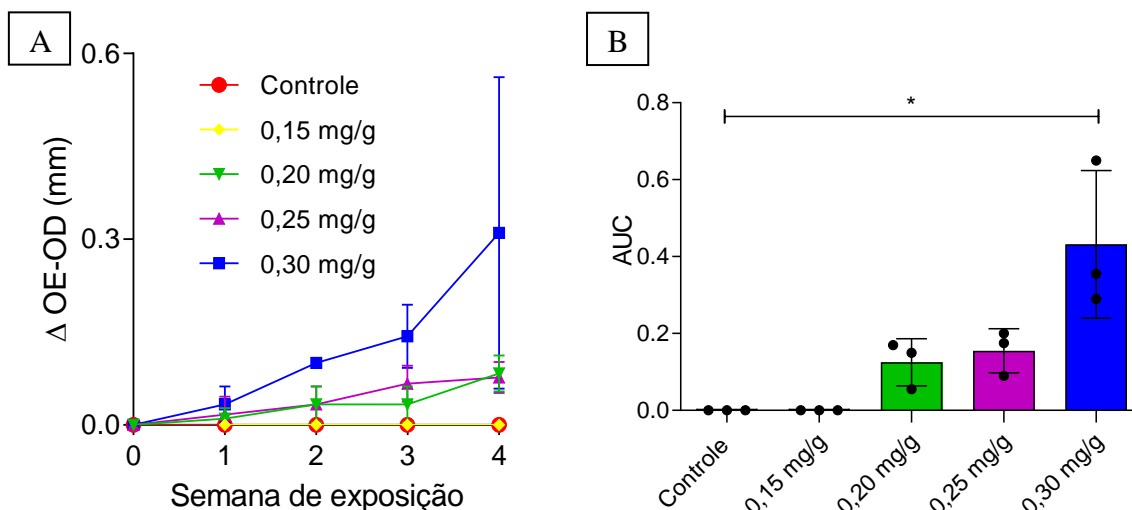


Figura 39 – Teste de toxicidade do 17-DMAG, incorporado em hidrogel, quando aplicado por via tópica em camundongos BALB/c, sem uso de colares elizabetanos. Camundongos BALB/c saudáveis foram expostos diariamente ao 17-DMAG incorporado em hidrogel, nas concentrações de 0,15 mg/g; 0,20 mg/g; 0,25 mg/g ou 0,30 mg/g, durante quatro semanas. Como controle, animais foram expostos ao hidrogel branco, sem 17-DMAG. Os resultados são expressos como a diferença da espessura da orelha exposta em relação à contralateral. (A) Espessura semanal da orelha dos animais expostos ao hidrogel controle ou contendo 17-DMAG; (B) Área sob a curva (AUC) da espessura das orelhas mostradas em “A”. Teste de Kruskal-Wallis, * $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pela autora

A figura 40 mostra imagens representativas da orelha dos animais expostos diariamente a diferentes concentrações do 17-DMAG incorporado em hidrogel, após quatro semanas de exposição. Essas imagens estão de acordo com os resultados da mensuração semanal da orelha dos animais expostos e mostram que, ao final de quatro semanas de exposição, as orelhas dos animais do grupo exposto ao 17-DMAG nas concentrações de 0,15 mg/g (fig. 40B) ou 0,20 mg/g (fig. 40C) apresentaram aspecto similar ao do grupo controle, exposto ao hidrogel branco ao final do mesmo período (fig. 40A), sem sinais visíveis de toxicidade. Entretanto, as orelhas dos animais expostos à concentração de 0,25 mg/g (fig. 40D) apresentaram, visualmente, um pouco de tecido cicatricial e/ou pequenas bolhas no local das aplicações, que podem indicar toxicidade. As orelhas dos animais expostos à concentração de 17-DMAG em hidrogel de 0,30 mg/g (fig. 40E-F) apresentaram tecido cicatricial, com aspecto enrijecido, escurecimento das extremidades das orelhas e presença de rachaduras neste local. Adicionalmente, esses animais também apresentaram sensibilidade ao toque no local da aplicação. Apesar de, em números absolutos, as diferenças na espessura das orelhas terem sido baixas, a toxicidade foi expressa clinicamente no aspecto das orelhas dos animais expostos. Em conjunto, esse resultado evidencia a toxicidade causada pelo composto em hidrogel apenas na maior concentração testada.

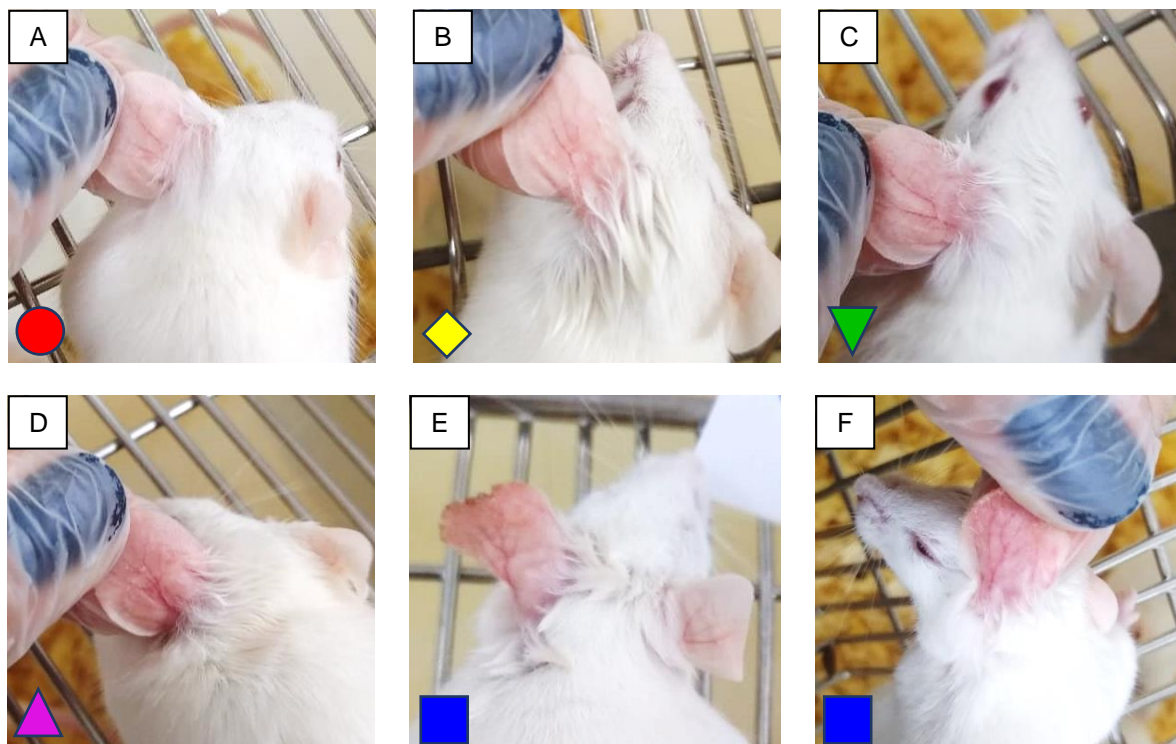


Figura 40 – Imagens representativas das orelhas de camundongos BALB/c após quatro semanas de exposição por via tópica ao 17-DMAG, incorporado em hidrogel, na ausência de colares elizabetanos. Camundongos BALB/c foram expostos diariamente ao 17-DMAG em hidrogel, nas concentrações de (B) 0,15 mg/g; (C) 0,20 mg/g; (D) 0,25 mg/g ou (E-F) 0,30 mg/g. Como controle, camundongos foram expostos ao hidrogel branco, sem 17-DMAG (A). Imagens representativas foram registradas ao final do período de quatro semanas de exposição.

Fonte: Elaborado pela autora

Em conjunto, esses resultados mostraram que, para tratamento por via tópica, apenas concentrações iguais ou inferiores a 0,25 mg/g de 17-DMAG em hidrogel podem ser utilizadas para ensaios de eficácia deste fármaco com aplicação tópica, na ausência de colares elizabetanos, pois não causam toxicidade aos animais.

No segundo ensaio realizado, foram colocados colares elizabetanos nos animais, para evitar que os animais removessem o hidrogel do local de aplicação e, conseqüentemente, avaliar a toxicidade do 17-DMAG com maior tempo de exposição por via tópica. Adicionalmente, por aumentar o tempo de exposição dos animais ao fármaco para avaliar a toxicidade da aplicação por via tópica, concentrações menores foram testadas. A mensuração semanal da espessura das orelhas dos animais expostos por via tópica ao 17-DMAG, incorporado em hidrogel, com o uso de colares elizabetanos, mostrou que, exceto para o grupo exposto à concentração de 0,05 mg/g de 17-DMAG, os animais expostos à todas as outras concentrações de 17-DMAG por via tópica (0,10; 0,15 ou 0,20 mg/g) apresentaram um aumento transitório na espessura da orelha, em comparação ao grupo controle (fig. 41A). Adicionalmente, foi observado que o aumento da espessura ocorreu de maneira dose-dependente e que o pico da espessura observado ocorreu,

para todos os grupos, após duas semanas de exposição (fig. 41A). Entretanto, apenas na segunda semana de exposição e apenas para o grupo exposto à maior concentração de 17-DMAG testada, de 0,20 mg/g, houve aumento significativo na espessura da orelha, quando comparado ao grupo controle [0,4 mm (Q1: 0,3; Q3: 0,4) vs 0,08 mm (Q1: 0,02; Q3: 0,1), respectivamente - Teste Kruskal-Wallis, * $p < 0,05$] (fig. 41A). Para os animais expostos às outras concentrações de 17-DMAG por via tópica, não foram encontradas diferenças na espessura da orelha, em nenhuma das semanas avaliadas. Ao final da quarta semana de exposição, não foi observada diferença na espessura da orelha dos camundongos tratados com 0,05 mg/g [0,1 mm (Q1: 0,07; Q3: 0,1)]; 0,10 mg/g [0,15 mm (Q1: 0,13; Q3: 0,15)]; 0,15 mg/g [0,1 mm (Q1: 0,05; Q3: 0,17)], ou 0,20 mg/g [0,17 mm (Q1: 0,1; Q3: 0,3)] de 17-DMAG em hidrogel, em comparação ao grupo controle [0,07 mm (Q1: 0,00; Q3: 0,1)] (fig. 41A).

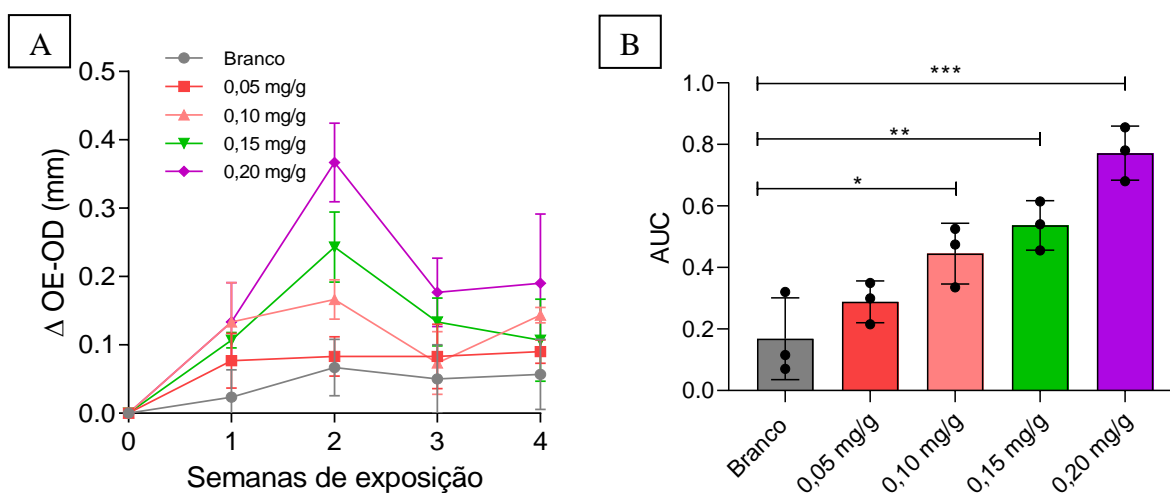


Figura 41 – Toxicidade do 17-DMAG, incorporado em hidrogel, quando aplicado por via tópica em camundongos BALB/c, com uso de colares elizabetanos. Camundongos BALB/c saudáveis, utilizando colares elizabetanos, foram expostos diariamente ao 17-DMAG incorporado em hidrogel, nas concentrações de 0,05 mg/g, 0,10 mg/g, 0,15 mg/g ou 0,20 mg/g, ou com o hidrogel sem 17-DMAG, como controle, durante quatro semanas. (A) Espessura semanal da espessura da orelha dos animais expostos ao hidrogel controle ou contendo 17-DMAG. (B) Área sob a curva (AUC) do gráfico mostrado em “A”. Teste One-way ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p = 0,001$.

Fonte: Elaborado pela autora

Adicionalmente, a área sob a curva (AUC) das mensurações das orelhas ao longo das quatro semanas de exposição é mostrada na figura 41B. Essa análise mostrou que o aumento da espessura da orelha dos animais expostos por via tópica a diferentes concentrações do 17-DMAG ocorreu de forma dose-dependente (fig. 41B), o que está de acordo com o gráfico mostrado na figura 41A. Além disso, na análise da AUC foi observada diferenças estatísticas na mensuração das orelhas ao longo das semanas nos animais expostos à todas as concentrações do 17-DMAG testadas, exceto a concentração de 0,05 mg/g (AUC 0,05 mg/g: $0,288 \pm 0,068$;

0,10 mg/g: $0,445 \pm 0,098$; 0,15 mg/g: $0,537 \pm 0,08$; 0,20 mg/g: $0,772 \pm 0,088$; controle: $0,168 \pm 0,133$ – Teste One-way ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p = 0,0001$). Contudo, é importante ressaltar que, em valores numéricos absolutos, a diferença entre as mensurações das espessuras das orelhas dos animais é baixa, podendo não refletir, clinicamente, na exibição de sinais de toxicidade nos animais.

O aspecto das orelhas dos animais expostos por via tópica às diferentes concentrações do 17-DMAG em hidrogel, com uso de colar elizabetano, é mostrado na figura 42. Clinicamente, a análise do local de aplicação dos hidrogéis mostrou que, para todos os grupos, houve apenas leve sinal de irritação local, como discreta hiperemia (fig. 42).

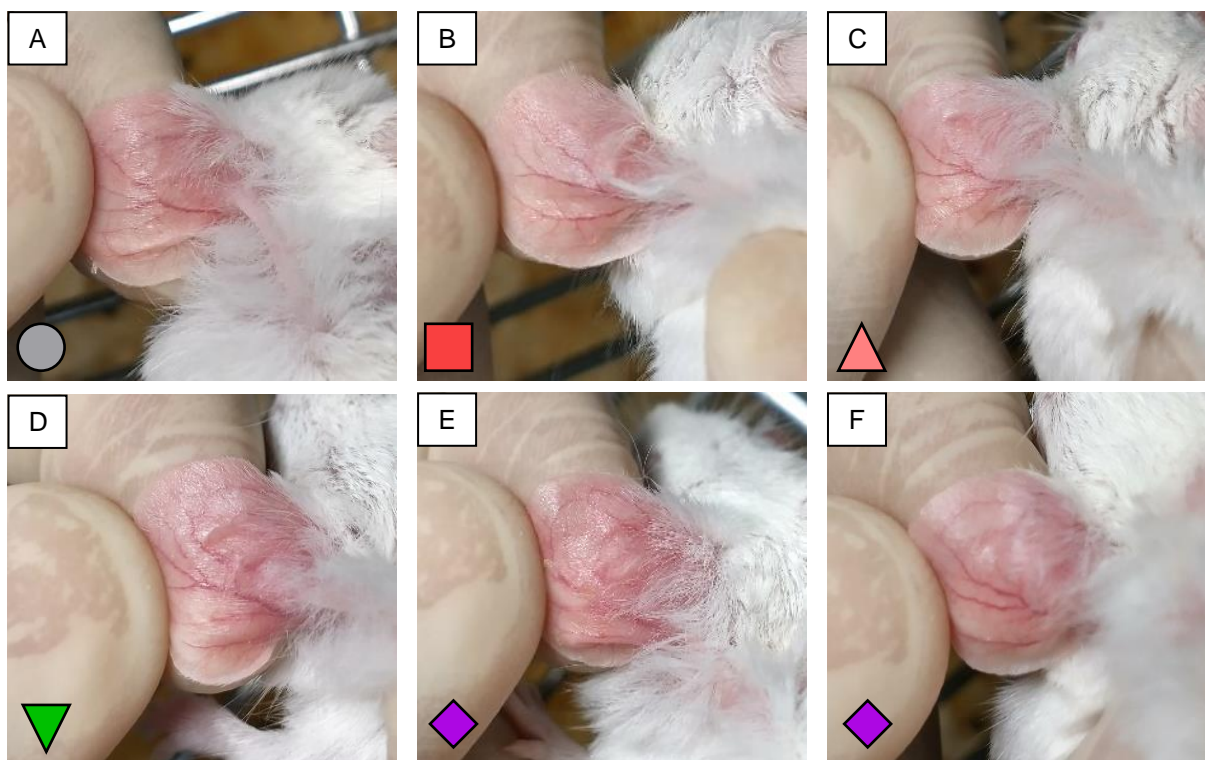


Figura 42 - Imagens representativas das orelhas de camundongos BALB/c após quatro semanas de exposição por via tópica ao 17-DMAG, incorporado em hidrogel, com uso de colares elizabetanos. Camundongos BALB/c, utilizando colares elizabetanos, foram expostos diariamente ao 17-DMAG em hidrogel, nas concentrações de (B) 0,05 mg/g; (C) 0,10 mg/g; (D) 0,15 mg/g ou (E-F) 0,20 mg/g. Como controle, camundongos foram expostos ao hidrogel branco, sem 17-DMAG (A). Imagens representativas foram registradas ao final do período de quatro semanas de exposição.

Fonte: Elaborado pela autora

Para melhor avaliar a intensidade da toxicidade causada pela exposição ao 17-DMAG por via tópica em diferentes concentrações, foram realizadas análises histológicas dos tecidos da orelha, fígado, baço e rim e imagens representativas são mostradas na figura 43.

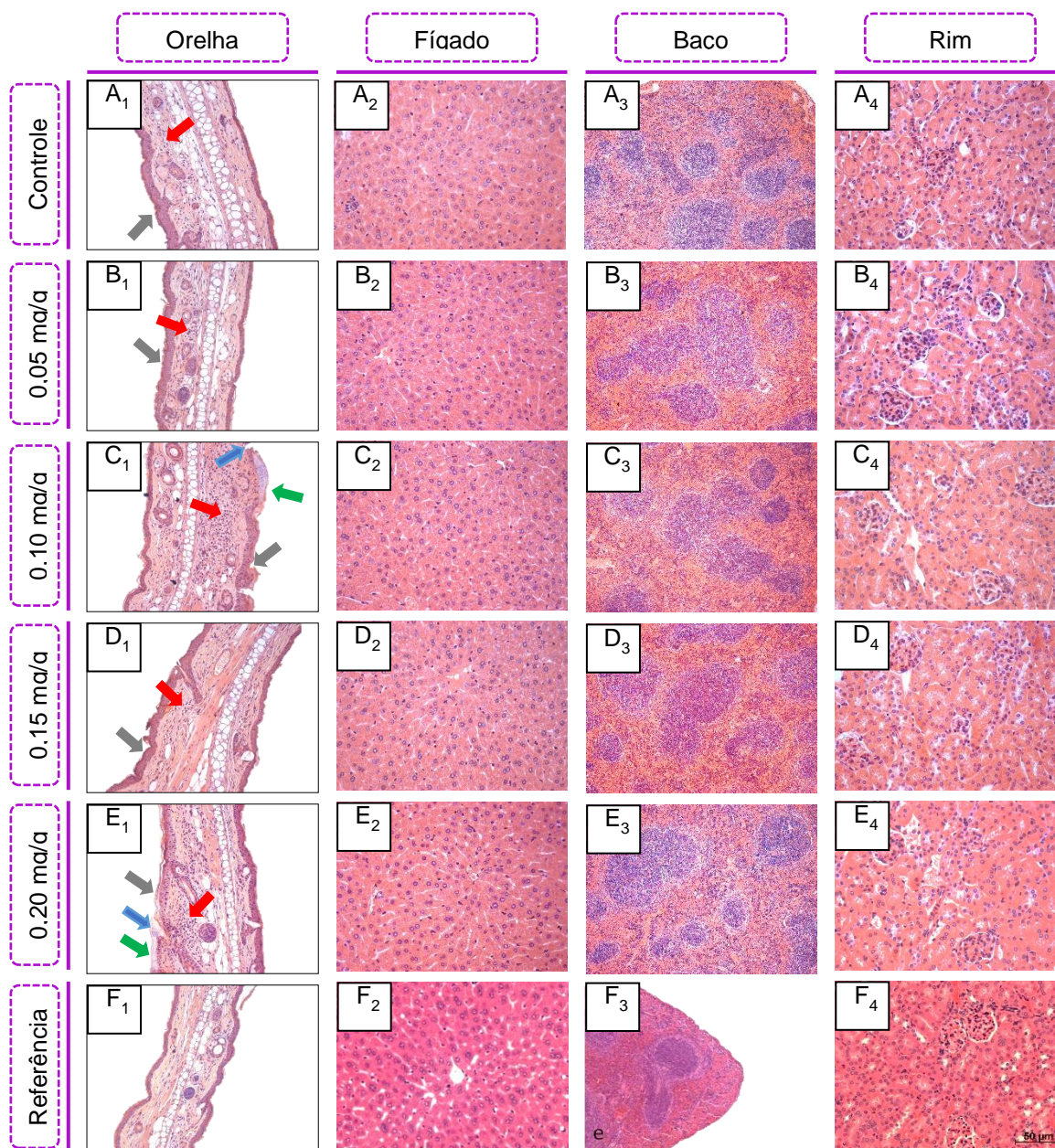


Figura 43 - Análises histológicas de tecidos de camundongos BALB/c expostos, por via tópica, ao 17-DMAG, incorporado em hidrogel, com uso de colares elizabetanos. Camundongos BALB/c, utilizando colares elizabetanos, foram expostos diariamente, por via tópica, a hidrogéis contendo 17-DMAG nas concentrações de 0,05 mg/g (B), 0,10 mg/g (C), 0,15 mg/g (D), 0,20 mg/g (E), ou ao hidrogel branco, como controle (A). Após quatro semanas de exposição, os animais foram eutanasiados e tiveram orelha (1), fígado (2), baço (3) e rins (4) removidos para análise histológica, após coloração com H&E. (F) Tecidos de referência, sem manipulação; Orelha: aumento 20x; Fígado: aumento 40x; Baço: aumento 10x; Rim: aumento 40x. Seta vermelha (→): infiltrado inflamatório com edema; Seta verde (→): crosta; Seta azul (→): úlcera; Seta cinza (→): Espessamento da epiderme com aumento do número de queratinócitos. Referência de orelha (F₁): orelha contralateral dos animais expostos ao hidrogel branco. Referência de fígado (F₂) e rim (F₄) retirados de Stenberg *et al.*, 2021. Referência de baço (F₃) retirado de Schlusshuber *et al.*, 2013.

Fonte: Elaborado pela autora

A análise histológica das orelhas mostrou que houve inflamação, em diferentes intensidades, em todos os grupos expostos ao hidrogel, incluindo o grupo controle (fig. 43). As orelhas dos animais expostos ao hidrogel controle (fig. 43A₁) ou contendo 0,05 mg/g de 17-

DMAG (fig. 43B₁) apresentaram inflamação discreta com presença de poucas células mononucleares, raros neutrófilos, e espessamento da epiderme, com aumento do número de queratinócitos, quando comparados à orelha não exposta (fig. 43F₁). Os sinais inflamatórios foram mais evidentes nas orelhas expostas ao hidrogel contendo 17-DMAG nas concentrações de 0,10 mg/g (fig. 43C₁), 0,15 mg/g (fig. 43D₁) ou 0,20 mg/g (fig. 43E₁). Nos grupos expostos ao 17-DMAG nas concentrações de 0,10 mg/g (fig. 43C₁) e 0,15 mg/g (fig. 43D₁) foi observada inflamação discreta, com presença de algumas células mononucleares, polimorfonucleares e fibroblastos, além de apresentar edema e espessamento epidermal com formação de crosta e ulceração. Na orelha dos animais expostos ao 17-DMAG na concentração de 0,20 mg/g foram observadas características inflamatórias semelhantes ao observado nos outros grupos expostos ao hidrogel contendo 17-DMAG, porém, é importante ressaltar que neste grupo foi observado um edema mais expressivo (fig. 43E₁). Adicionalmente, em nenhum dos grupos expostos diariamente, por via tópica, ao 17-DMAG em hidrogel ou ao hidrogel branco, sem o fármaco, foram observados sinais de toxicidade sistêmica, ao analisar-se o fígado (fig. 43A₂, B₂, C₂, D₂, E₂), baço (fig. 43A₃, B₃, C₃, D₃, E₃) ou rins (fig. 43A₄, B₄, C₄, D₄, E₄), ao final de quatro semanas de exposição, quando comparados às imagens histológicas de referência (fig. 43F₂, F₃ e F₄).

Devido à observação de que, mesmo quando expostos ao hidrogel branco, isto é, na ausência do fármaco 17-DMAG, os animais do grupo controle apresentaram recrutamento de células inflamatórias para o local da aplicação, realizamos um ensaio para avaliar a toxicidade do polímero CMC, responsável pela gelificação do hidrogel, e os resultados são mostrados nas figuras 44 e 45.

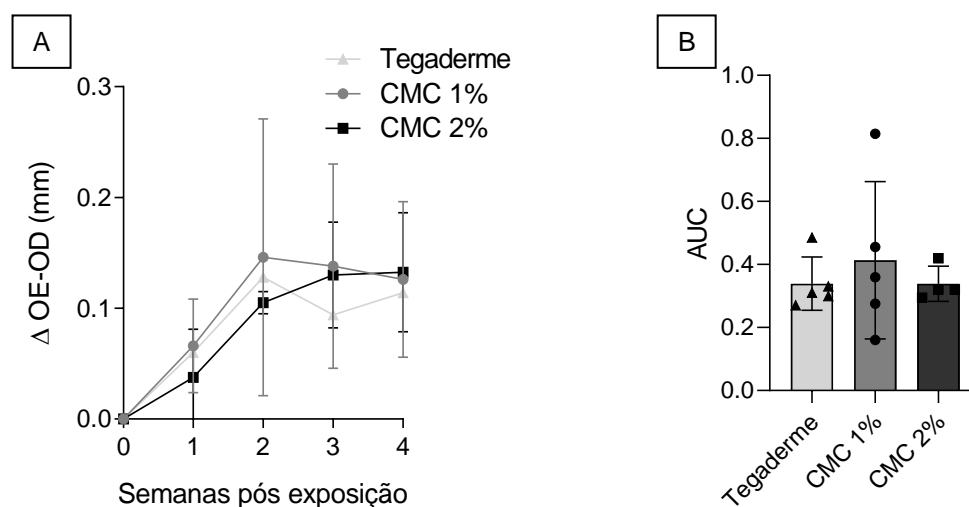


Figura 44 - Avaliação da toxicidade do CMC, aplicado por via tópica em camundongos BALB/c, com uso de colares elizabetanos. Camundongos BALB/c saudáveis, utilizando colares elizabetanos, foram expostos diariamente ao CMC, nas concentrações de 1% ou 2%, ou apenas ao *tegaderm*, como controle, durante quatro semanas. (A) Espessura semanal da espessura da orelha dos animais expostos ao CMC ou *tegaderm*. (B) Área sob a curva (AUC) do gráfico mostrado em “A”. Teste One-way ANOVA.

Fonte: Elaborado pela autora

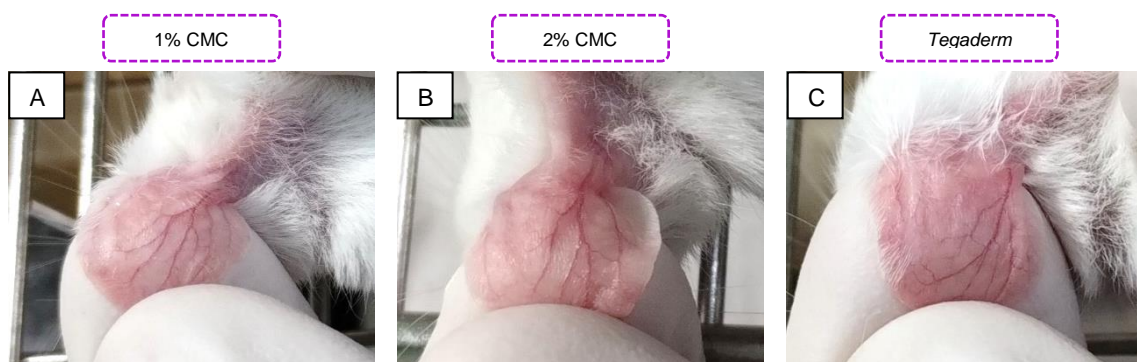


Figura 45 - Imagens representativas das orelhas de camundongos BALB/c após quatro semanas de exposição por via tópica ao CMC, com uso de colares elizabetanos. Camundongos BALB/c saudáveis, utilizando colares elizabetanos, foram expostos diariamente ao CMC, nas concentrações de 1% (A) ou 2% (B), ou apenas ao *tegaderm* (C), como controle, durante quatro semanas. As imagens representativas foram registradas ao final do período de quatro semanas de exposição.

Fonte: Elaborado pela autora

A análise da espessura da orelha mostrou que, desde a primeira semana de exposição, os animais de todos os grupos apresentaram aumento da espessura da orelha, em comparação à orelha contralateral (não exposta) (fig. 44A). Para todos os grupos, esse aumento foi contínuo até a segunda semana de exposição e se manteve constante até o final das quatro semanas de avaliação. Adicionalmente, a análise da área sob a curva do acompanhamento mostrou que não houve diferença na espessura da orelha ao longo das quatro semanas de análise entre os diferentes grupos (fig. 44B). Adicionalmente, comparadas à orelha contralateral, clinicamente não foram observadas diferenças no aspecto do local da exposição entre os animais expostos ao

CMC na concentração de 1% (fig. 45A), 2% (fig. 45B), ou apenas ao *tegaderm* (fig. 45C), apenas uma leve vermelhidão, que não foi observada na orelha contralateral.

4.5 AVALIAÇÃO DA REVERSIBILIDADE DA TOXICIDADE DO 17-DMAG EM HIDROGEL EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS POR *L. braziliensis*

A avaliação da reversibilidade da toxicidade causada pela aplicação tópica do 17-DMAG em hidrogel foi avaliada em camundongos BALB/c infectados com 10^5 de promastigotas estacionárias de *L. braziliensis*. Após trinta dias de infecção, não foram observadas lesões características da leishmaniose tegumentar, com borda elevada e fundo necrótico, bem desenvolvidas e com inflamação e secreção no local, sendo apresentadas apenas pequenas pápulas ou pequenas lesões ulceradas. Como não foi possível avaliar a eficácia da aplicação tópica do 17-DMAG neste experimento devido à evolução discreta das lesões nos animais infectados, o tratamento foi interrompido após cinco semanas (fig. 46A) e a reversibilidade da toxicidade causada pela exposição tópica ao composto em hidrogel foi avaliada ao longo de seis semanas adicionais, na ausência do tratamento (fig. 46). Neste ensaio, os animais não utilizaram colares elizabetanos.

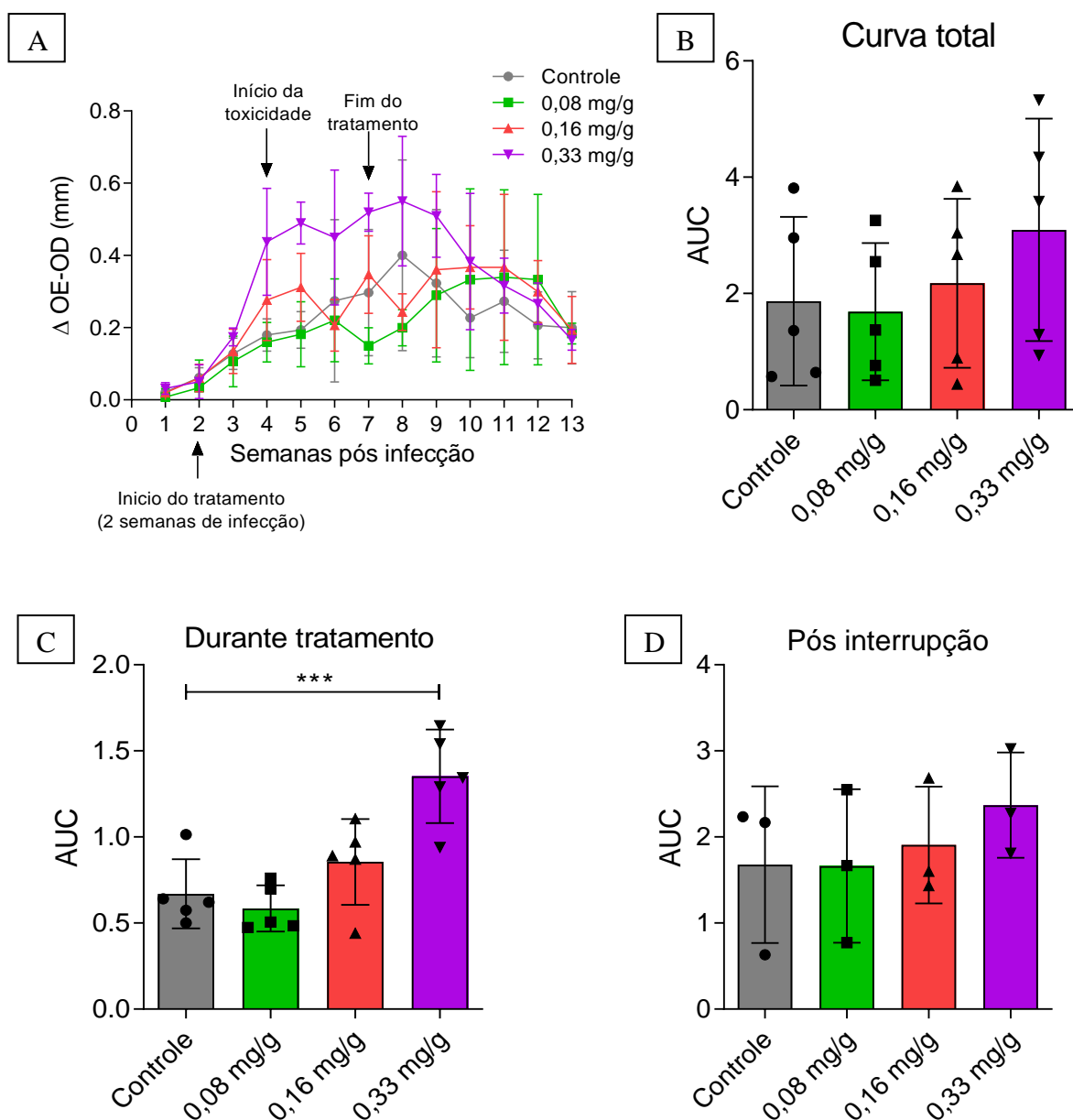


Figura 46 – Avaliação da reversibilidade da toxicidade causada pela aplicação tópica do 17-DMAG em hidrogel, em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 10^5 promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária e, após duas semanas, foram diariamente tratados com 17-DMAG incorporado em hidrogel, nas concentrações de 0,08 mg/g; 0,16 mg/g ou 0,33 mg/g durante cinco semanas e posteriormente acompanhados por seis semanas adicionais na ausência de tratamento. Como controle, animais infectados foram expostos ao hidrogel branco, sem 17-DMAG. Os resultados são expressos como a diferença da espessura da orelha tratada, em relação à contralateral. (A) Espessura semanal da orelha dos animais tratados com 17-DMAG em hidrogel ou controle; (B) Área sobre a curva (AUC) da espessura das orelhas mostradas em “A”. (C) AUC da espessura da orelha durante o tratamento. (D) AUC da espessura da orelha após suspensão do tratamento. Teste One-way ANOVA, *** $p < 0,001$.

Fonte: Elaborado pela autora

Como observado no experimento de toxicidade *in vivo*, apenas os animais tratados por via tópica com o 17-DMAG em hidrogel na maior concentração testada, de 0,33 mg/g, apresentaram aumento expressivo da espessura da orelha ao longo do período de tratamento

(fig. 46A). Para os animais dos grupos tratados com 0,08 ou 0,16 mg/g de 17-DMAG em hidrogel, não foi observado aumento da espessura da orelha, em comparação com o grupo controle, em nenhum dos tempos avaliados (fig. 46A). Apenas no grupo tratado com 0,33 mg/g de 17-DMAG incorporado em hidrogel após três semanas de tratamento, foi observado aumento significativo da espessura da orelha no grupo tratado, em comparação com o grupo controle ($0,49 \pm 0,058$ mm vs $0,19 \pm 0,051$ mm, respectivamente – Teste One-way ANOVA, **** $p < 0,0001$) (fig. 46A). Adicionalmente, não foi observado significância estatística na análise da área sob a curva (AUC) das medições das espessuras das orelhas dos animais dos grupos tratados, ao longo das treze semanas de acompanhamento, em nenhuma das concentrações testadas (0,08 mg/g: $1,688 \pm 1,179$; 0,16 mg/g: $2,176 \pm 1,451$; 0,33 mg/g: $3,095 \pm 1,914$), em comparação ao grupo controle ($1,868 \pm 1,448$) (fig. 46B).

Considerando-se apenas a área sob a curva (AUC) das medições da espessura da orelha dos animais durante o período de tratamento, não foram observadas diferenças entre os grupos tratados com o 17-DMAG em hidrogel nas concentrações de 0,08 mg/g ($0,585 \pm 0,135$) ou 0,16 mg/g ($0,855 \pm 0,25$), em comparação com o grupo controle, tratado com o hidrogel branco ($0,67 \pm 0,2$). Apenas para a concentração de 0,33 mg/g de 17-DMAG em hidrogel foi observada diferença na AUC das medições da espessura da orelha dos animais tratados, em comparação ao grupo controle ($1,352 \pm 0,271$ vs $0,67 \pm 0,2$, respectivamente – Teste One-way ANOVA, *** $p < 0,001$) (fig. 46C). Adicionalmente, considerando-se apenas a AUC das medições da espessura da orelha dos animais após a suspensão do tratamento, não foram observadas diferenças entre os grupos dos animais tratados com as diferentes concentrações do 17-DMAG em hidrogel (0,08 mg/g: $1,663 \pm 0,89$; 0,16 mg/g: $1,907 \pm 0,679$; 0,33 mg/g: $2,37 \pm 0,61$), em comparação com o grupo controle ($1,678 \pm 0,908$) (fig. 46D). Foi observado que, duas semanas após a interrupção do tratamento, houve uma diminuição progressiva da espessura da orelha dos animais tratados com o 17-DMAG na concentração de 0,33 mg/g em hidrogel (fig. 46A), o que se refletiu na AUC das mensurações da espessura da orelha nesse período (fig. 46D). Seis semanas após a interrupção de tratamento, as medidas das espessuras das orelhas foram similares entre os diferentes grupos tratados (0,08 mg/g: $0,183 \pm 0,028$ mm; 0,16 mg/g: $0,193 \pm 0,093$ mm; 0,33 mg/g: $0,167 \pm 0,029$ mm), em comparação ao grupo controle ($0,2 \pm 0,1$ mm), sem diferenças estatísticas entre os grupos (fig. 46A).

Em conjunto, esses resultados mostram que apenas na maior concentração testada do 17-DMAG em hidrogel foi observada toxicidade nos animais, em comparação ao grupo controle (fig. 46A). Adicionalmente, esses resultados nos permitem inferir que a toxicidade causada pelo 17-DMAG na concentração de 0,33 mg/g, refletida no aumento da espessura da

orelha dos animais tratados, pode ser revertida após a suspensão do tratamento. Em suma, esses resultados indicam que concentrações mais elevadas do 17-DMAG podem ser utilizadas para avaliação da eficácia do tratamento tópico, uma vez que, mesmo com ocorrência de toxicidade, esta pode ser revertida, após finalização do tratamento.

4.6 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO 17-DMAG EM BASE SEMISSÓLIDA DE HIDROGEL, APLICADO POR VIA TÓPICA, NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/c POR *L. braziliensis*

A eficácia do tratamento de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* usando o 17-DMAG em hidrogel por via tópica foi avaliada em dois ensaios: (i) sem o uso de colares elizabetanos (fig. 47 e 48) ou (ii) com o uso de colares elizabetanos (fig. 49 e 50).

Uma vez que, no experimento de toxicidade sem o uso de colares elizabetanos, foi demonstrado que apenas quando expostos diariamente à concentração de 0,30 mg/g de 17-DMAG em hidrogel, os animais apresentaram sinais de toxicidade local, apenas as concentrações de 0,15; 0,20 e 0,25 mg/g de 17-DMAG em hidrogel foram testadas para a avaliação da eficácia deste tratamento tópico no controle da infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*. Os resultados dessa análise são mostrados na figura 47.

A partir das mensurações semanais das espessuras das orelhas dos animais tratados por via tópica com diferentes concentrações do 17-DMAG, sem o uso de colares elizabetanos, foi possível observar que o tratamento da infecção experimental de camundongos BALB/c utilizando esse fármaco, por via tópica, não reduziu as lesões causadas pela infecção ao longo do tempo avaliado, em comparação com a espessura das orelhas dos animais dos grupos controles (não tratado ou tratado com o hidrogel branco, sem o fármaco) (fig. 47A). Em nenhum dos tempos avaliados (1, 2, 3 ou 4 semanas de tratamento) foi observada redução da espessura da orelha dos animais submetidos ao tratamento, mesmo que de forma transitória (fig. 47A). Após quatro semanas, tempo máximo de tratamento com aplicação diária do 17-DMAG por via tópica, não foram observadas diferenças na espessura da orelha infectada, em comparação com a contralateral, dos animais tratados diariamente com o 17-DMAG nas concentrações de 0,15 mg/g ($0,332 \pm 0,15$ mm), 0,20 mg/g ($0,3 \pm 0,169$ mm) ou 0,25 mg/g ($0,43 \pm 0,181$ mm), em comparação com o grupo não tratado ($0,184 \pm 0,142$ mm) ou o grupo tratado com o hidrogel branco ($0,214 \pm 0,112$ mm) (Teste One-way ANOVA) (fig. 47A). De maneira similar, não foram observadas diferenças na área sob a curva (AUC) das medidas semanais das espessuras das orelhas dos animais tratados (0,15 mg/g: $1,903 \pm 1,014$; 0,20 mg/g: $1,214 \pm 0,441$; 0,25

mg/g: $1,78 \pm 0,765$), em comparação aos controles (não tratado: $1,16 \pm 0,837$; hidrogel branco: $1,389 \pm 0,618$) (fig. 47B).

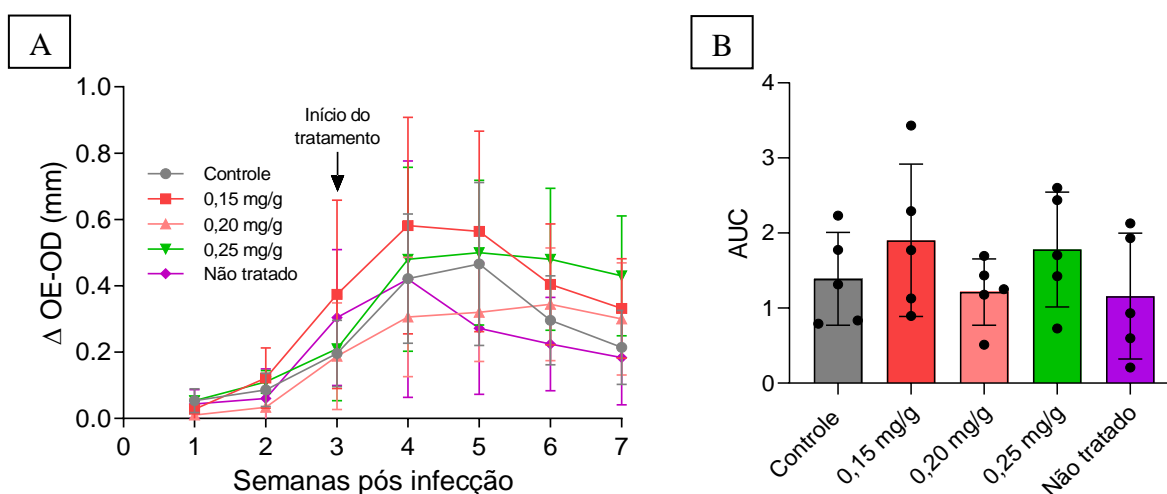


Figura 47 – Avaliação da eficácia do tratamento tópico com o 17-DMAG, incorporado em hidrogel, no controle da infecção e camundongos BALB/c por *L. braziliensis*, sem uso de colares elizabetanos. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após três semanas de infecção, foram tratados diariamente, por via tópica, com 17-DMAG incorporado em hidrogel nas concentrações de 0,15 mg/g; 0,20 mg/g ou 0,25 mg/g. Como controles, animais infectados não foram expostos a nenhum tratamento e animais infectados foram tratados com o hidrogel branco, sem 17-DMAG. Os resultados são expressos como a diferença da espessura da orelha infectada em relação à contralateral. (A) Espessura semanal da lesão na orelha dos animais tratados com o hidrogel branco ou com as diferentes concentrações de 17-DMAG. (B) Área sobre a curva (AUC) da espessura das lesões mostradas em “A”. Teste One-way ANOVA.

Fonte: Elaborado pela autora

A figura 48 mostra imagens representativas das orelhas dos animais tratados com diferentes concentrações do 17-DMAG em hidrogel, por via tópica, após quatro semanas de tratamento. De acordo com as imagens, foi observado que o aspecto das lesões nas orelhas dos animais do grupo não tratado (fig. 48A), ao final do período de acompanhamento (sétima semana de infecção), foi similar ao observado no grupo tratado com o hidrogel branco (fig. 48C), onde observam-se lesões pequenas, mas notáveis, em fase de regressão, com hiperemia e aspecto de inflamação local. Apesar de não ter sido observada redução na espessura da orelha dos animais tratados com 0,15 mg/g de 17-DMAG, a lesão na orelha dos animais deste grupo após quatro semanas de tratamento apresentou-se como uma ferida reduzida, com hiperemia dispersa na região da aplicação (fig. 48E). De maneira similar, os animais tratados com 0,20 mg/g de 17-DMAG (fig. 48G) apresentaram, após quatro semanas de tratamento, hiperemia localizada e sem lesão ulcerada, similar ao observado no grupo tratado com o hidrogel branco (fig. 48G). Por fim, nos animais tratados com 0,25 mg/g de 17-DMAG diariamente, por via tópica, após quatro semanas de tratamento (fig. 48I e K) foi observado lesões abertas e ulceradas, com secreção purulenta (fig. 48I), indicativo de inflamação local, além da presença

de hiperemia localizada (fig. 48I) ou dispersa (fig. 48K). Além disso, neste grupo foi observada a presença de tecido cicatricial em todo o local de aplicação (fig. 48K), que pode ter contribuído para o aumento da espessura da orelha observado ao final do tratamento deste grupo, mesmo na ausência de diferenças estatísticas (fig. 48A). Com relação aos linfonodos, não foram observadas diferenças nos tamanhos deste órgão entre os animais dos grupos tratados por via tópica com diferentes concentrações do 17-DMAG (fig. 48F; H; J; L), em comparação com os linfonodos dos animais dos grupos controles (fig. 48B e D).

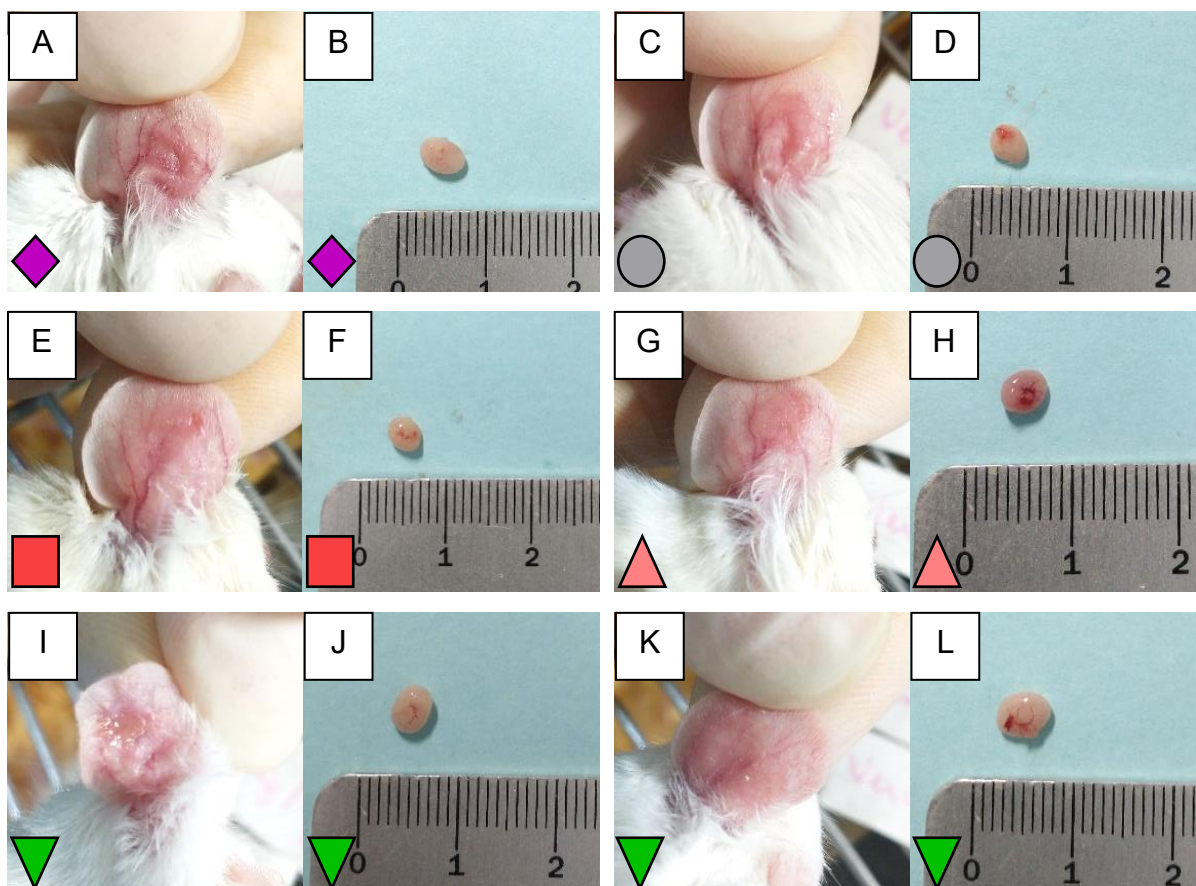


Figura 48 – Imagens representativas das orelhas e linfonodos de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* após quatro semanas de tratamento por via tópica com o 17-DMAG, incorporado em hidrogel, na ausência de colares elizabetanos. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após três semanas de infecção, foram tratados diariamente, por via tópica, com 17-DMAG, incorporado em hidrogel, nas concentrações de (E-F) 0,15 mg/g; (G-H) 0,20 mg/g ou (I-L) 0,25 mg/g. Como controles, animais infectados não foram expostos a nenhum tratamento (A-B) e animais infectados foram tratados com o hidrogel branco, sem 17-DMAG (C-D). Após quatro semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados e tiveram a orelha e linfonodo removidos.

Fonte: Elaborado pela autora

Em conjunto, na ausência do emprego de colar elizabetano, os resultados obtidos mostram que a aplicação diária do 17-DMAG em hidrogel, por via tópica, promoveu uma

melhora do aspecto da lesão, que, no entanto, não refletiu na redução do tamanho da lesão em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*.

No segundo ensaio realizado, para evitar a remoção do tratamento, foram utilizados colares elizabetanos. Assim, decidimos utilizar concentrações menores do 17-DMAG pois o tempo de exposição dos animais ao fármaco seria maior. Apesar de ter sido observado, no ensaio de toxicidade com o uso de colares elizabetanos que a AUC das mensurações diárias do tratamento por via tópica mostrou aumento da espessura da orelha em todas as concentrações testadas, exceto na de 0,05 mg/g (fig. 41), testamos a eficácia do 17-DMAG em hidrogel nas concentrações de 0,05 mg/g; 0,10 mg/g ou 0,15 mg/g (fig. 49). Além disso, no teste de toxicidade anteriormente realizado com uso de colares elizabetanos, foi observado também que a exposição tópica ao hidrogel branco, sem o fármaco, causou recrutamento de células inflamatórias para o local da aplicação (fig. 43A). Assim, realizamos a análise comparativa entre os grupos tratados com 0,10 mg/g ou 0,15 mg/g de 17-DMAG e o grupo não tratado, excluindo o grupo tratado com o hidrogel branco, eliminando a influência da aplicação do hidrogel na espessura das orelhas infectadas e tratadas com o 17-DMAG durante três (fig. 49B) ou quatro semanas (fig. 49C). O tratamento com 0,10 mg/g de 17-DMAG em hidrogel por via tópica não reduziu a espessura da orelha dos animais tratados, em comparação com o grupo controle ($0,414 \pm 0,148$ mm vs $0,644 \pm 0,219$ mm, respectivamente – Teste One-way ANOVA), após três semanas de tratamento (fig. 49B). Entretanto, após o mesmo período, o tratamento com 0,15 mg/g de 17-DMAG em hidrogel por via tópica causou redução da espessura da orelha dos animais tratados, em comparação ao grupo controle não tratado ($0,314 \pm 0,161$ mm vs $0,644 \pm 0,219$ mm, respectivamente – Teste One-way ANOVA, * $p < 0,05$) (fig. 49B). Adicionalmente, foi observado que, após quatro semanas de tratamento, tanto os animais tratados com 0,10 mg/g quanto 0,15 mg/g de 17-DMAG em hidrogel, por via tópica, apresentaram diminuição da espessura da orelha, em comparação com o grupo controle não tratado ($0,282 \pm 0,099$ mm vs $0,284 \pm 0,11$ mm vs $0,534 \pm 0,193$ mm, respectivamente – Teste One-way ANOVA, * $p < 0,05$) (fig. 49C).

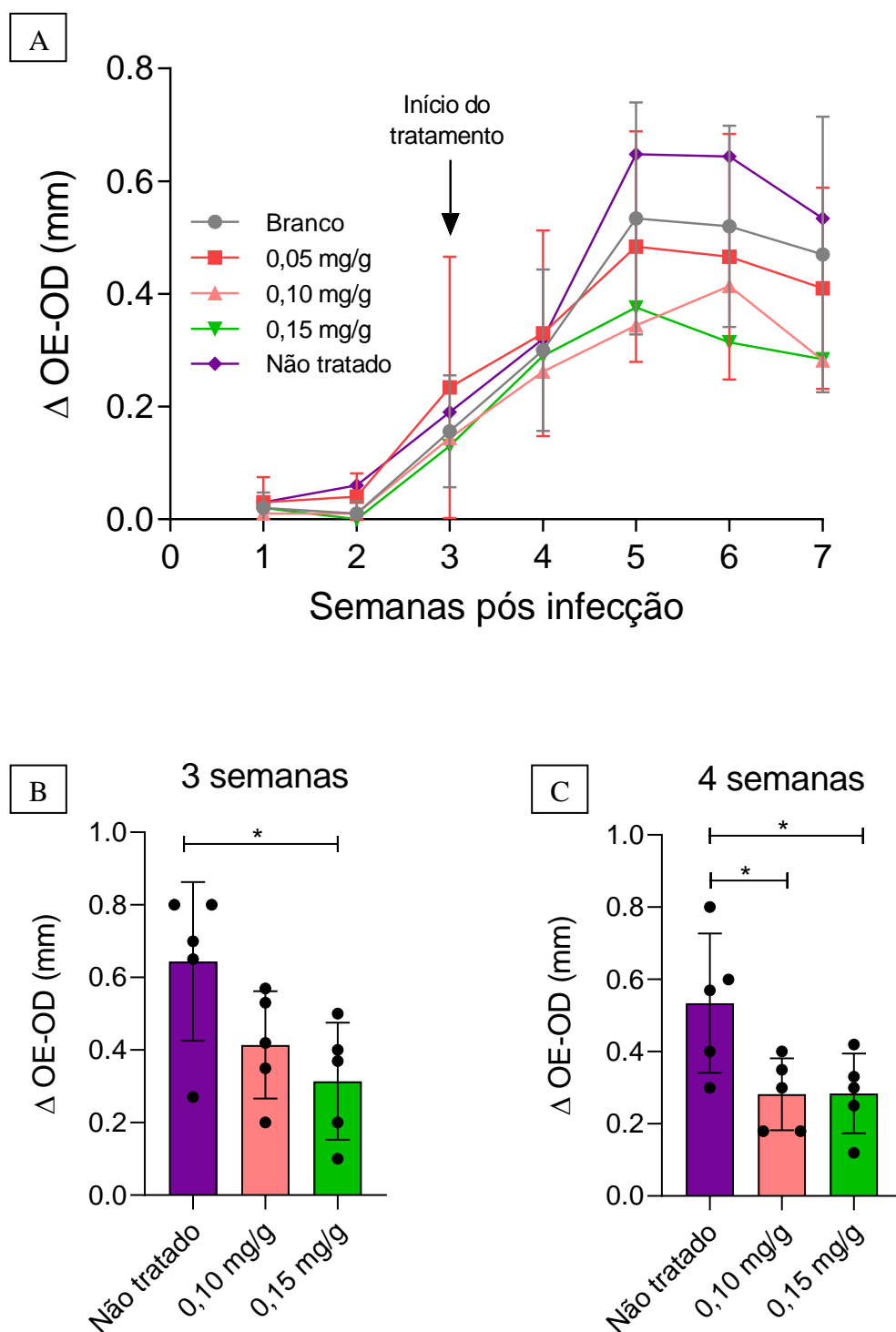


Figura 49 – Avaliação da eficácia do tratamento tópico com o 17-DMAG, incorporado em hidrogel, no controle da infecção e camundongos BALB/c por *L. braziliensis*, com uso de colares elizabetanos. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após três semanas de infecção, foram tratados diariamente, por via tópica, com 17-DMAG incorporado em hidrogel nas concentrações de 0,05 mg/g; 0,10 mg/g ou 0,15 mg/g, utilizando colares elizabetanos. Como controle, animais infectados foram tratados com o hidrogel branco, sem 17-DMAG. Os resultados são expressos como a diferença da espessura da orelha infectada em relação à contralateral. (A) Espessura semanal da lesão na orelha dos animais tratados com o hidrogel branco ou com as diferentes concentrações de 17-DMAG. (B-C) Espessura da lesão na orelha dos animais tratados com o hidrogel branco ou com as diferentes concentrações de 17-DMAG após (B) três ou (C) quatro semanas de tratamento. Teste One-way ANOVA, * $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pela autora

O aspecto semanal das orelhas dos animais infectados e tratados ou não com as diferentes concentrações do 17-DMAG em hidrogel, com uso de colar elizabetano, bem como o linfonodo desses animais, após 28 dias de tratamento, são mostrados na figura 50.

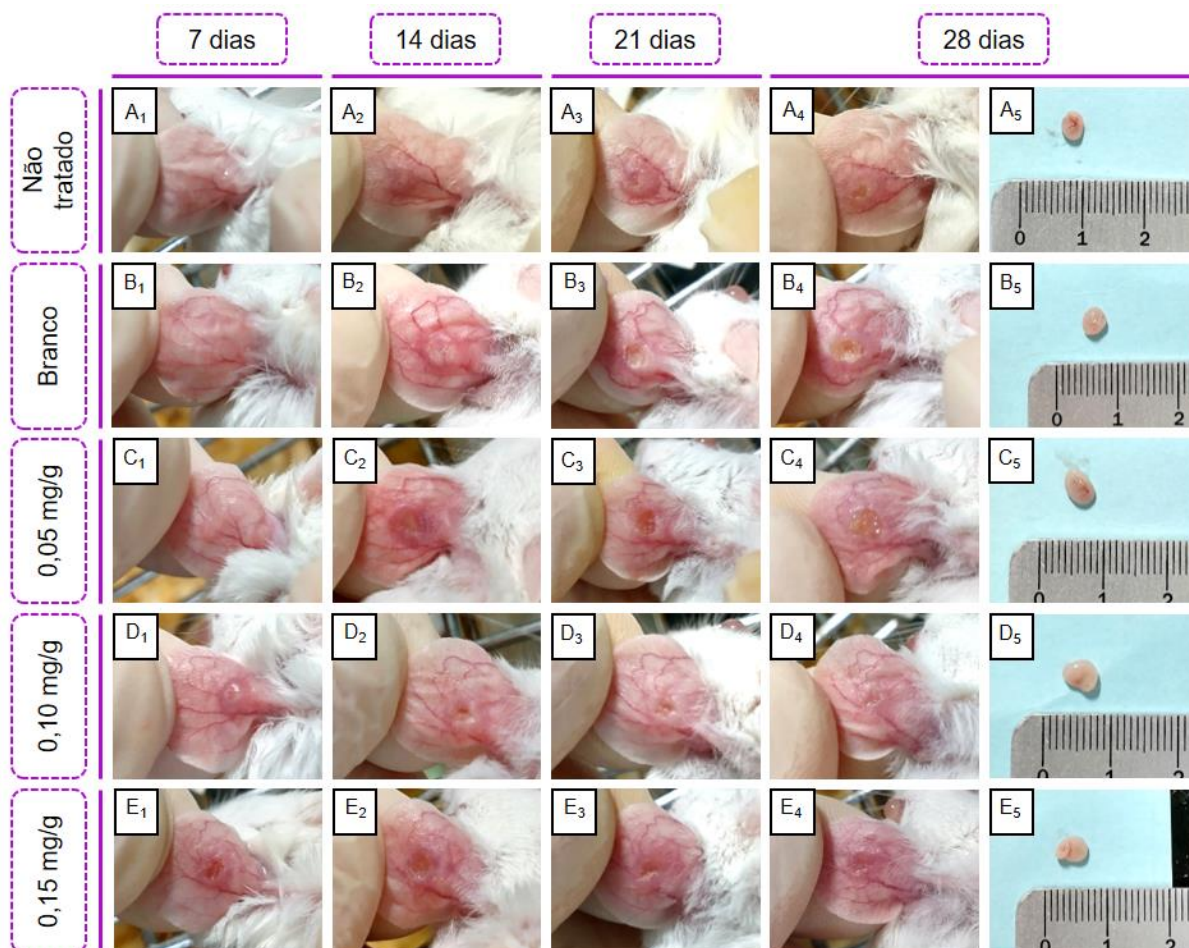


Figura 50 – Imagens representativas das orelhas e linfonodos de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* ao longo de quatro semanas de tratamento por via tópica com o 17-DMAG, incorporado em hidrogel, com uso de colares elizabetanos. Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com 5×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e, após três semanas de infecção, foram tratados diariamente, por via tópica, com 17-DMAG, incorporado em hidrogel, nas concentrações de (C) 0,05 mg/g, (D) 0,10 mg/g ou (E) 0,15 mg/g. Como controles, animais infectados não foram expostos a nenhum tratamento (A) ou animais infectados foram tratados com o hidrogel branco, sem o 17-DMAG (B). Após quatro semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados e tiveram a orelha e linfonodo removidos. (A) Não tratado; (B) Hidrogel branco; (C) 0,05 mg/g; (D) 0,10 mg/g; (E) 0,15 mg/g; (1) Orelha após uma semana de tratamento; (2) Orelha após duas semanas de tratamento; (3) Orelha após três semanas de tratamento; (4) Orelha após quatro semanas de tratamento; (5) Linfonodo retroauricular após quatro semanas de tratamento.

Fonte: Elaborado pela autora

Em concordância com os dados das mensurações das orelhas dos animais infectados e tratados ou não com o 17-DMAG por via tópica (fig. 49), na análise do aspecto das lesões destes animais foi observado que, tanto para o grupo controle não tratado (fig. 50A₁-A₄) quanto para

o grupo controle tratado com o hidrogel branco (fig. 50B₁-B₄), houve evolução da lesão causada pela infecção ao longo do tempo analisado, sendo observado, na quarta semana de avaliação, lesões com aspecto ulcerado, de bordas elevadas e com secreção purulenta, características de inflamação local, causada pela infecção por *L. braziliensis* e edema. De maneira similar, o grupo tratado com 0,05 mg/g de 17-DMAG em hidrogel por via tópica apresentou evolução da lesão ao longo das semanas de acompanhamento e, na quarta semana de avaliação, as lesões apresentaram aspecto de ferida ulcerada, também com secreção purulenta (fig. 50C₁-C₄). Entretanto, em concordância com os resultados das mensurações das orelhas mostradas na figura 49, os resultados mostraram que as orelhas dos animais tratados com 0,10 mg/g (fig. 50D₁-D₄) ou 0,15 mg/g (fig. 50E₁-E₄) apresentaram uma melhora clínica evidente, com redução da área de lesão causada pela infecção ao longo das semanas de tratamento e, após quatro semanas de tratamento, foram observadas lesões menores, em comparação com os outros três grupos descritos acima, com características de cicatrização, especialmente para o grupo tratado com 0,10 mg/g de 17-DMAG (fig. 50D₄). Para ambos os grupos, após quatro semanas de tratamento, poucos animais apresentaram secreção purulenta no local da infecção/tratamento e raros apresentaram lesões ulceradas, com bordas elevadas e fundo necrótico (fig. 50C₁-C₄ e 50D₁-D₄). É importante ressaltar que a aplicação tópica do 17-DMAG em hidrogel, em todas as concentrações testadas, mostrou ser bem tolerada pelos animais, mesmo na presença de lesões ulceradas.

Em relação ao tamanho dos linfonodos não foram observadas diferenças entre os animais dos grupos tratados com as diferentes concentrações do 17-DMAG e aqueles dos grupos controles (50A₅; B₅; C₅; D₅ e E₅). No que diz respeito ao peso dos animais, não foram observadas diferenças ao longo das quatro semanas de tratamento entre os animais em uso de colares elizabetanos ou o grupo não tratado, que não utilizou esse aparato, demonstrando que ele não interfere na alimentação e hidratação desses animais (dados não mostrados).

Em conjunto, esses dados mostram que o tratamento por via tópica com 0,10 mg/g ou 0,15 mg/g de 17-DMAG, aplicado diariamente e com uso de colares elizabetanos, é eficaz no controle da infecção experimental de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*, especialmente quando aplicado por quatro semanas, e pode ser indicado como um potencial candidato eficaz no tratamento não invasivo da leishmaniose tegumentar.

5 DISCUSSÃO

No presente capítulo, avaliamos a eficácia da aplicação do 17-DMAG por via tópica, incorporado em base semissólida de hidrogel, no controle da infecção *in vivo* de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*. Mostramos, inicialmente, que a concentração do 17-DMAG necessária para causar morte de 50% da cultura de células de linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) foi mais de quatro vezes maior que aquela contra os macrófagos primários, e quase duas mil vezes maior que contra amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. Devido à nossa formulação ser pensada para uma aplicação tópica, era imprescindível que o fármaco fosse seguro para células de linhagem da pele (Carvalho et al., 2021; Sosa et al., 2022).

Diversos trabalhos que estudam novas moléculas a serem testadas para tratamento de leishmaniose cutânea com aplicação por via tópica, realizam, inicialmente, ensaios *in vitro* com células HaCaT para estimar a toxicidade que poderá, posteriormente, ser observada sobre a pele, em ensaios *in vivo* (Berenguer et al., 2019, 2020; Moreno et al., 2019; Carvalho et al., 2021; Ferreira et al., 2021; Brustolin et al., 2022). Resultados similares aos nossos foram obtidos por Moreno e colaboradores (2019), que observaram que o composto Dapsona causa maior toxicidade sobre amastigotas intracelulares de *L. major* e *L. braziliensis* que sobre macrófagos peritoneais e células HaCaT, respectivamente. Recentemente, Brustolin e colaboradores (2022), mostraram que a toxicidade do composto cinamaldeído foi similarmente maior para amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* que para HaCaT. Em ambos os trabalhos, com base nos ensaios realizados *in vitro*, é sugerida a segurança da aplicação tópica desses compostos em ensaios *in vivo*. Dessa forma, a alta concentração do 17-DMAG necessária para causar toxicidade às células HaCaT mostrada nos nossos ensaios, somada à diferença de quase duas mil vezes entre o CC₅₀ do 17-DMAG para células HaCaT e o IC₅₀ para amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* confirmam a segurança de podermos testar o composto por via tópica.

Posteriormente, avaliamos a estabilidade do 17-DMAG em base semissólida de hidrogel, ao longo de 90 dias, expostos à diferentes temperaturas. Essa etapa do estudo mostrou que a formulação do 17-DMAG em base semissólida de hidrogel é estável por, pelo menos, 90 dias, quando estocado à temperatura ambiente ou a 4 °C, mas não quando armazenadas a 37 °C. Diferentes fatores são descritos na literatura como sendo capazes de afetar a estabilidade de um fármaco, incluindo exposição à luz, pH, oxidação e temperatura (Briscoe and Hage, 2021). Não foram encontrados relatos na literatura da incorporação do 17-DMAG em bases semissólidas para aplicações tópicas, porém, é descrito que o 17-DMAG é estável, quando

estocado à temperatura ambiente, por pelo menos dois meses (GLAZE et al., 2005). Em estudo avaliando a estabilidade de um outro antibiótico, a tetraciclina, em hidrogel foi observado que, apesar da incorporação do composto em base semissólida ter aumentado a sua estabilidade, houve uma redução da concentração do fármaco ao longo de 63 dias quando exposto à 23 °C, não observado a 5 °C (KOSTRZEBSKA et al., 2021). Essa redução da estabilidade também foi acompanhada de alteração na coloração do fármaco (KOSTRZEBSKA et al., 2021), em analogia ao observado para a formulação do 17-DMAG em nosso estudo. É importante ressaltar que, devido à prevalência de casos de leishmaniose em países em desenvolvimento e áreas rurais ou de difícil acesso, acreditamos que a pesquisa por novos medicamentos que apresentam estabilidade à temperatura ambiente ou mais elevadas pode facilitar as possibilidades de transporte e alocação deles, aumentando o alcance do tratamento em regiões mais remotas dos países atingidos por esta doença negligenciada. Dessa forma, os resultados obtidos indicam que há necessidade de ajustes nesta formulação tópica do 17-DMAG, que será feita em etapas do desenvolvimento pré-industrial, com a adição de agentes estabilizantes, objetivando melhorar a estabilidade da molécula para que possa ser posteriormente testada em humanos.

Avaliamos também o perfil de liberação do 17-DMAG a partir da base semissólida do hidrogel, onde o composto foi previamente incorporado, e observamos que o fármaco foi liberado mais rapidamente nas primeiras 12 h e de maneira contínua e mais sustentada nas 12 h seguintes, totalizando a liberação de aproximadamente 60% do composto durante as 24 h de análise. Este resultado está de acordo com a literatura pois a configuração em formato de malha polimérica do hidrogel possibilita uma liberação sustentada do princípio ativo ao longo do tempo (HAMIDI et al., 2008; BHOWMIK et al., 2012; ANSELMO et al., 2018; SENAPATI et al., 2018; SINGH et al., 2019). Resultado similar foi observado por Sharma et al. (2018) que mostraram que o antibiótico levofloxacino ao ser incorporado em hidrogel composto pelo polímero quitosana, apresentou uma liberação da malha do gel de forma sustentada, tendo um percentual de cerca de 70% do fármaco liberado após 60 h de incubação. Malik et al. (2017) também observaram resultados similares utilizando o fármaco hidrofílico antiviral aciclovir, que ao ser incorporado em hidrogel composto pelo polímero CMC e conjugado ao oligossacarídeo β -ciclodextrina, teve liberação de 60% nas primeiras 18 h e 100% ao fim de 24 h. É possível que a liberação controlada do 17-DMAG tenha algum papel na redução da ocorrência de toxicidade local e sistêmica (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2014; ANSELMO et al., 2018). Estudos deverão ser realizados para avaliar este efeito nos tratamentos *ex vivo* utilizando modelo de permeação com pele humana ou de porco.

Para estabelecer os parâmetros relacionados aos ensaios *in vivo*, testamos a toxicidade da formulação tópica do 17-DMAG aplicada em orelhas de camundongos BALB/c saudáveis. A formulação foi testada em diferentes concentrações de 17-DMAG em animais utilizando ou não colar elizabetano. Com o emprego desse dispositivo, que protege o local de aplicação da formulação, o 17-DMAG causou toxicidade mesmo nas concentrações mais baixas, não sendo tóxica apenas na menor delas, 0,05 mg/g do fármaco em hidrogel. Colares elizabetanos constituem uma medida não farmacêutica frequentemente recomendada na veterinária para evitar o contato da boca ou das patas dos animais com regiões específicas do corpo, como abdômen ou orelha, evitando contaminações pós cirúrgicas ou remoção de tratamentos ou dispositivos externos colocados nesses animais (SHENODA et al., 2020). A utilização de colares elizabetanos evita também a remoção de tratamentos tópicos aplicados em animais que possuem hábito de limpeza com a língua e, conseqüentemente, aumentam o tempo de exposição ao fármaco que, em última instância, pode levar ao aparecimento de sinais de toxicidade local em modelos experimentais (COHN; CÔTÉ, 2020; STAPLETON; LEE, 2021). Resultado similar ao encontrado no presente estudo foi observado por Rauptys (2008), que observou aumento da exposição do fármaco rapamicina e de sua taxa de absorção quando aplicado por via tópica no tratamento de tumores em camundongos nude. Como esperado, a toxicidade local observada em nosso estudo não causou toxicidade em órgãos internos (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2014; ANSELMO et al., 2018). Similar a outro estudo (JO et al., 2014), a base de hidrogel sem o composto se mostrou tóxico, com aumento da espessura da orelha exposta em comparação com a contralateral. De fato, a exposição prolongada da pele a qualquer substância, incluindo compostos inofensivos, como a água, pode levar a algum grau de irritação (WELSS et al., 2004). Assim, outros fatores, como o veículo ou a manipulação podem contribuir para a toxicidade detectada em nosso estudo. Alternativamente, é possível que, em nosso estudo, o achado de células inflamatórias recrutadas para o local da exposição do hidrogel seja causado pela manipulação diária da orelha dos animais, uma vez que a lesão física do tecido pode produzir uma resposta inflamatória local, com dilatação dos vasos e recrutamento de células para o sítio da lesão (CHEN et al., 2018).

A reversibilidade da toxicidade detectada em animais tratados com hidrogel contendo 17-DMAG ou o hidrogel controle, estão de acordo com a reversão de toxicidade, após a suspensão do tratamento, observada em animais com onicomiose tratados com eficonazol por via tópica (Jo et al., 2014). Adicionalmente, a toxicidade em animais apresentando tumores epiteliais causada pelo tratamento com inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) foi reversível após a suspensão do tratamento (Li and Perez-Soler, 2009).

Além disso, foi anteriormente descrito que ensaios de toxicidade tópica em modelo animal superestimam a possibilidade de toxicidade no homem, não sendo assim, necessariamente, preditivos desse parâmetro clínico (WELSS et al., 2004; BASKETTER et al., 2012). Dessa forma, nossos achados apontaram para a possibilidade de testarmos a eficácia do 17-DMAG por via tópica no tratamento da leishmaniose cutânea em modelo animal.

Assim, avaliamos a eficácia do 17-DMAG no modelo de leishmaniose cutânea de BALB/c infectados com *L. braziliensis*, utilizando colar elizabetano. Aqueles tratados diariamente com formulações contendo as duas maiores concentrações do 17-DMAG (0,10 mg/g e 0,15 mg/g), apresentaram redução na espessura da orelha, em comparação aos animais não tratados, além de termos observado fechamento da lesão ao final do tratamento. Outros estudos que utilizaram o tratamento tópico com base em hidrogel contendo diferentes fármacos mostraram redução da lesão ou cicatrização da pele em diferentes modelos experimentais de leishmaniose cutânea causada por *L. amazonensis* (GONÇALVES et al., 2005), *L. braziliensis* (GONÇALVES et al., 2005) e *L. major* (ASHKANI-ESFAHANI et al., 2014). Em nosso estudo, a resolução da lesão dos animais tratados, não veio acompanhada de redução do tamanho dos linfonodos drenantes, sugerindo que o 17-DMAG, quando aplicado por via tópica, não alcança vias sistêmicas de distribuição. A redução da carga parasitária em órgãos internos, após a aplicação de medicamentos por via tópica no tratamento da leishmaniose cutânea, só é possível se houver uma absorção sistêmica do fármaco, atingindo concentrações leishmanicidas nos fluidos corporais (SCHMIDT-OTT et al., 1999).

A redução da lesão em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados por via tópica com membrana de celulose bacteriana impregnada com dietilditiocarbamato (DETC) também levou à redução do tamanho e da carga parasitária da lesão, mas não no linfonodo de drenagem (CELES et al, 2016). Uma vez que a persistência de parasitos, após o tratamento, tem sido descrito na literatura, tanto em modelos animais quanto em seres humanos infectados, podendo levar ao reaparecimento de lesões curadas em casos de imunossupressão (DE ROSSELL et al., 1992; AEBISCHER, 1994; BOGDAN et al., 2000). Assim, especulamos que, a não redução do tamanho do linfonodo após o tratamento tópico com o 17-DMAG, pode indicar a manutenção de células infectadas no linfonodo drenante desses animais e, eventualmente, levar à posterior recidiva de lesões cicatrizadas. Para testar esta hipótese, ensaios para avaliar uma possível recidiva em animais tratados por via tópica serão realizados, à semelhança daqueles que avaliamos a recidiva do 17-DMAG aplicado por via intraperitoneal.

A associação de medicamentos constitui uma alternativa promissora para o tratamento das lesões causadas por *Leishmania*, pois podem promover a redução das doses dos fármacos,

consequentemente reduzindo as chances de ocorrência de toxicidade, além de reduzir custos (MACHADO et al., 2021). Recentemente demonstrado por Celes et al. (2022), em um ensaio clínico piloto, que a associação do tratamento com antimoniais pentavalentes, por via parenteral, associado ao uso de biocurativos de celulose bacteriana por via tópica, sobre as lesões, causou um aumento na taxa de cura das lesões nos pacientes após 60 dias, quando comparado ao uso do antimonial pentavalente como tratamento único, e sem ocorrência de reações adversas locais. Dessa forma, em concordância com os dados da literatura, nossos achados apontam, em conjunto, que o 17-DMAG tem potencial para ser utilizado por via tópica, como tratamento associado a fármacos empregados por via sistêmica em concentrações não tóxicas para o hospedeiro.

6 CONCLUSÃO

O tratamento por via tópica com 0,10 mg/g ou 0,15 mg/g de 17-DMAG incorporado em hidrogel, aplicado diariamente e com uso de colares elizabetanos, não é tóxico aos animais e é eficaz no controle da infecção experimental de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*, especialmente quando aplicado por quatro semanas, podendo ser indicado como um potencial candidato eficaz no tratamento não invasivo da leishmaniose tegumentar, como tratamento único ou associado.

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Verificar a carga parasitária na orelha e linfonodo drenante de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados com o 17-DMAG por via tópica;
- ✓ Avaliar o efeito da combinação do 17-DMAG com o Glucantime ou Anfotericina B, contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, *in vitro*;
- ✓ Estabelecer esquemas terapêuticos eficazes no controle da infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis* utilizando o 17-DMAG aplicado por via tópica associado ao 17-DMAG, Glucantime ou Anfotericina B, aplicado por via intraperitoneal.
- ✓ Avaliar a eficácia do 17-DMAG por via tópica, associado à Miltefosina por via oral, no controle da infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*.

REFERÊNCIAS

- AEBISCHER, T. Recurrent Cutaneous Leishmaniasis: A Role for Persistent Parasites? **Parasitology Today** 10, no. 1 (1994): 25–28. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(94\)90353-0](https://doi.org/10.1016/0169-4758(94)90353-0).
- AKHOUNDI, Mohammad et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 10, no. 3 (2016): 1–40. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>.
- ANSELMO, Aaron C. et al. Non-Invasive Delivery Strategies for Biologics. **Nature Reviews Drug Discovery** 18, no. 1 (2018): 19–40. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.183>.
- ANSELMO, Aaron C., MITRAGOTRI, Samir. An Overview of Clinical and Commercial Impact of Drug Delivery Systems. **Journal of Controlled Release** 190 (2014): 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.053>.
- ASHKANI-ESFAHANI, Soheil et al. Taurine Improves the Wound Healing Process in Cutaneous Leishmaniasis in Mice Model, Based on Stereological Parameters. **Advanced Biomedical Research** 3, no. 1 (2014): 204. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.142314>.
- BASKETTER, David; JÍROVA, Dagma; KANDÁROVÁ, Helena. Review of skin irritation/corrosion hazards on the basis of human data: a regulatory perspective. **Interdisciplinary Toxicology** 5, no. 2 (2012): 98–104. <https://doi.org/10.2478/v10102-012-0017-2>.
- BERENGUER, Diana, et al. Topical amphotericin b semisolid dosage form for cutaneous leishmaniasis: physicochemical characterization, ex vivo skin permeation and biological activity. **Pharmaceutics** 12, no. 2 (2020): 1–16. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020149>.
- Berenguer, Diana et al. Development and Characterization of a Semi-Solid Dosage Form of Meglumine Antimoniate for Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Pharmaceutics** 11, no. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110613>.
- Bhowmik, Debjit et al. Recent advances in novel topical drug delivery system. **The Pharma Innovation Journal** 1, no. 9 (2012): 12–31.
- VAN BOCXLAER, Katrien et al. Drug permeation and barrier damage in leishmania-infected mouse skin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 71, no. 6 (2016): 1578–85. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw012>.
- BOGDAN, Christian et al. Fibroblasts as Host Cells in Latent Leishmaniosis. **Journal of Experimental Medicine** 191, no. 12 (2000): 2121–29. <https://doi.org/10.1084/jem.191.12.2121>.
- BRISCOE, Chad J; HAGE, David S. **Factors affecting the stability of drugs and their metabolites in biological matrices: biopharmaceutics and pharmacokinetics considerations: Advances in Pharmaceutical Product Development and Research.** 2021. p. 517–37. V.1. <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814425-1.00022-X>>

BRUSTOLIN, Aline Ávila et al. In Vitro Activity of Cinnamaldehyde on Leishmania (Leishmania) Amazonensis. **Experimental Parasitology** 237, 2022.

CARNEIRO, Guilherme et al Drug Delivery Systems for the Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Expert Opinion on Drug Delivery** 9, no. 9, p. 1083, 2012. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.701204>.

CARVALHEIRO, Manuela et al Amphotericin B-Loaded Deformable Lipid Vesicles for Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Skin Lesions. **Drug Delivery and Translational Research**, 11, no. 2, p. 717–28, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00910-z>.

Celes, Fabiana S et al. A Pilot and Open Trial to Evaluate Topical Bacterial Cellulose Bio-Curatives in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by L. Braziliensis. **Acta Tropica** 225, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106192>.

CHEN, Linlin et al Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, 9, no. 6, p. 7204–18, 2018. www.impactjournals.com/oncotarget/.

COHN; CÔTÉ. How to Deal with Severe, Self-Inflicted Skin Erosions. **Clinical Veterinary Advisor** 4 (2020): 2–5.

Egorin, Merrill J. et al. Eiseman. pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of 17-(Dimethylaminoethylamino)- 17-demethoxygeldanamycin (nsc 707545) in cd 2f 1 mice and fischer 344 rats. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** 49, no. 1 (2002): 7–19. <https://doi.org/10.1007/s00280-001-0380-8>.

ESPUELAS, Socorro; SCHWARTZ, Juana; MORENO, Esther. Nanoparticles in the Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: Gaps, Facts, and Perspectives. **Nanoscience in Dermatology**, 2016, 135–55. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00011-2>.

Ferreira, Marianna Araújo et al. Annatto Oil Loaded Nanostructured Lipid Carriers: A Potential New Treatment for Cutaneous Leishmaniasis. **Pharmaceutics** 13, no. 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111912>.

Glaze, Elizabeth R. et al. Preclinical Toxicity of a Geldanamycin Analog, 17-(Dimethylaminoethylamino)-17-Demethoxygeldanamycin (17-DMAG), in Rats and Dogs: Potential Clinical Relevance. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** 56, no. 6 (2005): 637–47. <https://doi.org/10.1007/s00280-005-1000-9>.

GONÇALVES, Gisele Santos et al. Activity of a Paromomycin Hydrophilic Formulation for Topical Treatment of Infections by Leishmania (Leishmania) Amazonensis and Leishmania (Viannia) Braziliensis. **Acta Tropica** 93, no. 2 (2005): 161–67. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.10.007>.

Hamidi, Mehrdad, Amir Azadi, and Pedram Rafiei. Hydrogel Nanoparticles in Drug Delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** 60, no. 15 (2008): 1638–49. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.002>.

Kostrzewska, Agnieszka, Adrianna Złocińska, and Witold Musiał. "Evaluation of the Influence of a Hydrogel Containing Ampd on the Stability of Tetracycline Hydrochloride. **Pharmaceutics** 13, no. 9 (2021). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091381>.

Li, Tianhong, and Roman Perez-Soler. Skin Toxicities Associated with Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors. **Targeted Oncology** 4, no. 2 (2009): 107–19. <https://doi.org/10.1007/s11523-009-0114-0>.

MACHADO, Paulo R. L. et al. A Double-blind, randomized trial to evaluate miltefosine and topical granulocyte macrophage colony-stimulating factor in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by leishmania braziliensis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases** 73, no. 7, (2021): E2465–69. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1337>.

MALIK, Nadia Shamshad; AHMAD, Mahmood; MINHAS, Muhammad Usman Cross-linked β -cyclodextrin and carboxymethyl cellulose hydrogels for controlled drug delivery of acyclovir. **PLoS ONE** 12, no. 2 (2017): 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172727>.

MENEZES, Juliana Perrone Bezerra de. et al. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed Research International** 2015 (2015): 15–18. <https://doi.org/10.1155/2015/815023>.

MORENO, Esther et al. Evaluation of skin permeation and retention of topical dapsone in murine cutaneous leishmaniasis lesions. **Pharmaceutics** 11, no. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110607>.

NASSIF, Priscila Wolf et al. Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology** 144, no. 8 (2017): 995–1004. <https://doi.org/10.1017/S0031182017000385>.

PAHO. **Guideline for the Treatment of Leishmaniasis in the Americas**, 2022. www.topalbertadoctors.org.

PALMA, Luana Carneiro et al. A docking-based structural analysis of geldanamycin-derived inhibitor binding to human or leishmania Hsp90. **Scientific Reports** 9, no. 1 (2019): 14756. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51239-0>.

PETERSEN, Antonio Luis de Oliveira Almeida et al. 17-AAG kills intracellular leishmania amazonensis while reducing inflammatory responses in infected macrophages. **PLoS ONE** 7, no. 11 (2012): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049496>.

RAUKTYS, Aubrey et al. Topical rapamycin inhibits tuberous sclerosis tumor growth in a nude mouse model. **BMC**, 8 (2008): 1. <https://doi.org/10.1186/1471-5945-8-1>.

ROSSELL, Raiza Aragort de et al. Is leishmaniasis ever cured? **Transactions of the ROYal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 86, no. 3 (1992): 251–53. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(92\)90297-P](https://doi.org/10.1016/0035-9203(92)90297-P).

SANTOS, Diego M. et al. Chemotherapeutic potential of 17-AAG against Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania (Viannia) Braziliensis. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 8, no. 10 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003275>.

Sausville, E. A. Geldanamycin analogs. **Journal of Chemotherapy** 16, no. SUPPL. 4 (2004): 68–69. <https://doi.org/10.1179/joc.2004.16.supplement-1.68>.

Schlüsselhuber, Margot et al. The equine antimicrobial peptide ecath1 is effective against the facultative intracellular pathogen *rhodococcus equi* in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 57, no. 10 (2013): 4615–21. <https://doi.org/10.1128/AAC.02044-12>.

SCHMIDT-OTT, Ruprech et al. Topical treatment with hexadecylphosphocholine (miltexi®) efficiently reduces parasite burden in experimental cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the ROYal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 93, no. 1 (1999): 85–90. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(99\)90192-X](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(99)90192-X).

SENAPATI, Sudipta et al.. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. **Signal Transduction and Targeted Therapy** 3, no. 1 (2018): 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41392-017-0004-3>.

SHARMA, Swati et al. Development of a novel chitosan based biocompatible and self-healing hydrogel for controlled release of hydrophilic drug. **International Journal of Biological Macromolecules** 116, no. 2017 (2018): 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.020>.

Shenoda, Yustina et al. The cone of shame: welfare implications of elizabethan collar use on dogs and cats as reported by their owners. **Animals** 10, no. 2 (2020). <https://doi.org/10.3390/ani10020333>.

SINGH, Akhand Pratap et al. Targeted therapy in chronic diseases using nanomaterial-based drug delivery vehicles. **Signal Transduction and Targeted Therapy** 4, no. 1 (2019): 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0068-3>.

SOSA, Lilian et al. Polyene macrolide antibiotic nanoemulsion: a proposal for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Bionatura** 7, no. 4 2022. <https://doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.62>.

STAPLETON, Sean; LEE, Fiona. Hot topics: antimicrobial resistance. **DVM360**, 52, 2021.

STENBERG, Vilde Yuli et al. Evaluation of the psma-binding ligand212pb-Ng001 in multicellular tumour spheroid and mouse models of prostate cancer. **International Journal of Molecular Sciences** 22, no. 9 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22094815>.

WELSS, Thomas, et al. In vitro skin irritation: facts and future. state of the art review of mechanisms and models. **Toxicology in Vitro** 18, no. 3, p.231–43, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2003.09.009>.

WHITESELL, Luke; LIN, Nancy U. HSP90 as a platform for the assembly of more effective cancer chemotherapy. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research** 1823, no. 3 (2012): 756–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.12.006>.

WHO. **Leishmaniasis**. 2020. https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1.

6 CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO 17-DMAG, UM INIBIDOR DA Hsp90

1 INTRODUÇÃO

Os tratamentos atualmente indicados para as leishmanioses levam em consideração a espécie causadora da doença, os sintomas clínicos apresentados pelos pacientes e o estado imunológico do paciente acometido, como presença de gravidez ou imunossupressão (WHO, 2021). As drogas de primeira escolha recomendadas para o tratamento são os antimoniais pentavalentes e, outros fármacos como pentamidina, paromomicina e anfotericina B, desoxicolato ou lipossomal, podem ser indicados em alguns casos (DE MENEZES et al., 2015b; WHO, 2021). Entretanto, todos esses medicamentos incluem algum tipo de limitação ao seu uso, que incluem a via de administração invasiva, a ocorrência de efeitos colaterais graves e/ou o custo elevado, no caso da anfotericina B lipossomal (DE MENEZES et al., 2015b; WHO, 2021). Além disso, esses tratamentos não levam à cura parasitológica, o que pode levar à falha terapêutica e recidiva da doença nos pacientes (Copeland & Aronson, 2015; WHO, 2021). Dessa forma, buscando superar essas limitações, a busca por novos alvos terapêuticos tem se mostrado necessária.

Inibidores da Hsp90 têm sido estudados com potencial antiparasitário. Estudos realizados anteriormente por nossa equipe demonstraram que os inibidores geldanamicina, 17-AAG e 17-DMAG são capazes de causar a morte de promastigotas axênicas de *L. amazonensis* em concentrações não tóxicas para as células de linhagem monocítica humana, THP-1 (Palma et al., 2019). Adicionalmente, foi mostrado por nosso grupo que o 17-AAG é capaz de causar a morte de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* em concentrações não tóxicas para os macrófagos peritoneais, além de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IFN (Petersen et al., 2012a). Complementarmente, SANTOS e colaboradores (2014) mostraram que o 17-AAG é capaz de causar a morte *in vitro* de amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e, *in vivo*, é capaz de causar a redução da lesão e da carga parasitária na orelha de camundongos BALB/c infectados por esta espécie de *Leishmania* e tratados com este fármaco. Alguns estudos mostram que a morte de *Leishmania* por inibidores da Hsp90 pode ocorrer pela formação de proteínas truncadas (Chiosis et al., 2004b; XIAO et al., 2006; Sidera and Patsavoudi, 2013) ou pela ativação anormal da via autofágica e, apesar de a avaliação dos

mecanismos de ação do inibidor 17-DMAG na morte de *L. braziliensis* não ser o foco deste trabalho, é evidente que estes inibidores são eficazes na morte destes parasitos (Petersen et al., 2021).

Em estudos pilotos realizados por nossa equipe, foi observado que a aplicação diária de 20 mg/kg do 17-DMAG em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* é capaz de controlar a infecção, levando à redução do tamanho da lesão e da carga parasitária tanto na orelha infectada quanto no linfonodo drenante destes animais, além de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF (dados não publicados) que, em conjunto, evidenciam o potencial leishmanicida e anti-inflamatório do 17-DMAG, que são vantajosos no tratamento da leishmaniose tegumentar. Entretanto, após tempos prolongados de tratamento, os animais submetidos ao tratamento com este fármaco começaram a exibir características de toxicidade como apatia, perda de peso e secreções oculares purulentas (dados não publicados).

Sistemas de entrega de fármacos baseados em nanopartículas constituem uma inovação na medicina, onde as moléculas encapsuladas (chamadas de “carga útil”) recebem proteção da estrutura da nanopartícula, possibilitando a liberação sustentada e controlada do composto ao longo de um tempo determinado, caracterizando os nanomedicamentos como sistemas de liberação controlada de fármacos (ZHANG et al., 2008; FORMIGA et al., 2009; YILDIRIMER et al., 2011; López-Serrano et al., 2014; WOLFRAM et al., 2015; Li et al., 2017). Esses sistemas de entrega baseados em nanopartículas apresentam ainda como vantagens a alta segurança, eficácia, especificidade de alvo (direcionamento de fármacos), biocompatibilidade, biodisponibilidade, biodegradabilidade e reduzida toxicidade, quando comparados aos sistemas tradicionalmente utilizados na entrega de medicamentos (ZHANG et al., 2008; FORMIGA et al., 2009; YILDIRIMER et al., 2011; Lin, 2015; UTREJA et al., 2020). Dessa forma, diante do cenário apresentado acima, propomos a utilização de nanopartículas poliméricas como sistemas de liberação controlada do fármaco, para superar a limitação da toxicidade observada na aplicação do 17-DMAG por tempos prolongados. Enquanto a administração convencional de medicamentos necessitam de diversas aplicações para que a concentração do princípio ativo seja mantida como efetiva no nível plasmático, os nanomedicamentos constituem uma alternativa na qual, com uma ou poucas aplicações, esse nível efetivo consegue ser mantido por longos períodos, sem atingir níveis sub-terapêuticos ou tóxicos para os pacientes (DE LYRA et al., 2007). Acreditamos que o encapsulamento do 17-DMAG em nanopartículas de PLGA permitirá a liberação controlada do fármaco a partir da matriz polimérica durante o tratamento *in vitro* e *in vivo* contra *L. braziliensis*, reduzindo as chances da ocorrência de efeitos colaterais no hospedeiro infectado.

2 OBJETIVOS

- ✓ Produzir nanopartículas poliméricas de PLGA contendo 17-DMAG;
- ✓ Avaliar as características físico-químicas das nanopartículas produzidas;
- ✓ Caracterizar morfologicamente as nanopartículas de PLGA contendo ou não 17-DMAG;
- ✓ Avaliar o perfil de liberação do 17-DMAG a partir das nanopartículas produzidas;
- ✓ Analisar o perfil de captação das nanopartículas por BMMØ.

3 ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO NA REVISTA *FRONTIERS IN CHEMISTRY*

Kercia P. Cruz, Beatriz F. C. Patricio, Vinícius C. Pires, Marina F. AMORIM, Alan G. S. F. Pinho, Helenita C. Quadros, Diana A. S. Dantas, Marcelo H. C. Chaves, Fabio R. Formiga, Helvécio V. A. Rocha e Patrícia S. T. Veras. **Development and Characterization of PLGA Nanoparticles Containing 17-DMAG, an Hsp90 Inhibitor**. 2021.

No presente estudo, foi mostrada a produção e otimização de protocolos de encapsulamento do inibidor da Hsp90, o 17-DMAG, que pode vir a ser um potencial quimioterápico no tratamento da LC. Inicialmente, nanopartículas de PLGA contendo 17-DMAG (nano-17-DMAG) foram produzidas por emulsão dupla, utilizando dois protocolos, o protocolo 1 e o protocolo 2, cujas principais diferenças foram o tipo de solvente orgânico utilizado (acetona ou diclorometano, respectivamente) e o método de formação da segunda emulsão (ultraturrax ou sonicação, respectivamente). Comparativamente, observamos que as nanopartículas produzidas pelo protocolo 1 apresentaram tamanhos maiores que as produzidas com o protocolo 2 ($503,15 \pm 137,67$ vs $312,63 \pm 23,62$ nm, respectivamente) e menores eficiências de encapsulamento (%EE) ($10,13 \pm 2,95\%$ vs $16,19 \pm 0,72\%$). Adicionalmente, uma amostra de cada protocolo foi selecionada para caracterizar fisicamente, por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV), as nano-17-DMAG produzidas. Nossos resultados mostraram que ambos os protocolos produziram partículas esféricas e de superfície lisa, porém, com distribuição de tamanho heterogênea para o protocolo 1 e homogênea para o protocolo 2. Por apresentar melhores características de tamanho e %EE, foram testadas adaptações ao protocolo 2, com o intuito de produzir partículas de tamanhos ainda menores e com maiores %EE. Testamos diferentes quantidades de massa e concentração dos insumos utilizados para a produção das nanopartículas (17-DMAG, PLGA, PEG e PVA) ou, ainda, dos volumes das fases aquosa ou orgânica. Essas modificações produziram partículas com tamanhos variáveis de 280,6 a 449,65 nm ($334,05 \pm 42,76$ nm) e %EE variáveis de 15,60 a 53,53% ($30,65 \pm 7,8\%$). O protocolo 2, que utilizou 2 mg de 17-DMAG, 100 mg de PLGA, 5% de PEG, 1% de PVA, 4 mL de fase orgânica e 1,5 mL de fase aquosa interna, foi a melhor configuração das modificações testadas, quando avaliados os parâmetros acima citados. Com objetivo de avaliar o perfil de liberação da droga a partir das nano-17-DMAG produzidas com a melhor configuração testada, realizamos um ensaio de liberação controlada a 37 °C. Nas primeiras 24 h de incubação, cerca de 50% da droga encapsulada foi liberada das partículas poliméricas, sendo, em seguida, liberada continuamente, em menores quantidades, até 72 h de incubação. Por fim, para avaliar se as nanopartículas produzidas com a melhor configuração seriam captadas por macrófagos de camundongos BALB/c *in vitro*, reproduzimos esse protocolo com nanopartículas contendo rodamina e sua captação foi analisada por microscopia confocal de fluorescência. Após 6 h, 24 h, 48 h ou 72 h as partículas foram internalizadas e permaneceram no interior dos macrófagos. Em conjunto, nossos resultados mostraram que o protocolo 2 na configuração acima citada foi o melhor para o encapsulamento do 17-DMAG por produzir partículas de tamanhos menores e %EE mais elevados. Para verificar o potencial quimioterápico da nano-17-DMAG sobre *Leishmania* sp., experimentos adicionais serão realizados, avaliando a toxicidade e eficácia *in vitro* da nano-17-DMAG sobre BMM Φ infectados ou não por *Leishmania* spp.



Development and Characterization of PLGA Nanoparticles Containing 17-DMAG, an Hsp90 Inhibitor

Kercia P. Cruz¹, Beatriz F. C. Patricio², Vinicius C. Pires¹, Marina F. Amorim¹, Alan G. S. F. Pinho¹, Helenita C. Quadros², Diana A. S. Dantas¹, Marcelo H. C. Chaves², Fabio R. Formiga^{4,5}, Helvécio V. A. Rocha² and Patricia S. T. Veras^{1,6*}

¹Laboratory of Parasite-Host Interaction and Epidemiology, Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, Brazil, ²Laboratory of Micro and Nanotechnology, Institute of Technology of Drugs (Farmanguinhos), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, ³Laboratory of Tissue Engineering and Immunopharmacology, Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, Brazil, ⁴Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Recife, Brazil, ⁵Graduate Program in Applied Cellular and Molecular Biology, University of Pernambuco (UPE), Recife, Brazil, ⁶National Institute of Science and Technology of Tropical Diseases (INCT-DT), National Council for Scientific Research and Development (CNPq), Salvador, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Gildardo Rivera,
Instituto Politécnico Nacional
(IPN), Mexico

Reviewed by:

Andrei I. Khlebnikov,
Tomsk Polytechnic University, Russia
Edson Roberto Silva,
University of São Paulo, Brazil

*Correspondence:

Patricia S. T. Veras
patricia.veras@fiocruz.br

Specialty section:

This article was submitted to
Medicinal and Pharmaceutical
Chemistry,
a section of the journal
Frontiers in Chemistry

Received: 21 December 2020

Accepted: 09 April 2021

Published: 13 May 2021

Citation:

Cruz KP, Patricio BFC, Pires VC,
Amorim MF, Pinho AGSF,
Quadros HC, Dantas DAS,
Chaves MHC, Formiga FR,
Rocha HVA and Veras PST (2021)
Development and Characterization of
PLGA Nanoparticles Containing
17-DMAG, an Hsp90 Inhibitor.
Front. Chem. 9:644827.
doi: 10.3389/fchem.2021.644827

Leishmaniasis is a spectrum of neglected tropical diseases and its cutaneous form (CL) is characterized by papillary or ulcerated skin lesions that negatively impact patients' quality of life. Current CL treatments suffer limitations, such as severe side effects and high cost, making the search for new therapeutic alternatives an imperative. In this context, heat shock protein 90 (Hsp90) could present a novel therapeutic target, as evidence suggests that Hsp90 inhibitors, such as 17-Dimethylaminoethylamino-17-Demethoxygeldanamycin (17-DMAG), may represent promising chemotherapeutic agents against CL. As innovative input for formulation development of 17-DMAG, nano-based drug delivery systems could provide controlled release, targeting properties, and reduced drug toxicity. In this work, a double emulsion method was used to develop poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles containing 17-DMAG. The nanoparticle was developed using two distinct protocols: Protocol 1 (P1) and Protocol 2 (P2), which differed concerning the organic solvent (acetone or dichloromethane, respectively) and procedure used to form double-emulsions (Ultra-Turrax[®] homogenization or sonication, respectively). The nanoparticles produced by P2 were comparatively smaller (305.5 vs. 489.0 nm) and more homogeneous polydispersion index (PDI) (0.129 vs. 0.33) than the ones made by P1. Afterward, the P2 was optimized and the best composition consisted of 2 mg of 17-DMAG, 100 mg of PLGA, 5% of polyethylene glycol (PEG 8000), 1.5 mL of the internal aqueous phase, 1% of polyvinyl alcohol (PVA), and 4 mL of the organic phase. Optimized P2 nanoparticles had a particle size of 297.2 nm (288.6–304.1) and encapsulation efficacy of 19.35% (15.42–42.18) by the supernatant method and 31.60% (19.9–48.79) by the filter/column method. Release kinetics performed at 37°C indicated that ~16% of the encapsulated 17-DMAG was released about to 72 h. In a separate set of experiments, a cell uptake assay employing confocal fluorescence microscopy revealed the internalization by macrophages of P2-optimized rhodamine B labeled nanoparticles at 30 min, 1, 2, 4, 6, 24, 48, and 72 h. Collectively, our results indicate

the superior performance of P2 concerning the parameters used to assess nanoparticle development. Therefore, these findings warrant further research to evaluate optimized 17-DMAG-loaded nanoparticles (NP2-17-DMAG) for toxicity and antileishmanial effects *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: leishmaniasis, Hsp90, 17-DMAG, double emulsion, PLGA, nanoparticles

INTRODUCTION

Constituting a severe public health problem throughout the world, the spectrum of leishmaniasis consists of neglected tropical diseases caused by parasite species of the genus *Leishmania*, 20 of which are capable of infecting humans (Masmoudi et al., 2013; Akhoundi et al., 2016; WHO, 2020a). Although endemic in 97 countries, the disease is mainly concentrated in Africa, Asia, and the Americas (WHO, 2020b). It is currently estimated that around 12 million people are infected worldwide, with an annual incidence of more than one million new cases per year; one billion of the world's population lives in areas at risk of infection (Akhoundi et al., 2016; WHO, 2020a).

Leishmaniasis can be divided into two primary clinical forms: cutaneous and visceral, with varying presentations depending on the species and virulence of the infecting parasite, as well as the type of host immune response (Kaye and Scott, 2011; Akhoundi et al., 2016; Oryan and Akbari, 2016; Srivastava et al., 2016; Veras and De Menezes, 2016; WHO, 2020a). Among the cutaneous presentations, mucocutaneous leishmaniasis (MCL), caused mainly by *L. aethiops* in the Old World and *L. braziliensis* in the New World, is the most debilitating form, with destructive lesions occurring on the palate, lips and nasal septum (Akhoundi et al., 2016; Burza et al., 2018; WHO, 2020a). The most common form, localized cutaneous leishmaniasis (LCL), is caused by a variety of parasite species, including *L. major*, *L. tropica*, and *L. aethiops* in the Old World, in addition to *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, and *L. mexicana* in the New World (Kaye and Scott, 2011; Masmoudi et al., 2013; Burza et al., 2018; Meira and Gedamu, 2019). Despite not being fatal, LCL can affect patients' quality of life according to the evolution and spread of skin lesions, social stigmatization, psychological effects, and absenteeism (Carvalho et al., 1994; Scorza et al., 2017; Burza et al., 2018).

Currently, chemotherapy is the recommended treatment for patients diagnosed with leishmaniasis, mainly pentavalent antimonials and Amphotericin B in a free or liposomal-encapsulated form (Croft et al., 2006; Frézard et al., 2009; Seifert, 2011; Brasil, 2015; De Menezes et al., 2015; Andrade-Neto et al., 2018). Alternatively, other drugs, such as pentamidine and paromomycin, can also be applied in leishmaniasis treatment (Santos et al., 2008; De Menezes et al., 2015). These therapies present several limitations, including high cost, invasive route of administration, prolonged cycle and systemic side effects, e.g., weakness, myalgia, rigors/chills, hemolysis and fever, as well as instability at high temperatures in some formulations (Sundar et al., 2004; Frézard et al., 2009; Chávez-Fumagalli et al., 2015; De Menezes et al., 2015). Additionally, drug accumulation in the

organs can lead to pancreatitis, nephrotoxicity, hepatotoxicity, myocarditis, and cardiotoxicity (Rath et al., 2003; Frézard et al., 2009; Seifert, 2011; Masmoudi et al., 2013; Chávez-Fumagalli et al., 2015; De Menezes et al., 2015). The only currently available non-invasive orally administered treatment for leishmaniasis, miltefosine, presents limitations including vomiting, diarrhea, kidney, and liver toxicity, as well as potential teratogenic effects and high cost in some regions (Rath et al., 2003; Seifert, 2011; Masmoudi et al., 2013; De Menezes et al., 2015; Andrade-Neto et al., 2018). This scenario highlights the need to discover new drugs that offer increased efficacy and less toxicity (De Menezes et al., 2015). So far, efforts to this end have focused on (i) increasing the safety and efficacy of treatments already in use; (ii) combined drug therapy via novel therapeutic protocols; (iii) the search for new therapeutic targets in parasites or host cells; (iv) repurposing drugs used to treat other diseases; (v) developing more effective delivery systems (Frézard et al., 2009; De Menezes et al., 2015; Andrade-Neto et al., 2018).

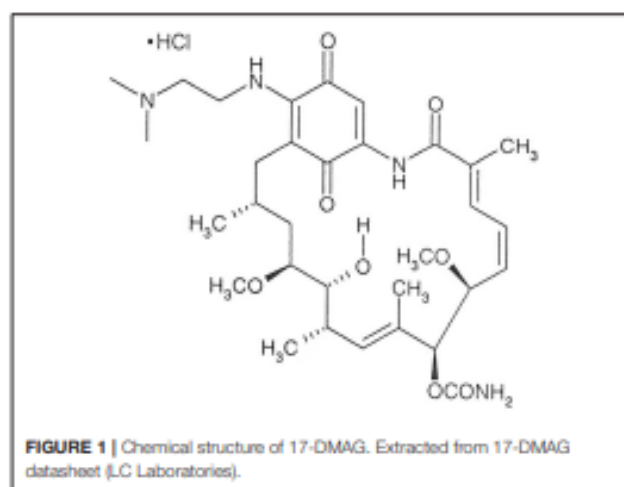
Heat Shock Protein 90 (Hsp90), a ubiquitous and highly conserved molecular chaperone, is responsible for performing the folding of other proteins, namely client proteins, subsequently preventing the post-translational formation of oligomeric complexes with incorrect, inactive and non-functional structures (Zhao and Houry, 2005; Erlejan et al., 2014). This chaperone has been described as a potential therapeutic target in treating cancer and infectious diseases caused by different parasite species, including those of the *Leishmania* genus (Solit and Chiosis, 2008; Pallavi et al., 2010; Roy et al., 2012; Whitesell and Lin, 2012; Schopf et al., 2017; Guswanto et al., 2018). Notably, in leishmaniasis, Hsp90 has been shown to aid in re-establishing the functional stability of proteins in response to environmental pressure, such as differences in pH and temperature, during parasite differentiation processes (Zilberstein and Shapira, 1994; Graefe et al., 2002; Solit and Chiosis, 2008; Pallavi et al., 2010; Roy et al., 2012; Hombach et al., 2014; Schopf et al., 2017).

Structurally, Hsp90 is comprised of three main domains: the intermediate central proteolytic domain, involved in the interface between Hsp90 and its client proteins; the C-terminal domain, which facilitates homodimerization; the N-terminal domain, responsible for interaction with and the hydrolysis of ATP (Pratt and Toft, 2003; Zhao and Houry, 2005; Brown et al., 2007). The family of benzoquinone ansamycins constitutes a class of Hsp90 inhibitors that compete with ATP for binding at the Hsp90 interaction site, thereby hindering chaperone activity (Zhao and Houry, 2005; Brown et al., 2007; Erlejan et al., 2014). Subsequently, truncated or malformed proteins become degraded by the ubiquitin-proteasome system (Chiosis et al.,

2004; Xiao et al., 2006; Sidera and Patsavoudi, 2013). In parasites of the genus *Leishmania*, this inhibition leads to parasite death, evidencing the importance of Hsp90 in the maintenance of cellular homeostasis (Wiesgigl et al., 2001; Li et al., 2009; Roy et al., 2012; Hombach et al., 2013).

Research by our group previously demonstrated that geldanamycin (GA), 17-AAG, and 17-DMAG, Hsp90 inhibitors of benzoquinone ansamycin family, were capable of eliminating promastigote forms of *L. amazonensis* at concentrations determined as non-toxic for human monocyte lineage cells (THP-1) (Palma et al., 2019). It was also demonstrated that the treatment of *L. amazonensis*-infected macrophages with 17-AAG reduced the percentage of infected macrophages and numbers of intracellular parasites in a time- and dose-dependent manner at concentrations deemed non-toxic to host cells (Petersen et al., 2012). Furthermore, 17-AAG was found to control, both *in vitro* and *in vivo*, *L. braziliensis* infection in BALB/c mouse macrophages (Santos et al., 2014). This study demonstrates that 17-AAG reduces the size of ear lesions and parasitic load at the lesion site, but not in the draining lymph nodes of infected mice, resulting in infection relapse (Santos et al., 2014). To overcome this described limitation, it will be tested a water-soluble analog of 17-AAG, 17-DMAG (Egorin et al., 2002; Sausville, 2004; Whitesell and Lin, 2012). Because it is a water-soluble molecule and has better pharmacokinetics than 17-AAG, 17-DMAG can achieve lymph nodes of treated animals, eliminating the parasites on this site. To optimize a formulation containing Hsp90 inhibitor for leishmaniasis treatment, we propose the encapsulation of 17-DMAG in a nanoparticle, which can have controlled release of the drug, prolonging its action with fewer administrations. This delivery system can also help prevent toxicity occurrences in future tests for *L. braziliensis* infection control.

Nanoparticle-based controlled release systems offer several advantages: improved safety, efficacy, target specificity (drug targeting), biocompatibility, bioavailability, biodegradability, and reduced toxicity in comparison to traditional drug delivery systems (Zhang et al., 2008; Formiga et al., 2009; Yildirim et al., 2011; Lin, 2015; Utreja et al., 2020). By directing the active principle to specific tissues and releasing it gradually over time, the dose necessary to observe treatment efficacy becomes reduced, thereby contributing to a reduction in side effects (Yildirim et al., 2011; Wolfram et al., 2015). Synthetic polymers such as poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), polylactic acid (PLA) and polycaprolactone (PCL) are commonly used in drug delivery systems because they do not offer a risk of inducing an unwanted immune response (Formiga et al., 2009; Zhang and Zhang, 2017; Utreja et al., 2020). The main application of these systems consists of cases in which the free form of a drug presents limitations, such as shortened half-life, requiring the need for multiple applications, and inadequate target specificity, which can lead to the occurrence of a range of side effects (Zhang et al., 2008; Formiga et al., 2009). Thus, the present work aimed to produce polymeric nanoparticles (NPs) containing the Hsp90 inhibitor, 17-DMAG, and perform morphological and physical-chemical characterization. The results obtained herein will enable, in the future, an evaluation of *in vitro* and



in vivo optimized 17-DMAG-loaded NPs (NP2-17-DMAG) as antileishmanial treatment.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Chemicals

The hydrochloride salt of alvespimycin, 17-DMAG (**Figure 1**), was purchased from LC Laboratories (Massachusetts, USA). Resomer® RG 503H, Poly (D, L-lactide-co-glycolide) (50:50) (PLGA), Poly (vinyl alcohol) (87–90% hydrolyzed average mol wt 30,000–70,000, PVA) and poly(ethylene glycol) (PEG, MW = 8,000) were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Alamar blue® was purchased from Invitrogen (Massachusetts, USA). Microcon-30 0.5ML microtubes were purchased from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). A C18 HPLC column and C18 Supelguard Guard Cartridge were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany).

Preparations of PLGA NPs

Two different double emulsion protocols were used to prepare PLGA NPs. In the first protocol (P1), PLGA NPs containing 17-DMAG (NP1-17-DMAG) were prepared using a modified double emulsion/solvent evaporation technique (Salvador et al., 2015). Briefly, 50 mg of PLGA was dissolved in 5 mL of acetone, and 2 mg of 17-DMAG was dissolved in 5% PEG solution (250 mg in 5 mL of distilled water). The 17-DMAG solution was then added to the pre-cooled PLGA solution and emulsified using a Q700 sonicator (QSonica, Newtown, Connecticut, USA) at 6% amplitude for 2 min. Subsequently, 10 mL of PVA 1% w/v was added to the mixture. The recipient was then covered with aluminum foil and then homogenized at 10,000 rpm for 5 min (Ultra-turrax® T-25, IKA, Germany) to form a double emulsion. Next, 10 mL of 2% isopropyl alcohol was added. Finally, the suspension was magnetically stirred for 30 min with a subsequent solvent evaporation step using a rotary evaporator (IKA) for 1 h at 56°C under 250 mBar.

In the second double emulsion protocol (P2), PLGA NPs (NP2-17-DMAG) were also produced using another double

emulsion/solvent evaporation technique (Mainardes et al., 2009). Initially, 100 mg of PLGA was dissolved in 4 mL of dichloromethane. Another solution containing 2 mg of 17-DMAG dissolved in 1.5 mL of PEG 5% w/v was then added to the pre-cooled PLGA solution to form a single emulsion using a Q700 sonicator (QSonica, Newtown, Connecticut, USA) at 40% amplitude for 1 min. To form the double emulsion, the single emulsion was incorporated in 10 mL of PVA 1% w/v, then sonicated. Finally, 30 mL of PVA 1% w/v was added to the recipient, covered with aluminum foil and magnetically stirred for 30 min. The solvent extraction step was performed using a rotary evaporator (IKA) for 1 h at 40°C under 200 mBar.

Following each nanoparticle protocol preparation, suspensions were washed in distilled water three times at $39,800 \times g$ for 15 min at 4°C (T-865, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Samples were frozen at -80°C, then lyophilized for 24 h at -48°C under 0.050 mBar (FreeZone 2.5 Liter Benchtop, Labconco, USA) and subsequently stored at 4°C. For blank nanoparticle preparation (NP1-Ø and NP2-Ø), these same protocols were followed in the absence of 17-DMAG.

To evaluate the influence of PLGA and PEG concentration on the encapsulation efficiency (%EE) of 17-DMAG and the size of the produced NPs, P2 was performed as described above using 100 or 200 mg of PLGA and 2.5% w/v or 5% w/v of PEG.

PLGA NPs Characterization Dynamic Light Scattering

DLS was used to measure the particle size, polydispersion index (PDI) and zeta potential (ZP) of the obtained NPs. After washing, NP-17-DMAG or NP-Ø produced by the P1 or P2 double-emulsion protocols were resuspended in 5 mL of distilled water and diluted 1:125 in distilled water. DLS analysis was performed in triplicate using a ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical, UK) at 25°C.

Transmission Electron Microscopy

For imaging and size confirmation, NPs were washed as described in item 2.2 and analyzed by TEM. Aliquots of NP-17-DMAG or NP-Ø produced by the P1 or P2 double-emulsion protocols were diluted 1:10 in distilled water, then 10 µL of each sample was placed on a formvar film-coated grid and stained with 2% uranyl acetate for 2 min. TEM analysis was performed using a JEM-1230 transmission electron microscope (JEOL LTD, Japan).

Scanning Electron Microscopy

SEM was used to examine the shape and surface morphology of the NP-17-DMAG or NP-Ø produced by the P1 or P2 double-emulsion protocols. For SEM analysis, lyophilized NPs (1 mg) were placed on an adhesive stub and coated with gold-palladium under vacuum using an ion coater. All samples were analyzed and photographed at 15 kV using a JSM-6390LV microscope (JEOL LTD, Japan).

HPLC for 17-DMAG Quantification

To quantify 17-DMAG, HPLC was performed using a C18 HPLC column and C18 Supelguard Guard Cartridge following manufacturer protocols. First, the mobile phase was prepared

using HPLC grade acetonitrile (27%), HPLC grade methanol (27%), ultrapure water (46%), and trifluoroacetic acid (0.05%). In parallel, 17-DMAG was diluted in distilled water at an initial concentration of 500 µg/mL, then diluted from 50 to 1 µg/mL in the mobile phase to construct concentration curves in triplicate. Each sample was analyzed at a 2D wavelength of 254 nm for 8 min at 25°C. The mobile phase flow rate was 1 mL/min, with 10 µL of each sample injected. The observed retention time for 17-DMAG under these conditions was ~3.8 min. Nanoparticle concentrations of 17-DMAG were calculated using a free compound curve (Empower software, version 3).

Encapsulation Efficiency (%EE) of 17-DMAG in NPs

Encapsulation efficiency determination was performed using two indirect methods: filter/column or supernatant. After the solvent was evaporated using the filter/column method, 500 µL of nanoparticle suspension was centrifuged in a 1.5 mL microtube with a Microcon 30 filter under $14,000 \times g$ for 1 h at 4°C. As the free drug fraction (F) in each sample flowed through the filter, NPs were retained. In parallel, absolute ethanol was added to another 500 µL aliquot of total nanoparticle suspension at a proportion of 1:1 to determine the total amount of 17-DMAG. After centrifugation at $6,200 \times g$ for 15 min at 4°C, the supernatant was collected and the total quantity of 17-DMAG (T) was measured. %EE was evaluated by HPLC following the formula:

$$\%EE = \frac{(T - F)}{T} \times 100,$$

where T corresponds to the total mass of the drug in the sample, whether encapsulated or not, and F corresponds to the non-encapsulated fraction (free fraction).

For the supernatant method, the supernatants obtained from three washes of the produced NPs were collected and then diluted at 1:5 in the mobile phase. HPLC then evaluated the %EE according to the formula:

$$\%EE = \frac{S}{T} \times 100,$$

where S corresponds to the total mass of 17-DMAG in the supernatants and T is the total mass of the drug added for encapsulation.

Release of 17-DMAG From NP2-17-DMAG *in vitro*

The release of 17-DMAG from NP2-17-DMAG was assessed *in vitro* using a modified method to determine the release kinetic profile (Quadros et al., 2020). Briefly, 2 mg of NP2-17-DMAG were placed into 1.5 mL polypropylene microcentrifuge tubes and resuspended in 1 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco), supplemented with 20 mM of HEPES (Sigma), 42.14 mM of sodium bicarbonate (Sigma), 10% of inactivated fetal bovine serum (Gibco), 2 mM of glutamine (Sigma), and 20 µg/mL of ciprofloxacin (Isofarma, Precabura, CE, BR) (complete DMEM medium). Next, the sealed tubes were

placed in a rotating shaker and maintained at 37°C for 72 h. At each specific time point (1, 3, 6, 12, 24, 48, and 72 h), the sample tubes were removed from the incubator and centrifuged at 21,000 × g for 15 min at 4°C. The supernatant was then collected, frozen and immediately replaced with an equal volume of fresh release medium. To determine the 17-DMAG concentration, collected supernatants were diluted in the mobile phase and quantified using HPLC Shimadzu LC20-A (São Paulo, Brazil). All assays were performed in triplicate.

Animal Manipulation and Ethics Statement

BALB/c mice, male or female, aged 6–12 weeks, were provided by the Gonçalo Moniz Institute (IGM/FIOCRUZ) Animal Care Facility. The animals were maintained under pathogen-free conditions, with food and water *ad libitum*. All procedures involving animals were conducted under the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. The Institutional Review Board approved this study's experimental design (CEUA protocol no. 007/2020) of the Gonçalo Moniz Institute, Bahia-Brazil (IGM-FIOCRUZ/BA).

Obtainment of Bone Marrow-Derived Macrophages From BALB/c Mice

BALB/c mice were euthanized using thiopental intraperitoneal injection (50 mg/kg). Mouse femurs and tibias were aseptically removed and kept in cold 0.9% NaCl solution containing 0.01 mg/mL of ciprofloxacin. In a sterile environment, bone extremities were removed and marrow cells were extracted by washing the bone cavity with Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (GIBCO) supplemented with 20 mM of HEPES (SIGMA), 23 mM of sodium bicarbonate (SIGMA), 10% of inactivated fetal bovine serum (Gibco), 2 mM of Glutamine (Sigma) and 20 µg/mL of ciprofloxacin (Isofarma, Precabura, CE, BR) (complete RPMI medium). Extracted marrow cells were centrifuged at 300 × g at 4°C for 10 min, then resuspended and cultivated in Petri dishes (three plates per animal) containing 10 mL of complete RPMI medium with 30% supernatant from L929 cell culture containing granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). The dishes were cultivated at 37°C under 5% CO₂ and 95% humidity for 24 h, after which the supernatant was transferred to new plates. After 72 h, an additional 5 mL of complete RPMI medium containing 30% L929 supernatant was added to each culture to re-stimulate cells for differentiation.

On the 7th day, BMDM were recovered from bacterial Petri dishes using 5 mL of 1 mM EDTA solution (pH 8.0) for 5 min at 37°C. Cells were centrifuged at 300 × g for 10 min at 4°C, then resuspended in 1 mL of complete DMEM medium and counted in a Neubauer chamber.

Uptake of Fluorescent NPs by BMDM *in vitro*

NPs containing rhodamine B (Sigma) were produced using the P2 protocol (item 2.2). BMDM were obtained as described above and plated at 10⁵ cells per well in 1 mL of complete DMEM medium on 24-well plates containing glass coverslips. For the *in vitro* uptake assay, rhodamine B-containing NPs were lyophilized and then incubated with BMDM for 30 min,

TABLE 1 | Particle size (Size), polydispersion index (Pdl), zeta potential (ZP) and encapsulation efficiency (%EE) by supernatant of filter/column methods of NPs produced by P1 or P2 double emulsion protocols.

Protocol	Size (nm)	Pdl	ZP (mV)	%EE (supernatant)	%EE (filter /column)
P1	489	0.33	-34.4	14.9%	14.02%
P2	305.5	0.129	-28.7	15.04%	17%

1, 2, 4, 6, 24, 48, and 72 h. Wells were washed at each time point, and cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min at room temperature. Finally, coverslips were mounted on slides using ProLong Gold antifade with DAPI[®] (Invitrogen, Darmstadt, Germany). Images were obtained by confocal fluorescence microscopy using a Leica SP8 device (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

Statistical Analysis

Graphs were constructed and statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software Inc). The Kolmogorov-Smirnov test was employed to verify normality. For data with Gaussian distribution, Student's *t*-test or one-way ANOVA were used to compare between two groups or among three or more groups, respectively, followed by Tukey's post-test. For non-gaussian distributions, the Mann-Whitney U test was applied for comparisons between two groups, while Kruskal-Wallis was used to compare three or more groups. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

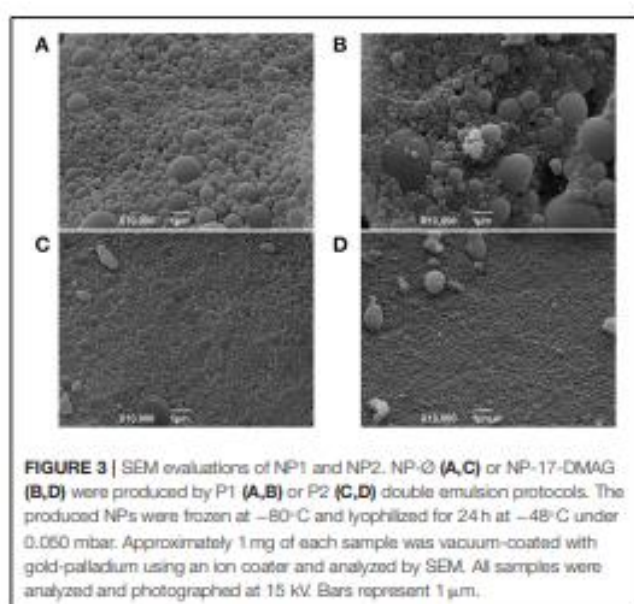
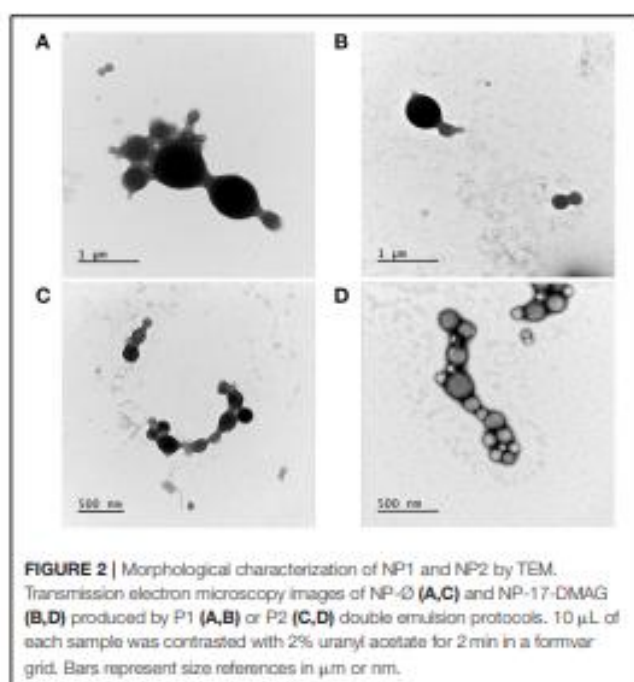
DLS Characterization and %EE of NPs Produced by P1 or P2 Double Emulsion Protocols

The NP1-17-DMAG had a larger average size, size variation (Pdl), and ZP than the NP2-17-DMAG (Table 1). No differences were detected in %EE values regardless of the quantitation method (supernatant or filter/column) used to determine the amount of 17-DMAG encapsulated in NP1-17-DMAG or NP2-17-DMAG (Table 1).

Morphological Characterization of NP1 and NP2

Consistent with the obtained Pdl values, electron microscopy analysis revealed a more significant size variation in NP1 (Figures 2A,B) compared to NP2 (Figures 2C,D). Both protocols produced spherical, regular-shaped NPs (Figure 2). No morphological differences were observed between NP-Ø and NP-17-DMAG.

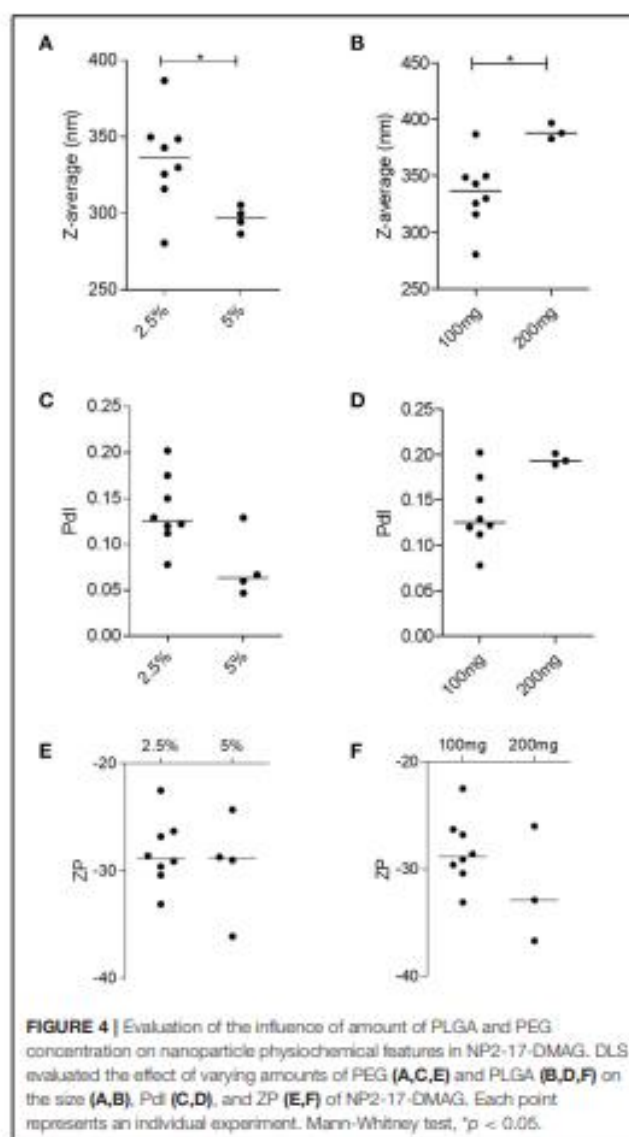
SEM morphological analysis confirmed the spherical shape and smooth surface of the NPs produced by both double emulsion protocols (Figure 3). Consistent with DLS and TEM results, SEM analysis also revealed that NP1-Ø and NP1-17-DMAG exhibited more considerable size variation (Figures 3A,B) compared to NP2-Ø and NP2-17-DMAG (Figures 3C,D). Again, no morphological differences were



observed between NP-0 (Figures 3A,C) and NP-17-DMAG (Figures 3B,D) regardless of the protocol used.

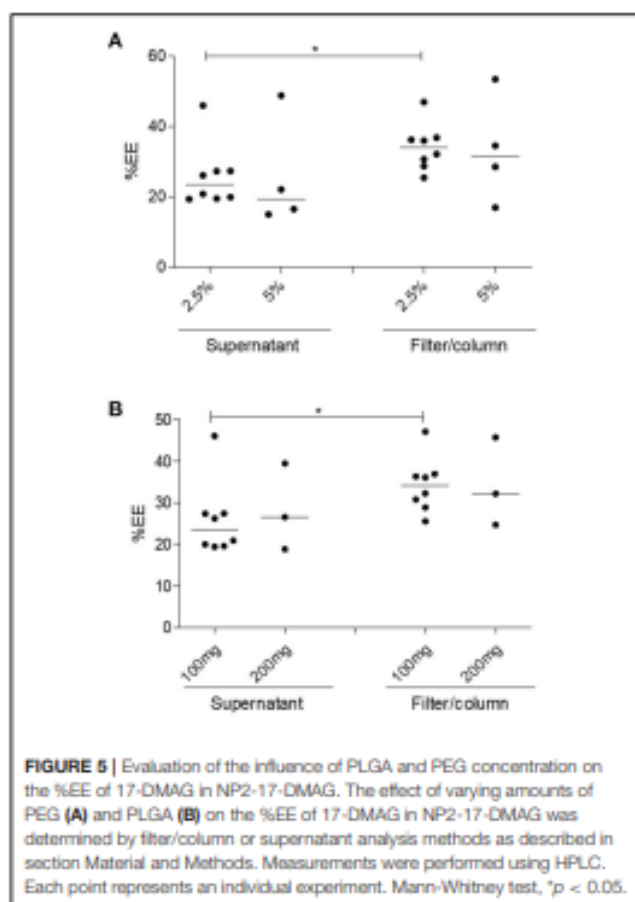
P2 Optimization Protocol

As NP2-17-DMAG exhibited superior physical-chemical and morphological characteristics compared to NP1-17-DMAG, we employed P2 to optimize the 17-DMAG encapsulation process with some variations. NPs produced using 5% PEG presented a smaller median size of 297.2 nm (Q1: 288.6; Q2:304.1) compared to those made using 2.5% PEG (median size: 336.5 nm; Q1: 318.4;



Q2: 349.6) (Figure 4A). Similarly, NPs produced containing 100 mg of PLGA presented a smaller median size of 336.5 nm (Q1: 318.4; Q2: 349.6) in comparison to those containing 200 mg of PLGA (median size: 387.8 nm; Q1: 382.8; Q2: 396.7) (Figure 4B). No differences were detected concerning PDI and ZP values among NPs prepared using different PEG concentrations (Figures 4C,E), nor different PLGA masses (Figures 4D,F).

Similar %EE values were found for NP2-17-DMAG regardless of the amount of PEG used (2.5 or 5%) (Figure 5A). Median %EE values for 2.5 and 5% of PEG were 23.51% (Q1: 19.66; Q2: 27.38) and 19.35% (Q1: 15.42; Q2: 42.18), respectively, using the supernatant analysis method, vs. 34.12% (Q1: 29.31; Q2: 36.73) and 31.60% (Q1: 19.90; Q2: 48.79) using the filter/column method (Figure 5A). Furthermore, similar %EE results were seen in NPs produced with different amounts of PLGA (Figure 5B) using the supernatant quantitative analysis



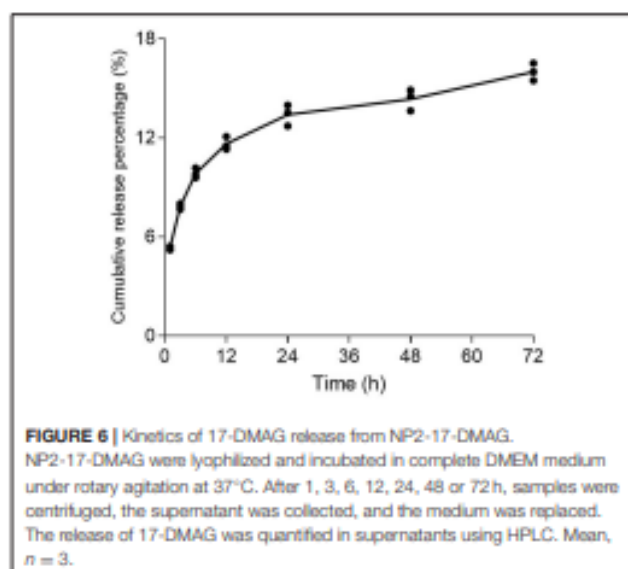
method, with respective median values of 23.51% (Q1: 19.66; Q2: 27.38) and 26.48% (Q1: 18.78; Q2: 39.39) for 100 and 200 mg of PLGA, respectively. The filter/column method yielded median %EE values of 34.12% (Q1: 29.31; Q2: 36.73) for 100 mg and 32.12% (Q1: 24.66; Q2: 44.63) for 200 mg of this polymer. It is worth noting that, in comparison to the supernatant analysis method, higher %EE results were obtained using the quantitative filter/column method regardless of NP2 protocol modifications (Figure 5).

In vitro Release of 17-DMAG From NP2-17-DMAG

At 1, 3, 6, 12, 24, 48, and 72 h of incubation, 5.36, 7.86, 9.85, 11.64, 13.41, 14.36, and 16% of 17-DMAG were cumulatively released from NP2-17-DMAG (Figure 6) *in vitro*, i.e., the amount of 17-DMAG was observed to continuously increase in complete DMEM medium for 72 h (Figure 6).

Uptake of Fluorescent NPs by BMDM *in vitro*

The rhodamine-encapsulated NPs produced by P2 (NP2-rhodamine) presented similar size, shape, and appearance (smooth surface) as the morphological characteristics of NPs produced with or without 17-DMAG (data not shown). The



uptake of NP2-rhodamine by BMDM was observed at an early incubation time of 30 min, 1, 2, 4, and 6 h (Figures 7A–E, respectively). After 24, 48 or 72 h (Figures 7F–H, respectively), greater numbers of NPs were observed in the cytoplasm of BMDM, indicating continued uptake by these cells.

DISCUSSION

The present work encapsulated 17-DMAG in PLGA NPs and investigated the resulting physical-chemical, morphological, and biological parameters. To standardize NP production, two double emulsion-solvent evaporation protocols (P1 and P2) were used (Astete and Sabliov, 2006; Mainardes et al., 2009). Analyses by DLS, TEM and SEM showed that NP1 presented larger sizes and higher PDI than NP2, which agrees with a previous report (Astete and Sabliov, 2006). We found that modifications in the PLGA-NP production protocol, such as the nature of the organic solvent used or the emulsion method, altered the characteristics of the produced NP. The larger sizes presented by NP1 may be due to laminar flow under stirring, such as that produced by the Ultra-Turrax® dispersing device. Accordingly, monodispersed drops may form in the emulsion, increasing the size of the produced NP, which is not observed under sonication (Astete and Sabliov, 2006). Concerning ZP, a measurement of the electrical behavior of NPs, both protocols produced NPs with values around -30 mV, indicating stability with minimal aggregate formation (Formiga et al., 2009). Furthermore, the observed similarity between %EE values in each protocol can be justified by using the same polymer and surfactant (PEG), as these parameters significantly influence the entrapment of hydrophilic drugs (Astete and Sabliov, 2006).

The morphological characterization of NP1 and NP2 by TEM and SEM confirmed differences in size and PDI between the two protocols, revealing a similarly regular, spherical shape and smooth surface appearance. These aspects are essential as

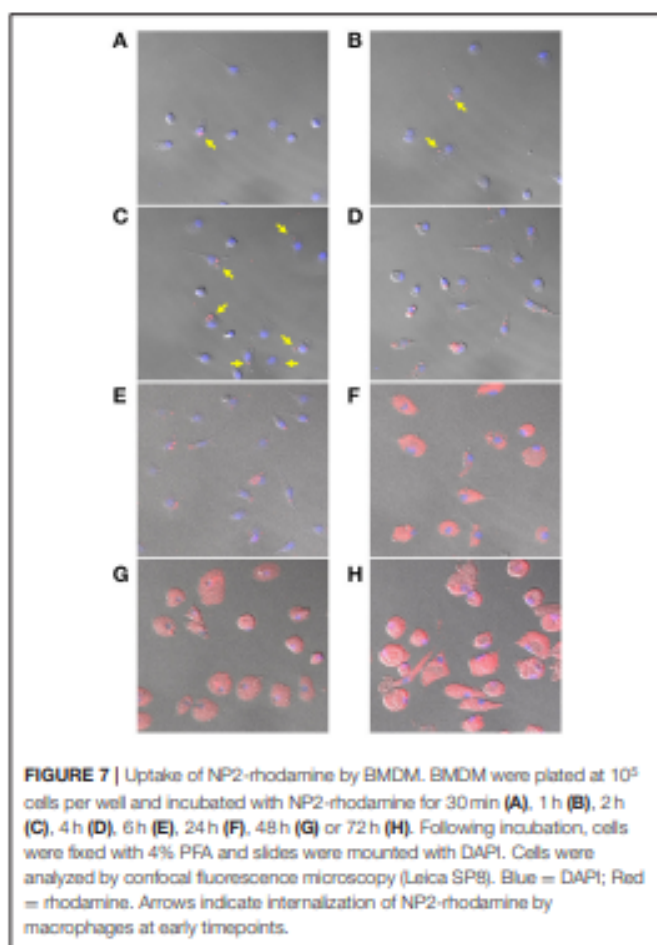


FIGURE 7 | Uptake of NP2-rhodamine by BMDM. BMDM were plated at 10^5 cells per well and incubated with NP2-rhodamine for 30 min (A), 1 h (B), 2 h (C), 4 h (D), 6 h (E), 24 h (F), 48 h (G) or 72 h (H). Following incubation, cells were fixed with 4% PFA and slides were mounted with DAPI. Cells were analyzed by confocal fluorescence microscopy (Leica SP8). Blue = DAPI; Red = rhodamine. Arrows indicate internalization of NP2-rhodamine by macrophages at early timepoints.

the morphological characteristics of NPs can predict possible interactions with living cells and uptake, intracellular localization and toxicity (Shang et al., 2014). Our results agree with previous studies (Cohen-Sela et al., 2009; McCall and Sirianni, 2013; Garbuzenko et al., 2014), demonstrating that PLGA particles produced by double emulsion presented spherical and regular shapes with smooth surfaces, regardless of modifications performed in the protocol. Following DLS, TEM and SEM characterization, P2 was selected as the better protocol for NP-17-DMAG production.

We then evaluated the effects of modifications to P2: NP2-17-DMAG produced with 100 mg of PLGA presented smaller sizes than 200 mg. This result stands in accordance with other authors who observed that increasing concentrations of PLGA generated larger particles (Astete and Sabliov, 2006; Rizkalla et al., 2006; Hernández-Giottonini et al., 2020). This has been observed to occur due to increased viscosity in the primary emulsion (w/o), which results in a less-efficient particle size reduction during the double emulsification process (w/o/w) (Iqbal et al., 2015). Similarly, using 5% PEG compared to 2.5% resulted in a smaller NP2-17-DMAG size. The decreased size was also observed at higher PEG concentrations in other studies (Zambaux et al., 1998; Rizkalla et al., 2006; Iqbal et al., 2015; Urbaniak and Musiał, 2019; Hernández-Giottonini et al., 2020).

Higher surfactant concentrations reduce surface tension and promote particle division during the homogenization process, thus decreasing the size of the particles formed (Keum et al., 2011; Fonte et al., 2012). This phenomenon is maintained until a saturation point is reached (Keum et al., 2011; Fonte et al., 2012; Iqbal et al., 2015; Urbaniak and Musiał, 2019).

Encapsulation efficiency (%EE) was measured indirectly in this study. Two methods, filter/column or supernatant, were employed to separate loaded NPs and the non-encapsulated drug. We identified higher %EE values using filter/column than the supernatant, which may be attributable to superior free drug separation by this first method. This finding is consistent with studies on nanoparticle purification efficiency (Akbulut et al., 2012; Robertson et al., 2016), demonstrating that nanoparticle separation by supernatant depends on nanoparticle size and shape, the molecular weight of the polymer, dispersion medium density, speed, and centrifugation time. The filter/column method has commonly been considered a more robust, more straightforward and efficient purification process (Robertson et al., 2016; Shah et al., 2020).

After characterizing NP2-17-DMAG, we evaluated the kinetics of drug release. We found that NP2-17-DMAG exhibited two release phases: a preliminary rapid release of 17-DMAG lasting up to 24 h, followed by a slow and sustained release from 24 to 72 h. This data is similar to results obtained by Rietscher et al. (2016) and Rafiei and Azita (2017), who analyzed the release of different compounds in PLGA or PLGA-PEG NPs. PLGA NPs containing paromomycin also presented a similar release profile (Afzal et al., 2019), which was expected for polymeric NPs encapsulating hydrophilic molecules. At the initial timepoints evaluated, the drug is rapidly released due to adsorbed molecules on the surface of NPs (Hirenkumar and Steven, 2012; Kapoor et al., 2015; Rietscher et al., 2016; Mir et al., 2017; Rafiei and Azita, 2017). In contrast, at subsequent time points, a sustained and slower release occurs due to gradual degradation of the polymeric matrix and slowly release of the drug contained there (Hirenkumar and Steven, 2012; Kapoor et al., 2015; Rietscher et al., 2016; Mir et al., 2017; Rafiei and Azita, 2017).

Nanoparticle uptake was evaluated through the incubation of BMDM with NP2-rhodamine. Fluorescence microscopy analysis revealed the internalization of NPs by macrophages beginning at early times of contact with NP2-rhodamine. At later timepoints, these particles continued to be internalized and accumulation was observed in these cells' cytoplasm. These results are in agreement with other studies of professional phagocytes, including RAW 264 and J774 macrophage cell-lines and primary resident and inflammatory macrophages, which have been shown to internalize NPs at early timepoints, such as at 30 min of incubation (Cohen-Sela et al., 2009; Nicolette et al., 2011; Petersen et al., 2018; Couto et al., 2020; Van Hees et al., 2020).

The present study revealed that PLGA NPs containing 17-DMAG prepared using a double emulsion protocol presents physical-chemical, morphological, and biological characteristics conducive to CLs treatment. Additional studies will be carried out to investigate biological and immunological effects of NP2-17-DMAG in *L. braziliensis* infection control both *in vitro* and *in vivo* in a future manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by BALB/c mice, male or female, aged 6-12 weeks, were provided by the Gonçalo Moniz Institute (IGM/FIOCRUZ) Animal Care Facility. The animals were maintained under pathogen-free conditions, with food and water *ad libitum*. All procedures involving animals were conducted under the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. The Institutional Review Board approved this study's experimental design (CEUA protocol no. 007/2020) of the Gonçalo Moniz Institute, Fiocruz, Salvador, Brazil.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KC, BP, VP, FF, HR, and PV conceptualized and designed the experiments and analyzed and validated the data analysis. KC, BP, VP, MA, AP, DD, and MC performed the experiments. KC, VP, MA, AP, HQ, and PV wrote the paper. KC, BP, HR, FF, and PV reviewed and edited this paper. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

REFERENCES

Afzal, I., Sarwar, H. S., Sohail, M. F., Varikuti, S., Jahan, S., Akhtar, S., et al. (2019). Mannosylated thiolated paromomycin-loaded PLGA nanoparticles for the oral therapy of visceral leishmaniasis. *Nanomedicine* 14, 387–406. doi: 10.2217/nmm-2018-0038

Akbulut, O., Mace, C. R., Martinez, R. V., Kumar, A. A., Nie, Z., Patton, M. R., et al. (2012). Separation of nanoparticles in aqueous multiphase systems through centrifugation. *Nano Lett.* 12, 4060–4064. doi: 10.1021/nl301452x

Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votyčka, J., Marty, P., Delaunay, P., et al. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of leishmania parasites and sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004349. doi: 10.1371/journal.pntd.0004349

Andrade-Neto, V. V., Cunha-Junior, E. F., Dos Santos Fatoes, V., Martins, T. P., Silva, R. L., Leon, L. L., et al. (2018). Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. *Front. Biosci. Landmark* 23, 967–996. doi: 10.2741/4629

Astete, C. E., and Sabliov, C. M. (2006). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 17, 247–289. doi: 10.1163/156856206775997322

Brasil (2015). *Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV, 1st Edn.* Brasília: Ministério da Saúde.

Brown, M. A., Zhu, L., Schmidt, C., and Tucker, P. W. (2007). Hsp90-From signal transduction to cell transformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 241–246. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.08.054

Burza, S., Croft, S. L., and Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet* 392, 951–970. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2

Carvalho, E. M., Barral, A., Costa, J. M. L., Bittencourt, A., and Mazedon, P. (1994). Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 56, 315–325. doi: 10.1016/0001-706X(94)90103-1

Chávez-Fumagalli, M. A., Ribeiro, T. G., Castilho, R. O., Fernandes, S. O. A., Cardoso, V. N., Coelho, C. S. P., et al. (2015). New delivery systems for

FUNDING

This work was supported by grants from the Bahia State Research Support Foundation (PV-Universal 422867/2016-0 and SUS0019/2014), FIOCRUZ (INOVA-46700287000), and Gonçalo Moniz Institute (PV-PROEP 400898/2013-6). PV holds a grant from CNPq (305235/2019-2). The fellowship received by KC was financed by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel-Brazil (CAPES)-Finance Code 001. This study was partially supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) - Finance Code 001. The funders had no role in study design, data collection or analysis, the decision to publish, or the manuscript's preparation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank LAIPHE (FIOCRUZ-BA), LMN (Farmanguinhos-RJ), Electronic Microscopy Service (FIOCRUZ-BA), and Laboratory of Applied Chemistry Research (LIPAQ, SENAI CIMATEC-BA), for the support in the experiment's performance. The authors also would like to thank Carine S. A. Silva, Nathan A. A. Guiraud, and Gabriella B. Pita, for the realization of the initial experiments with polymeric nanoparticles, and Andris K. Walter, for English language revision and manuscript copyediting assistance.

amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48, 235–242. doi: 10.1590/S0037-8682-0138-2015

Chiosis, G., Vilenchik, M., Kim, J., and Solit, D. (2004). Hsp90: the vulnerable chaperone. *Drug Discov. Today* 9, 881–888. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03245-3

Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H. D., and Golomb, G. (2009). A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *J. Control. Release* 133, 90–95. doi: 10.1016/j.jconrel.2008.09.073

Couto, P. V., Magalhães, C. P., Ferrante, M., Rebouças, J., de, S., Nguema, P., et al. (2020). Solid lipid nanoparticles as a novel formulation approach for tanespimycin (17-AAG) against leishmania infections: Preparation, characterization and macrophage uptake. *Acta Trop.* 211:105595. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105595

Croft, S. L., Seifert, K., and Yardley, V. (2006). Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123, 399–410.

De Menezes, J. P. B., Guedes, C. E. S., Petersen, A. L. O. A., Fraga, D. B. M., and Veras, P. S. T. (2015). Advances in development of new treatment for leishmaniasis. *Biomol. Res. Int.* 2015, 15–18. doi: 10.1155/2015/815023

Egorin, M. J., Lagattuta, T. F., Hamburger, D. R., Covey, J. M., White, K. D., Musser, S. M., et al. (2002). Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 707545) in CD 2f1 mice and fischer 344 rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 49, 7–19. doi: 10.1007/s00280-001-0380-8

Erlejman, A. G., Lagadari, M., Toneatto, J., Piwien-Pilipuk, G., and Galigniana, M. D. (2014). Regulatory role of the 90-kDa-heat-shock protein (Hsp90) and associated factors on gene expression. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1839, 71–87. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.12.006

Fonte, P., Soares, S., Costa, A., Andrade, J. C., Seabra, V., Reis, S., et al. (2012). Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying. *Biomater.* 2, 329–339. doi: 10.4161/biom.23246

- Formiga, F. R., Ansorena, E., De Mendonza, A. E., Imbuluzqueta, E., González, D., and Prieto, M. J. B. (2009). *Nanosistemas a base de poliésteres. Nanotecnología Farm. Real y posibilidades Farmacoter.* Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, 41–101.
- Frézard, F., Demicheli, C., and Ribeiro, R. R. (2009). Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules* 14, 2317–2336. doi: 10.3390/molecules14072317
- Garbuzenko, O. B., Winkler, J., Tomassone, M. S., and Minko, T. (2014). Biodegradable Janus nanoparticles for local pulmonary delivery of hydrophilic and hydrophobic molecules to the lungs. *Langmuir* 30, 12941–12949. doi: 10.1021/la502144z
- Graefe, S. E. B., Wiesgigl, M., Gaworski, I., Macdonald, A., and Clos, J. (2002). Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. *Eukaryot. Cell* 1, 936–943. doi: 10.1128/EC.1.6.936-943.2002
- Guswanto, A., Nugraha, A. B., Tuvshintulga, B., Tayebwa, D. S., Rizk, M. A., Batiha, G. E. S., et al. (2018). 17-DMAG inhibits the multiplication of several *Babesia* species and *Theileria equi* on *in vitro* cultures, and *Babesia microti* in mice. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 8, 104–111. doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.02.005
- Hernández-Giottonini, K. Y., Rodríguez-Córdova, R. J., Gutiérrez-Valenzuela, C. A., Peñafuri-Miranda, O., Zavala-Rivera, P., Guerrero-Germán, P., et al. (2020). PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: effects of formulation parameters. *RSC Adv.* 10, 4218–4231. doi: 10.1039/C9RA10857B
- Hirenkumar, M., and Steven, S. (2012). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel)* 3, 1377–1397. doi: 10.3390/polym3031377
- Hombach, A., Ommen, G., Chrobak, M., and Clos, J. (2013). The Hsp90-Sit1 interaction is critical for *Leishmania donovani* proliferation in both life cycle stages. *Cell. Microbiol.* 15, 585–600. doi: 10.1111/cmi.12057
- Hombach, A., Ommen, G., MacDonald, A., and Clos, J. (2014). A small heat shock protein is essential for thermotolerance and intracellular survival of *Leishmania donovani*. *J. Cell Sci.* 127, 4762–4773. doi: 10.1242/jcs.157297
- Iqbal, M., Valour, J. P., Fessi, H., and Elaissari, A. (2015). Preparation of biodegradable PCL particles via double emulsion evaporation method using ultrasound technique. *Colloid Polym. Sci.* 293, 861–873. doi: 10.1007/s00396-014-3464-9
- Kapoor, D. N., Bhatia, A., Kaur, R., Sharma, R., Kaur, G., and Dhawan, S. (2015). PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Ther. Deliv.* 6, 41–58. doi: 10.4155/tde.14.91
- Kaye, P., and Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 604–615. doi: 10.1038/nrmicro2608
- Keum, C. G., Noh, Y. W., Baek, J. S., Lim, J. H., Hwang, C. J., Na, Y. G., et al. (2011). Practical preparation procedures for docetaxel-loaded nanoparticles using poly(lactic acid-co-glycolic acid). *Int. J. Nanomedicine* 6, 2225–2234. doi: 10.2147/ijn.s24547
- Li, Q., Zhou, Y., Yao, C., Ma, X., Wang, L., Xu, W., et al. (2009). Apoptosis caused by Hsp90 inhibitor geldanamycin in *Leishmania donovani* during promastigote-to-amastigote transformation stage. *Parasitol. Res.* 105, 1539–1548. doi: 10.1007/s00436-009-1582-y
- Lin, W. (2015). Introduction: nanoparticles in medicine. *Chem. Rev.* 115, 10407–10409. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00534
- Malnarides, R. M., Gremião, M. P. D., Brunetti, I. L., Fonseca, L. M., and Khalil, N. M. (2009). Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. *Pharm. Nanotechnol.* 98, 257–267. doi: 10.1002/jps.21406
- Masmoudi, A., Hariz, W., Marrekchi, S., Amouri, M., and Turki, H. (2013). Old world cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. *J. Dermatol. Case Rep.* 7, 31–41. doi: 10.3315/jdcr.2013.1135
- McCall, R. L., and Sirlanni, R. W. (2013). PLGA nanoparticles formed by single- or double-emulsion with vitamin E-TPGS. *J. Vis. Exp.* e51015. doi: 10.3791/51015
- Meira, C. S., and Gedamu, L. (2019). Protective or detrimental? understanding the role of host immunity in leishmaniasis. *Microorganisms* 7:695. doi: 10.3390/microorganisms7120695
- Mir, M., Ahmed, N., and Rehman, A., ur (2017). Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 159, 217–231. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.038
- Nicolette, R., Santos, D. F. D., and Faccioli, L. H. (2011). The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct *in vitro* inflammatory response. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1557–1563. doi: 10.1016/j.intimp.2011.05.014
- Oryan, A., and Akbari, M. (2016). Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 9, 925–932. doi: 10.1016/j.apjtm.2016.06.021
- Pallavi, R., Roy, N., Nageshan, R. K., Talukdar, P., Pavithra, S. R., Reddy, R., et al. (2010). Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: biochemical characterization of HSP90 from *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma evansi* and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. *J. Biol. Chem.* 285, 37964–37975. doi: 10.1074/jbc.M110.155317
- Palma, L. C., Ferreira, L. F. G. R., Petersen, A. L., de, O. A., Dias, B. R. S., Menezes, J. P. B. de, Moreira, D. R., et al. (2019). A docking-based structural analysis of geldanamycin-derived inhibitor binding to human or *Leishmania* Hsp90. *Sci. Rep.* 9:14756. doi: 10.1038/s41598-019-51239-0
- Petersen, A. L., de, O. A., Campos, T. A., Santos Dantas, D. A. dos, Rebouças, J., de, S., da Silva, J. C., et al. (2018). 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.* 8, 1–14. doi: 10.3389/fcimb.2018.00303
- Petersen, A. L., de, O. A., Guedes, C. E. S., Versoza, C. L., Lima, J. G. B., de Freitas, L. A. R., et al. (2012). 17-AAG Kills intracellular *Leishmania amazonensis* while reducing inflammatory responses in infected macrophages. *PLoS ONE* 7:e49496. doi: 10.1371/journal.pone.0049496
- Pratt, W. B., and Toft, D. O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med.* 228, 111–133. doi: 10.1177/153537020322800201
- Quadros, H. C., Santos, L., de, M. F., Meira, C. S., Khouri, M. I., Mattei, B., et al. (2020). Development and *in vitro* characterization of polymeric nanoparticles containing recombinant adrenomedullin-2 intended for therapeutic angiogenesis. *Int. J. Pharm.* 576:118997. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118997
- Rafiei, P., and Azita, H. (2017). Docetaxel-loaded Plga and Plga-Peg nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile. *Int. J. Nanomed.* 12, 935–947. doi: 10.2147/IJN.S121881
- Rath, S., Augusto Trivelin, L., Imbrunio, T. R., Tomazela, D. M., De Jesús, M. N., Calvo Marzal, P., et al. (2003). Antimonials empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. *Quim. Nova* 26, 550–555. doi: 10.1590/S0100-40422003000400018
- Rietscher, R., Czaplewska, J. A., Majdanski, T. C., Gottschaldt, M., Schubert, U. S., Schneider, M., et al. (2016). Impact of PEG and PEG-b-PAGE modified PLGA on nanoparticle formation, protein loading and release. *Int. J. Pharm.* 500, 187–195. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.01.021
- Rizkalla, N., Range, C., Lacasse, F. X., and Hädgen, P. (2006). Effect of various formulation parameters on the properties of polymeric nanoparticles prepared by multiple emulsion method. *J. Microencapsul.* 23, 39–57. doi: 10.1080/02652040500286185
- Robertson, J. D., Rizzello, L., Avila-Ollas, M., Gaitzsch, J., Contini, C., Magoñ, M. S., et al. (2016). Purification of Nanoparticles by Size and Shape. *Sci. Rep.* 6, 1–9. doi: 10.1038/srep27494
- Roy, N., Nageshan, R. K., Ranade, S., and Tatu, U. (2012). Heat shock protein 90 from neglected protozoan parasites. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1823, 707–711. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.12.003
- Salvador, A., Sandgren, K. J., Liang, F., Thompson, E. A., Koup, R. A., Pedraz, J. L., et al. (2015). Design and evaluation of surface and adjuvant modified PLGA microspheres for uptake by dendritic cells to improve vaccine responses. *Int. J. Pharm.* 496, 371–381. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.10.037
- Santos, D. M., Petersen, A. L. O. A., Celes, F. S., Borges, V. M., Veras, P. S. T., and de Oliveira, C. I. (2014). Chemotherapeutic potential of 17-AAG against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e3275. doi: 10.1371/journal.pntd.003275
- Santos, D. O., Coutinho, C. E. R., Madeira, M. F., Bottino, C. G., Vieira, R. T., Nascimento, S. B., et al. (2008). Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitol. Res.* 103, 1–10. doi: 10.1007/s00436-008-0943-2

- Sausville, E. A. (2004). Geldanamycin analogs. *J. Chemother.* 16, 68–69. doi: 10.1179/joc.2004.16.Supplement-1.68
- Schopf, F. H., Biebl, M. M., and Buchner, J. (2017). The HSP90 chaperone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 345–360. doi: 10.1038/nrm.2017.20
- Scorza, B. M., Carvalho, E. M., and Wilson, M. E. (2017). Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. *Int. J. Mol. Sci.* 18:1296. doi: 10.3390/ijms18061296
- Seifert, K. (2011). Structures, targets, and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. *Open Med. Chem. J.* 5, 31–39. doi: 10.2174/1874104501105010031
- Shah, N. K., Ivone, R., Shen, J., and Meenach, S. A. (2020). A comparison of centrifugation and tangential flow filtration for nanoparticle purification: a case study on acetalated dextran nanoparticles. *Particology* 50, 189–196. doi: 10.1016/j.partic.2019.06.004
- Shang, L., Nienhaus, K., and Nienhaus, G. U. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J. Nanobiotechnol.* 12, 1–11. doi: 10.1186/1477-3155-12-5
- Sidera, K., and Patsavoudi, E. (2013). HSP90 inhibitors: current development and potential in cancer therapy. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* 9, 1–20. doi: 10.2174/15748928113089990031
- Solit, D. B., and Chiosis, G. (2008). Development and application of Hsp90 inhibitors. *Drug Discov. Today* 13, 38–43. doi: 10.1016/j.drudis.2007.10.007
- Srivastava, S., Shankar, P., Mishra, J., and Singh, S. (2016). Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasit. Vectors* 9:277. doi: 10.1186/s13071-016-1553-y
- Sundar, S., Mehta, H., Suresh, A. V., Singh, S. P., Rai, M., and Murray, H. W. (2004). Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. *Clin. Infect. Dis.* 38, 377–383. doi: 10.1086/380971
- Urbanik, T., and Musiał, W. (2019). Influence of solvent evaporation technique parameters on diameter of submicron lamivudine-poly-ε-caprolactone conjugate particles. *Nanomaterials* 9:1240. doi: 10.3390/nano9091240
- Utreja, P., Verma, S., Rahman, M., and Kumar, L. (2020). Use of nanoparticles in medicine. *Curr. Biochem. Eng.* 6, 7–24. doi: 10.2174/2212711906666190724145101
- Van Hees, S., Elbrink, K., De Schryver, M., Delpitte, P. L., and Kiekens, F. (2020). Improving cellular uptake and cytotoxicity of chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles in macrophages. *Nanomedicine* 15, 2671–2688. doi: 10.2217/nmm-2020-0317
- Veras, P. S. T., and De Menezes, J. P. B. (2016). Using proteomics to understand how Leishmania parasites survive inside the host and establish infection. *Int. J. Mol. Sci.* 17:1270. doi: 10.3390/ijms17081270
- Whitesell, L., and Lin, N. U. (2012). HSP90 as a platform for the assembly of more effective cancer chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1823, 756–766. doi: 10.1016/j.bbamer.2011.12.006
- WHO (2020a). *Leishmaniasis*. Available online at: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1 (accessed October 14, 2020).
- WHO (2020b). *Weekly Epidemiological Record*. Geneva: WHO, 265–280.
- Wiesgigl, M., Closs, J., and Schekman, R. W. (2001). Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol. Biol. Cell* 12, 3307–3316. doi: 10.1091/mbc.12.11.3307
- Wolfram, J., Zhu, M., Yang, Y., Shen, J., Gentile, E., Paolino, D., et al. (2015). Safety of nanoparticles in medicine. *Curr. Drug Targets* 16, 1671–1681. doi: 10.2174/1389450115666140804124808
- Xiao, L., Lu, X., and M., Ruden, D. (2006). Effectiveness of Hsp90 inhibitors as anti-cancer drugs. *Mini Rev. Med. Chem.* 6, 1137–1143. doi: 10.2174/138955706778560166
- Yildirim, L., Thanh, N. T. K., Loizidou, M., and Seifalian, A. M. (2011). Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles. *Nano Today* 6, 585–607. doi: 10.1016/j.nantod.2011.10.001
- Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., Maincent, P., Dellacherie, E., Alonso, M. J., et al. (1998). Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J. Control. Release* 50, 31–40. doi: 10.1016/S0168-3659(97)00106-5
- Zhang, L., Gu, F. X., Chan, J. M., Wang, A. Z., Langer, R. S., and Farokhzad, O. C. (2008). Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83, 761–769. doi: 10.1038/sj.cpt.6100400
- Zhang, X., and Zhang, P. (2017). Polymersomes in nanomedicine—a review. *Curr. Nanosci.* 13, 124–129. doi: 10.2174/1573413712666161018144519
- Zhao, R., and Houry, W. A. (2005). Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochem. Cell Biol.* 83, 703–710. doi: 10.1139/o05-158
- Zilberstein, D., and Shapira, M. (1994). The role of pH and temperature in the development of leishmania parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 449–470. doi: 10.1146/annurev.mi.48.100194.002313

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Cruz, Patricio, Pires, Amorim, Pinha, Quadros, Dantas, Chaves, Formiga, Rocha and Veras. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

7 PERSPECTIVA

Avaliar o efeito de NP2-17-DMAG no controle da infecção por *L. braziliensis*, *in vitro* e *in vivo*.

8 DISCUSSÃO GERAL

No presente trabalho foi mostrado, pela primeira vez, a eficácia do 17-DMAG, inibidor da Hsp90, no controle da infecção por *L. braziliensis*. *In vitro*, o 17-DMAG mostrou ser mais tóxico para amastigotas intracelulares e promastigotas axênicas que para macrófagos derivados de medula óssea (BMMØ), como descrito no Capítulo 1. Em concordância com os dados obtidos no presente trabalho foi mostrado anteriormente que, *in vitro*, os inibidores da Hsp90 17-AAG (PETERSEN et al., 2012a), geldanamicina e 17-DMAG (PALMA et al., 2019) causam a morte de promastigotas axênicas de *L. amazonensis* em concentrações não tóxicas para macrófagos peritoneais ou células de linhagem de monócitos humanos, THP-1. Além disso, a baixa toxicidade do fármaco sobre células de linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) evidenciou a segurança da aplicação tópica do 17-DMAG, o que está de acordo com estudos anteriores (BERENGUER et al., 2019, 2020; MORENO et al., 2019; CARVALHEIRO et al., 2021; FERREIRA et al., 2021; BRUSTOLIN et al., 2022). Em conjunto, esses achados *in vitro* nos conduziram aos ensaios *in vivo* de toxicidade e eficácia com aplicação por via intraperitoneal ou tópica do 17-DMAG, respectivamente, descritos nos Capítulos 1 e 2 dessa tese. Realizamos também o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas de PLGA, que foram caracterizadas conforme descrito no Capítulo 3.

O tratamento com o 17-DMAG, aplicado por via intraperitoneal, no controle da infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis* se mostrou altamente eficaz, com cura clínica e redução da carga parasitária na lesão e linfonodos de drenagem com quatro semanas de tratamento. A eficácia do tratamento foi evidenciada quando iniciada após três ou cinco semanas de infecção. A ação anti-*Leishmania* de inibidores da Hsp90 *in vivo* foi mostrada previamente, com o análogo não hidrossolúvel do 17-DMAG, o 17-AAG (SANTOS et al., 2014b), que reduziu a carga parasitária apenas a carga parasitária de 10^7 para 10^6 parasitos na lesão, mas não no linfonodo dos animais tratados. Acreditamos que, em razão das propriedades farmacocinéticas do 17-DMAG serem superiores às do 17-AAG (EGORIN et al., 2002b; SAUSVILLE, 2004; WHITESELL; LIN, 2012b), utilizando o mesmo modelo animal de leishmaniose cutânea, o 17-DMAG levou à cura clínica e parasitológica dos animais tratados. Quando comparamos a eficácia terapêutica em animais com início na 3^a e 5^a semanas, observamos que a redução da carga parasitária foi completa nos linfonodos dos animais que iniciaram o tratamento tardiamente, diferente daqueles que iniciaram na 3^a semana, que mantiveram baixa carga após quatro semanas de tratamento. De acordo com nossos achados, Unger et al. (2009) identificaram taxas de falha terapêutica menores em pacientes com

leishmaniose cutânea que apresentavam lesões ulceradas, comparadas àquelas de pacientes que começaram o tratamento quando as lesões se encontravam em fases mais precoces de evolução.

O efeito anti-*Leishmania* observado nos nossos ensaios *in vivo* vem acompanhado da diminuição do infiltrado inflamatório, precocemente, a partir de quatro dias do início do tratamento, sugestivo de uma diminuição do recrutamento de células para o local da lesão. Adicionalmente, observamos aumento transitório do percentual de linfócitos T reg nos linfonodos drenantes em sete dias, não observado quatro dias após o início do tratamento por via intraperitoneal. Esses achados são sugestivos do 17-DMAG ter um efeito antiinflamatório, que pode ser benéfico no tratamento da leishmaniose cutânea, como anteriormente descrito no uso do 17-AAG no tratamento *in vitro* contra *L. amazonensis* (PETERSEN et al., 2012a) e para tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias como aterosclerose, derrame e colite (BLANCO-COLIO et al., 2010; SHIMP et al., 2012; QI et al., 2014; TUKAJ et al., 2014; TUKAJ; GRZEGORZ, 2016; UDDIN et al., 2020). O aumento do percentual de linfócitos T reg observados no sétimo dia de tratamento, que não foi observado nos dias 4 ou 28, reforça essa hipótese. Isso pode ser justificado pois células T reg são conhecidas por regular a inflamação causada pela liberação de citocinas e quimiocinas por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (BELKAID et al., 2002; PETERS SACKS, 2006; RUIZ; BECKER, 2007; FALCÃO et al., 2012). Em conjunto, os dados obtidos com o tratamento de camundongos por via intraperitoneal no nosso trabalho sugerem que o 17-DMAG pode estar atuando tanto por ação direta sobre o parasito, causando a sua eliminação no sítio da infecção e no linfonodo de drenagem, quanto o composto pode atuar na modulação do sistema imune do hospedeiro, diminuindo a inflamação, por uma possível redução do recrutamento de células para o local da lesão, e aumentando transitoriamente o percentual de células T reg no linfonodo drenante desses animais.

O capítulo 2 abordou a avaliação da segurança e eficácia do 17-DMAG em base de hidrogel aplicado por via tópica utilizando o mesmo modelo experimental de leishmaniose cutânea empregado nos ensaios descritos no Capítulo 1. O 17-DMAG se manteve quimicamente estável em hidrogel a 4 ou a temperatura ambiente,, mas não a 37 °C Apesar de não termos encontrado estudos anteriores que avaliaram a estabilidade do 17-DMAG quando incorporado em hidrogel, estudo similar utilizando o antibiótico tetraciclina mostrou igualmente estabilidade do fármaco incorporado em hidrogel na temperatura de 5 °C, enquanto, quando exposto a 23 °C, houve uma redução da concentração do fármaco, acompanhada pela alteração da sua coloração (KOSTRZEBSKA et al., 2021). Adicionalmente, nossos ensaios mostraram uma liberação controlada do 17-DMAG a partir da matriz polimérica do hidrogel, sugerindo a sua liberação controlada, similar ao observado em outros estudos, utilizando o

antibiótico levofloxacino (SHARMA et al., 2018) ou o antiviral aciclovir (MALIK et al., 2017) incorporados em hidrogéis. Acreditamos que essa liberação controlada pode reduzir eventos de toxicidade local e sistêmica da aplicação do 17-DMAG (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2014; ANSELMO et al., 2018). Por fim, nos nossos ensaios *in vivo*, mostramos que a aplicação tópica do 17-DMAG em hidrogel foi tóxica para camundongos saudáveis apenas nas maiores concentrações testadas, intensificada pelo uso de colares elizabetanos devido ao aumento do tempo de exposição. A toxicidade detectada foi reversível, após a suspensão do tratamento e que, nas concentrações de 0,10 ou 0,15 mg/g o fármaco em hidrogel é capaz de acelerar a cicatrização das lesões de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*. Com o uso desses dispositivos os animais ficam impedidos de remover a formulação, justificando o aumento da toxicidade local (WELSS et al., 2004; COHN;COTE, 2020; SHENODA et al., 2020; STAPLETON; LEE, 2021). Além disso, identificamos discreta reação inflamatória e aumento discreto da espessura da orelha, em animais que foram tratados diariamente com o hidrogel branco ou com o adesivo curativo *tegaderm*. Sugerimos que a toxicidade está relacionada à manipulação diária da orelha dos animais, gerando dilatação dos vasos e recrutamento de células, gerando uma resposta inflamatória no local (CHEN et al., 2018). Por fim, a eficácia do tratamento tópico com o 17-DMAG em hidrogel foi observada nas concentrações de 0,10 ou 0,15 mg/g, com o fechamento das lesões na orelha dos animais infectados por *L. braziliensis*. De maneira similar, Martínez-Salazar et al. (2020) observaram o fechamento das lesões em camundongos infectados por *L. major* e tratados por via tópica com o composto MF29. Os dados da aplicação tópica do 17-DMAG obtidos até aqui, em conjunto, sugerem que este fármaco pode ser utilizado para compor novos esquemas terapêuticos, como tratamento único ou associado a fármacos aplicados por via sistêmica, auxiliando na cicatrização das lesões.

No Capítulo 3 produzimos e caracterizamos nanopartículas poliméricas (NPs) de PLGA para a liberação controlada do 17-DMAG, para posterior tratamento *in vitro* e *in vivo* no controle da infecção por *L. braziliensis* em modelo murino de leishmaniose cutânea. Comparando-se as características das NPs produzidas por dois protocolos distintos de dupla emulsão (P1 ou P2), ambos os protocolos produziram NPs com formato esférico e de superfície lisa. O P2 produziu NPs de menores tamanhos e com índice de polidispersão (PdI) mais homogêneo. Essas caracterizações morfológicas são essenciais para a compreensão das possíveis interações dessas NPs com as células, além das possíveis rotas de internalização, sua localização intracelular e a possibilidade de ocorrência de toxicidade (SHANG et al., 2014).

Adicionalmente, as NPs produzidas pela otimização de P2 apresentaram maior

eficiência de encapsulamento (%EE), o que garante uma menor perda do princípio ativo durante o processo de produção das NPs, sendo, portanto, um protocolo mais economicamente favorável. As NPs produzidas por P2 apresentaram liberação sustentada do fármaco ao longo do tempo e foram internalizadas por BMMØ. O perfil de liberação do 17-DMAG a partir das NPs está de acordo com outros fármacos hidrofílicos encapsulados em NPs, onde observa-se, inicialmente, uma liberação rápida, consistente com a liberação das moléculas do fármaco que encontram-se adsorvidas na superfície das NPs, seguida de uma liberação mais lenta e sustentada nas horas seguintes, consistente com a degradação gradual da matriz polimérica do PLGA e liberação do fármaco encapsulado (HIRENKUMAR; STEVEN, 2012; KAPOOR et al., 2015; RIETSCHER et al., 2016; MIR et al., 2017; RAFIEI; HADDADI, 2017; AFZAL et al., 2019). Observamos também que NPs produzidas com o mesmo protocolo contendo rodamina são internalizadas por macrófagos. Este resultado é similar a outros estudos que mostraram de NPs são internalizadas por fagócitos profissionais, como células de linhagens macrofágica RAW e J774sem apresentar sinais de toxicidade celular (COHEN-SELA et al., 2009; NICOLETE et al., 2011; PETERSEN et al., 2018; COUTO et al., 2020; VAN HEES et al., 2020). Apesar da necessidade de estudos adicionais para investigar o efeito biológico e imunológico das NPs aqui produzidas no controle da infecção *in vitro* e *in vivo* por *L. braziliensis*, essas NPs produzidas por P2 apresentaram características físico-químicas, morfológicas e biológicas compatíveis para sua utilização no tratamento de modelos experimentais de leishmaniose cutânea.

Em conjunto, apesar da necessidade de estudos adicionais para melhor compreender os mecanismos de ação anti-*Leishmania* do 17-DMAG, os dados apresentados no presente trabalho colocam este fármaco como um tratamento promissor contra a leishmaniose cutânea, tanto quando aplicado sistemicamente, quanto aplicado localmente, diretamente sobre as lesões. Adicionalmente, o uso de nanopartículas de PLGA contendo este fármaco pode constituir uma alternativa inovadora para liberação controlada do fármaco.

9 CONCLUSÃO

O 17-DMAG é eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea em modelo murino de infecção por *L. braziliensis*, quando aplicado por via intraperitoneal ou tópica, e nanopartículas contendo 17-DMAG foram produzidas, com boas características para futuros ensaios de eficácia no controle das infecções *in vitro* e *in vivo* por *L. braziliensis*.

10 PERSPECTIVAS

- Verificar a ocorrência de recidiva em camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*, após finalização do tratamento com início tardio usando o 17-DMAG;
- Caracterizar a resposta imune de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados com 17-DMAG;
- Avaliar o efeito do 17-DMAG na migração e na expressão de moléculas relacionadas a migração de BMMØ infectados ou não com *L. braziliensis*;
- Verificar a carga parasitária na orelha e linfonodo drenante de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados com o 17-DMAG por via tópica;
- Avaliar o efeito da combinação do 17-DMAG com o Glucantime ou Anfotericina B, contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, *in vitro*;
- Estabelecer esquemas terapêuticos eficazes no controle da infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis* utilizando o 17-DMAG, Glucantime ou Anfotericina B aplicado por via intraperitoneal, associado ao 17-DMAG aplicado por via tópica;
- Avaliar a eficácia do 17-DMAG por via tópica, associado à Miltefosina por via oral, no controle da infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*.
- Avaliar o efeito de NP-17-DMAG no controle da infecção por *L. braziliensis*, *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ADINOLFI, L. E. et al. Synergistic effect of Glucantime and a liposome-encapsulated muramyl dipeptide analog in therapy of experimental visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.** 48, 409–416, 1985. doi:10.1128/iai.48.2.409-416.1985.
- AEBISCHER, T. Recurrent cutaneous leishmaniasis: A role for persistent parasites? **Parasitol. Today** 10, 25–28, 1994. doi:10.1016/0169-4758(94)90353-0.
- AFZAL, I. et al. Mannosylated thiolated paromomycin-loaded PLGA nanoparticles for the oral therapy of visceral leishmaniasis. **Nanomedicine** 14, 387–406, 2019. doi:10.2217/nmm-2018-0038.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: a review. **Acta Trop.** 172, 86–90, 2017. doi:10.1016/j.actatropica.2017.04.029.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 10, 1–40, 2016a. doi:10.1371/journal.pntd.0004349.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 10, 1–40, 2016b. doi:10.1371/journal.pntd.0004349.
- ALAVI-NAINI, R.; FAZAELI, A.; O'DEMPSEY, T. Topical treatment modalities for old world cutaneous leishmaniasis: a review. **Prague Med. Rep.** 113, 105–118, 2012. doi:10.14712/23362936.2015.26.
- ALBERTS, J., RAFF, L.; WALTER, R. **Biologia Molecular da célula**. 6. ed. , ed. Artmed., 2017.
- AMMAR, A. A. et al. (2019). Amphotericin B-loaded nanoparticles for local treatment of cutaneous leishmaniasis. **Drug Deliv. Transl. Res.** 9, 76–84, 2019. doi:10.1007/s13346-018-00603-0.
- AMORIM, M. F. de. **Desenvolvimento da formulação contendo o fármaco 17-DMAG impregnado em membrana de celulose bacteriana para compor esquema terapêutico contra leishmaniose cutânea**, 2021. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/52990>.
- ANDRADE-NETO, V. V. et al. Leishmaniasis treatment: Update of possibilities for drug repurposing. **Front. Biosci. - Landmark** 23, 967–996, 2018. doi:10.2741/4629.
- ANSELMO, A. C., Gokarn, Y., MITRAGOTRI, S. Non-invasive delivery strategies for biologics. **Nat. Rev. Drug Discov.** 18, 19–40, 2018. doi:10.1038/nrd.2018.183.
- ANSELMO, A. C., and MITRAGOTRI, S. An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. **J. Control. Release** 190, 15–28, 2014. doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.053.
- APOLINÁRIO, A. C. Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito

mais “espaço lá embaixo.” **Quim.** Nov. 43, 212–225, 2020. doi:nanocarriers; nanomedicine; biological barriers; nanopharmacology.

ASHKANI-ESFAHANI, S. et al. Taurine improves the wound healing process in cutaneous leishmaniasis in mice model, based on stereological parameters. **Adv. Biomed. Res.** 3, 204, 2014. doi:10.4103/2277-9175.142314.

AZIM, M.. et al. Therapeutic advances in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: a review. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 15, 1–15, 2021. doi:10.1371/journal.pntd.0009099.

BASKETTER, D.; JÍROVA, D.; KANDÁROVÁ, H. Review of skin irritation/corrosion hazards on the basis of human data: a regulatory perspective. **Interdiscip. Toxicol.** 5, 98–104, 2012. doi:10.2478/v10102-012-0017-2.

BELKAID, Y. et al.. CD4+ CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. **Nature** 420, 499–502, 2002. doi:10.1038/nature01199.1.

BERENGUER, D. et al. Topical amphotericin B semisolid dosage form for cutaneous leishmaniasis: Physicochemical characterization, ex vivo skin permeation and biological activity. **Pharmaceutics** 12, 1–16, 2020. doi:10.3390/pharmaceutics12020149.

BERENGUER, D. et al. Development and characterization of a semi-solid dosage form of meglumine antimoniate for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Pharmaceutics** 11, 2019. doi:10.3390/pharmaceutics11110613.

BHOWMIK, D. et al. Recent Advances In Novel Topical Drug Delivery System. **Pharma Innov. J.** 1, 12–31, 2012.

BLANCO-COLIO, L. M et al. **Heat shock protein 90 inhibitors attenuate inflammatory responses in atherosclerosis.** 330–337, 2010. doi:10.1093/cvr/cvq046.

BOGDAN, C., Donhauser et al. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. **J. Exp. Med.** 191, 2121–2129, 2000. doi:10.1084/jem.191.12.2121.

(BOSE, S., Weikl, T., Bügl, H., and BUCHNER, J. Chaperone function of Hsp90-associated proteins. **Science** (80-.). 274, 1715–1717, 1996. doi:10.1126/science.274.5293.1715.

Briscoe, C. J., and Hage, D. S. **Factors affecting the stability of drugs and their metabolites in biological matrices.** Biopharm. Pharmacokinet. Considerations Vol. 1 Adv. Pharm. Prod. Dev. Res., 517–537, 2021. doi:10.1016/B978-0-12-814425-1.00022-X.

BRITO , N. C.; Rabello, A.; Cota, G. F. (2 Efficacy of pentavalent antimoniate intralesional infiltration therapy for cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **PLoS One** 12. doi:10.1371/journal.pone.0184777.

BROWN , M. et al. Hsp90-From signal transduction to cell transformation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 363, 241–246, 2007. doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.054.

BRUGUÉS , A. P. et al. Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped in stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions. **Nanomedicine** 10, 227–240, 2015.

doi:10.2217/nmm.14.102.

BRUSTOLIN, A. Á. et al. In vitro activity of cinnamaldehyde on Leishmania (Leishmania) amazonensis. **Exp. Parasitol.** 237, 2022.

BUCHNER, J. Hsp90 and Co. - A holding for folding. **Trends Biochem. Sci.** 24, 136–141, 1999. doi:10.1016/S0968-0004(99)01373-0.

BURZA, S., CROFT, S. L., and Boelaert, M. Leishmaniasis. **Lancet** 392, 951–970, 2018. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2.

CABRAL, F. V. et al. Towards effective cutaneous leishmaniasis treatment with light-based technologies. A systematic review and meta-analysis of preclinical studies. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.** 221, 2021. doi:10.1016/j.jphotobiol.2021.112236.

CARNEIRO, G. et al. Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Expert Opin. Drug Deliv.** 9, 1083–1097, 2012. doi:10.1517/17425247.2012.701204.

CARVALHEIRO, M. et al. Amphotericin B-loaded deformable lipid vesicles for topical treatment of cutaneous leishmaniasis skin lesions. **Drug Deliv. Transl. Res.** 11, 717–728, 2021. doi:10.1007/s13346-021-00910-z.

CARVALHO, A. M. ET AL. PROTECTION AND PATHOLOGY IN LEISHMANIA BRAZILIENSIS INFECTION. **PATHOGENS** 11, 1–11, 2022. DOI:10.3390/PATHOGENS11040466.

CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.** 56, 315–325, 1994. doi:10.1016/0001-706X(94)90103-1.

CELES, F. S. et al. A pilot and open trial to evaluate topical Bacterial Cellulose bio-curatives in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis*. **Acta Trop.** 225, 2022. doi:10.1016/j.actatropica.2021.106192.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opin. Pharmacother.** 20, 1251–1265, 2019. doi:10.1080/14656566.2019.1609940.

CHAVEZ-FUMAGALLI, M. A. et al. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 48, 235–242, 2015. doi:10.1590/0037-8682-0138-2015.

CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget** 9, 7204–7, 2018. www.impactjournals.com/oncotarget/.

CHEN, T. L. et al. **Hsp90 inhibition increases SOCS3 transcript and regulates migration and cell death in chronic lymphocytic leukemia.** 7.

CHIOSIS, G. et al. Hsp90: The vulnerable chaperone. **Drug Discov. Today** 9, 881–888, 2004b. doi:10.1016/S1359-6446(04)03245-3.

COHEN-SELA, E. et al. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. **J. Control. Release** 133, 90–95, 2009. doi:10.1016/j.jconrel.2008.09.073.

COHN; CÔTÉ. How to Deal with Severe , Self-Inflicted Skin Erosions. **Clin. Vet. Advis.** 4, 2–5, 2020.

COPELAND, N. K.; ARONSON, N. E. Leishmaniasis: Treatment updates and clinical practice guidelines review. **Curr. Opin. Infect. Dis.** 28, 426–437, 2015. doi:10.1097/QCO.000000000000194.

COUTO, P. V. et al. Solid lipid nanoparticles as a novel formulation approach for tanespimycin (17-AAG) against leishmania infections: Preparation, characterization and macrophage uptake. **Acta Trop.** 211, 105595, 2020. doi:10.1016/j.actatropica.2020.105595.

CROFT, S. L., SEIFERT, K.; Yardley, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.** 123, 399–410, 2006.

DE LYRA, M. A. M. et al. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. **Lat. Am. J. Pharm.** 26, 784–793, 2007.

DE MENEZES, J. P. B. et al. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **Biomed Res. Int.** 2015, 15–18. doi:10.1155/2015/815023.

DE MENEZES, J. P. B. et al. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **Biomed Res. Int.** 2015, 15–18, 2015c. doi:10.1155/2015/815023.

DE MOURA, T. R. et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.** 73, 5827–5834, 2005. doi:10.1128/IAI.73.9.5827-5834.2005.

DE OLIVEIRA, B. C. et al. Central and Effector Memory Human CD4+ and CD8+ T Cells during Cutaneous Leishmaniasis and after In Vitro Stimulation with *Leishmania (Viannia) braziliensis* Epitopes. **Vaccines** 11, 2023. doi:10.3390/vaccines11010158.

DE ROSSELL, R. A. et al. Is leishmaniasis ever cured? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 86, 251–253, 1992. doi:10.1016/0035-9203(92)90297-P.

DE SOUZA, A. et al. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. **Int. J. Pharm.** 547, 421–431, 2018. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.06.018.

DURAND, R. et al. Activity of pentamidine-loaded poly (D,L-lactide) nanoparticles against *Leishmania infantum* in a murine model. **Parasite**, 1997. doi:10.1051/parasite/1997044331.

ECHTENKAMP, F. J.; FREEMAN, B. C. Expanding the cellular molecular chaperone network through the ubiquitous cochaperones. **Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.** 1823, 668–673, 2012. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.08.011.

EGORIN, M. J. et al. Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of 17-

(dimethylaminoethylamino)- 17-demethoxygeldanamycin (NSC 707545) in CD 2f 1 mice and fischer 344 rats. **Cancer Chemother. Pharmacol.** 49, 7–19, 2002b. doi:10.1007/s00280-001-0380-8.

ELLIS, R. J. The molecular chaperone concept. **Semin Cell Biol.** 1, 1–9, 1990. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1983265/>.

ELLIS, R. J.; VAN DER VIES, S. M.; HEMMINGSEN, S. M. . The molecular chaperone concept. **Biochem Soc Symp.** 55, 145–53, 1989. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2695089/>.

ERLEJMAN, A. G. et al. Regulatory role of the 90-kDa-heat-shock protein (Hsp90) and associated factors on gene expression. **Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.** 1839, 71–87, 2014a. doi:10.1016/j.bbagr.2013.12.006.

ERLEJMAN, A. G. et al. Regulatory role of the 90-kDa-heat-shock protein (Hsp90) and associated factors on gene expression. **Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.** 1839, 71–87, 2014b. doi:10.1016/J.BBAGRM.2013.12.006.

ESPUELAS, S.; SCHWARTZ, J.; MORENO, E. Nanoparticles in the Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: Gaps, Facts, and Perspectives. **Nanosci. Dermatology**, 135–155, 2016. doi:10.1016/B978-0-12-802926-8.00011-2.

FALCÃO, S. C. et al. The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. **Int. J. Parasitol.** 42, 771–780, 2012. doi:10.1016/j.ijpara.2012.05.006.

FERNANDES, F. R. et al. Amphiphilic antimony(V) complexes for oral treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.** 57, 4229–4236, 2013. doi:10.1128/AAC.00639-13.

FERREIRA, M. A. et al. Annatto oil loaded nanostructured lipid carriers: A potential new treatment for cutaneous leishmaniasis. **Pharmaceutics** 13, 2021. doi:10.3390/pharmaceutics13111912.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Rev. Bras. Ciências Farm.** 42, 167–194, 2006. doi:10.1590/s1516-93322006000200003.

FORMIGA, F. R.; ANSORENA, E.; DE MENDONZA, A. E., Imbuluzqueta, E., González, D., and Prieto, M. J. B. Nanosistemas a base de poliésteres. **Nanotecnología Farm. Real. y posibilidades Farmacoter.**, 41–101, 2009.

FORTIN, A. et al. Direct Comparison of the Efficacy and Safety of Oral Treatments with Oleylphosphocholine (OIPC) and Miltefosine in a Mouse Model of *L. major* Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 8, 1–7, 2014. doi:10.1371/journal.pntd.0003144.

FRÉZARD, F.; Demicheli, C.; Ribeiro, R. R. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. **Molecules** 14, 2317–2336, 2009. doi:10.3390/molecules14072317.

GHALHAR, M. G. et al. Comparison of Inhibitory Effects of 17-AAG Nanoparticles and Free 17-AAG on HSP90 Gene Expression in Breast Cancer. **Asian Pac J Cancer Prev** 15, 7113–7118, 2014.

GLAZE, E. R. et al. Preclinical toxicity of a geldanamycin analog, 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), in rats and dogs: potential clinical relevance. **Cancer Chemother. Pharmacol.** 56, 637–647, 2005. doi:10.1007/s00280-005-1000-9.

GOMES, I. N. et al. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. **Microbes Infect.** 5, 251–260, 2003. doi:10.1016/S1286-4579(03)00025-X.

GONÇALVES, G. S. et al. Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Acta Trop.** 93, 161–167, 2005. doi:10.1016/j.actatropica.2004.10.007.

GRAEFE, S. E. B. et al. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. **Eukaryot. Cell** 1, 936–943, 2002. doi:10.1128/EC.1.6.936-943.2002.

GUSWANTO, A. et al. 17-DMAG inhibits the multiplication of several *Babesia* species and *Theileria equi* on in vitro cultures, and *Babesia microti* in mice. **Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.** 8, 104–111, 2018a. doi:10.1016/j.ijpddr.2018.02.005.

GUTIÉRREZ, V. et al. New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis. **Chem. Soc. Rev.** 45, 152–168, 2016. doi:10.1039/c5cs00674k.

HAMIDI, M., Azadi, A., and Rafiei, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 60, 1638–1649, 2008. doi:10.1016/j.addr.2008.08.002.

HIRENKUMAR, M.; STEVEN, S. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers (Basel).** 3, 1–19, 2012. doi:10.3390/polym3031377.Poly.

HOMBACH, A.; OMMEN, G.; CHROBAK, M.; CLOS, J. The Hsp90-Sti1 interaction is critical for *Leishmania donovani* proliferation in both life cycle stages. **Cell. Microbiol.** 15, 585–600, 2013. doi:10.1111/cmi.12057.

HOMBACH, A.; OMMEN, G.; MACDONALD, A.; CLOS, J. A small heat shock protein is essential for thermotolerance and intracellular survival of *Leishmania donovani*. **J. Cell Sci.** 127, 4762–4773, 2014. doi:10.1242/jcs.157297.

HOMBACH, A.; OMMEN, G.; SATTTLER, V.; CLOS, J. ***Leishmania donovani* P23 protects parasites against HSP90 inhibitor-mediated growth arrest.** 20, 2015. doi:10.1007/s12192-015-0595-y.

HWA, C.; BAUER, E. A.; COHEN, D. E. “Skin biology,” in **Dermatologic 2Therapy** (Elsevier), 464–470, 2011. doi:https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2012.01460.x.

IVANIUSHINA, V. A.; MERIIN, A. B.; KISELEV, O. I. Molecular chaperones: new proteins-new functions. **Mol Biol** **25**, 869–82, 1991.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discov. Today** **18**, 1272–1281, 2013. doi:10.1016/j.drudis.2013.08.005.

JEEVANANDAM, J. et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. **Beilstein J. Nanotechnol.** **9**, 1050–1074, 2018. doi:10.3762/bjnano.9.98.

KALAT, S. A. M. et al. Use of topical liposomes containing meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of L. major lesion in BALB/c mice. **Exp. Parasitol.** **143**, 5–10, 2014. doi:10.1016/j.exppara.2014.04.013.

KAPOOR, D. N. et al. PLGA: A unique polymer for drug delivery. **Ther. Deliv.** **6**, 41–58, 2015. doi:10.4155/tde.14.91.

KAYE, P.; SCOTT, P.. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.** **9**, 604–615, 2011. doi:10.1038/nrmicro2608.

KOSTRZEBSKA, A.; ZŁOCIŃSKA; A.; MUSIAŁ, W. Evaluation of the influence of a hydrogel containing ampd on the stability of tetracycline hydrochloride. **Pharmaceutics** **13**, 2021. doi:10.3390/pharmaceutics13091381.

KRUKEMEYER, M. G. et al. History and Possible Uses of Nanomedicine Based on Nanoparticles and Nanotechnological Progress. **J. Nanomed. Nanotechnol.** **06**, 2015. doi:10.4172/2157-7439.1000336.

KUHLENCORD, A.; MANIERA, T.; EIBL, H.; UNGER, C et al. Hexadecylphosphocholine: Oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. **Antimicrob. Agents Chemother.** **36**, 1630–1634, 1992. doi:10.1128/AAC.36.8.1630.

KUMAR, R. et al. Study the effects of PLGA-PEG encapsulated Amphotericin B nanoparticle drug delivery system against Leishmania donovani. **Drug Deliv.** **22**, 383–388, 2015. doi:10.3109/10717544.2014.891271.

KUMAR, R., et al. Development of PLGA-PEG encapsulated miltefosine based drug delivery system against visceral leishmaniasis. **Mater. Sci. Eng.** **59**, 748–753, 2016. doi:10.1016/j.msec.2015.10.083.

LALATSA, A. et al. Topical buparvaquone nano-enabled hydrogels for cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Pharm.** **588**, 119734, 2020. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119734.

LANZA, J. S. et al. Polarity-sensitive nanocarrier for oral delivery of Sb(V) and treatment of cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Nanomedicine** **11**, 2305–2318, 2016. doi:10.2147/IJN.S105952.

LANZA, J. S. et al. Recent advances in amphotericin B delivery strategies for the treatment of leishmaniases. **Expert Opin. Drug Deliv.** **0**, 1, 2019. doi:10.1080/17425247.2019.1659243.

LEMOS, V. de Souza, et al. Different Leishmania species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes Infect.** 2, 1807–1815, 2000. doi:10.1016/S1286-4579(00)01340-X.

LI, J.; SOROKA, J.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. **Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.** 1823, 624–635, 2012. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.09.003.

LI, Q. A review of the structure, preparation, and application of NLCs, PNPs, and PLNs. **Nanomaterials** 7, 1–25, 2017. doi:10.3390/nano7060122.

LI, Q. et al. Apoptosis caused by Hsp90 inhibitor geldanamycin in Leishmania donovani during promastigote-to-amastigote transformation stage. **Parasitol. Res.** 105, 1539–1548, 2009. doi:10.1007/s00436-009-1582-y.

LI, T.; PEREZ-SOLER, R.. Skin toxicities associated with epidermal growth factor receptor inhibitors. **Target. Oncol.** 4, 107–119, 2009. doi:10.1007/s11523-009-0114-0.

Lin, T., et al. HSP90 inhibitor encapsulated photo-theranostic nanoparticles for synergistic combination cancer therapy. **Theranostics** 6, 1324–1335, 2016. doi:10.7150/thno.14882.

LIN, W. Introduction: Nanoparticles in Medicine. **Chem. Rev.** 115, 10407–10409, 2015. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00534.

LÓPEZ-SERRANO; A. et al. Nanoparticles: A global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact. **Anal. Methods** 6, 38–56, 2014. doi:10.1039/c3ay40517f.

LUCKY, S. S.; SOO, K. C.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. **Chem. Rev.** 115, 1990–2042, 2015. doi:10.1021/cr5004198.

MACHADO, P. et al. Early Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **CID** 2002, 34, 2002. <http://cid.oxfordjournals.org/>.

MACHADO, P. R. L. et al. A Double-blind, Randomized Trial to Evaluate Miltefosine and Topical Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania braziliensis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.** 73, E2465–E2469. doi:10.1093/cid/ciaa1337.

MACHADO, P. R. L. et al. Tamoxifen and meglumine antimoniate combined therapy in cutaneous leishmaniasis patients: a randomised trial. **Trop. Med. Int. Heal.** 23, 936–942, 2018. doi:10.1111/tmi.13119.

MALIK, N. S.; AHMAD, M.; MINHAS, M. U. Cross-linked β -cyclodextrin and carboxymethyl cellulose hydrogels for controlled drug delivery of acyclovir. **PLoS One** 12, 1–17, 2017. doi:10.1371/journal.pone.0172727.

MARCU, M.; NECKERS, L. The C-Terminal Half of Heat Shock Protein 90 Represents a Second Site for Pharmacologic Intervention in Chaperone Function. **Curr. Cancer Drug Targets** 3, 343–347, 2005. doi:10.2174/1568009033481804.

MARSDEN, P. D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 18, 187–198, 1985. doi:10.1590/s0037-86821985000300011.

MARTÍNEZ-SALAZAR, B. et al. Evaluation of a new topical treatment for the control of cutaneous leishmaniasis. **Microorganisms** 8, 1–16, 2020. doi:10.3390/microorganisms8111803.

MASMOUDI , A. et al. Old World cutaneous leishmaniasis: Diagnosis and treatment. **J. Dermatol. Case Rep.** 7, 31–41, 2013. doi:10.3315/jdcdr.2013.1135.

MEIRA, C. dos S.; GEDAMU, L. Protective or detrimental? Understanding the role of host immunity in leishmaniasis. **Microorganisms** 7, 2019. doi:10.3390/microorganisms7120695.

MELLATYAR, H. et al. Comparison of inhibitory effect of 17-DMAG nanoparticles and free 17-DMAG in HSP90 gene expression in lung cancer. **Asian Pacific J. Cancer Prev.** 15, 8693–8698, 2014. doi:10.7314/APJCP.2014.15.20.8693.

MELLATYAR, H. ET AL. Targeting HSP90 gene expression with 17-DMAG nanoparticles in breast cancer cells. **Asian Pacific J. Cancer Prev.** 17, 2453–2457, 2016. doi:10.7314/APJCP.2016.17.5.2453.

MELLATYAR, H. et al. Targeted cancer therapy through 17-DMAG as an Hsp90 inhibitor: Overview and current state of the art. **Biomed. Pharmacother.** 102, 608–617, 2018. doi:10.1016/j.biopha.2018.03.102.

MENEZES, J. P. B. et al. Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in macrophages infected with *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major*. **Microbes Infect.** 15, 579–591, 2013. doi:10.1016/j.micinf.2013.04.005.

MEYER, K. J.; SHAPIRO, T. A. Potent antitrypanosomal activities of heat shock protein 90 inhibitors in vitro and in vivo. **J. Infect. Dis.** 208, 489–499, 2013. doi:10.1093/infdis/jit179.

MEYERHOFF, A. **U. S. Food and drug administration approval of ambisome (liposomal amphotericin b) for treatment of visceral leishmaniasis.** 42–48, 1999.

MIR, M.; AHMED, N.,; REHMAN, A. U. R Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. **Colloids Surfaces B. Biointerfaces** 159, 217–231, 2017. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.07.038.

MONZOTE , L. et al. Effect of oral treatment with the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against cutaneous Leishmaniasis in BALB/c Mice, caused by *Leishmania amazonensis*. **Forsch. Komplementarmed.** 16, 334–338, 2009. doi:10.1159/000237741.

MOOSAVIAN, S. A.; FALLAH, M.; JAAFARI, M. R. The activity of encapsulated meglumine antimoniate in stearylamine-bearing liposomes against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Exp. Parasitol.** 200, 30–35, 2019. doi:10.1016/j.exppara.2019.03.004.

MORENO, E. et al. Evaluation of skin permeation and retention of topical dapsone in murine cutaneous leishmaniasis lesions. **Pharmaceutics** 11, 2019.

doi:10.3390/pharmaceutics11110607.

MOSER, C. et al. **Blocking heat shock protein-90 inhibits the invasive properties and hepatic growth of human colon cancer cells and improves the efficacy of oxaliplatin in p53-deficient colon cancer tumors in vivo.** 2868–2879, 2007. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0410.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunol. Rev.** 240, 286–296, 2011. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00983.x.

MUELLER, R. S. et al. A review of topical therapy for skin infections with bacteria and yeast. **Vet. Dermatol.** 23, 2012. doi:10.1111/j.1365-3164.2012.01057.x.

MURILLO-SOLANO, C. et al. Identification and characterization of the antiplasmodial activity of Hsp90 inhibitors. **Malar. J.** 16, 1–14, 2017. doi:10.1186/s12936-017-1940-7.

NASSIF, P. W. et al. Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology** 144, 995–1004, 2017a. doi:10.1017/S0031182017000385.

NASSIF, P. W. et al. Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology** 144, 995–1004, 2017b. doi:10.1017/S0031182017000385.

NICOLETE, R.; SANTOS, D. F. D.; FACCIOLI, L. H. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response. **Int. Immunopharmacol.** 2011. doi:10.1016/j.intimp.2011.05.014.

OLIVEIRA, C. I. de; BARRAL-NETTO, M.. O Modelo Experimental nas Infecções Causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. **Gaz. méd. Bahia** 1, 35–45, 2005.

OPAS. **Guideline for the**, 2013. www.topalbertadoctors.org.

Oryan, A., and Akbari, M. (2016). Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pac. J. Trop. Med.** 9, 925–932. doi:10.1016/j.apjtm.2016.06.021.

PAHO. **Guideline for the treatment of leishmaniasis in the Americas**, 2022. www.topalbertadoctors.org.

PALLAVI, R. et al. Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: Biochemical characterization of HSP90 from *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma evansi* and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. **J. Biol. Chem.** 285, 37964–37975, 2010a. doi:10.1074/jbc.M110.155317.

PALLAVI, R. et al. Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: Biochemical characterization of HSP90 from *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma evansi* and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. **J. Biol. Chem.** 285, 37964–37975, 2010b. doi:10.1074/jbc.M110.155317.

Palma, L. C. et al. A docking-based structural analysis of geldanamycin-derived inhibitor

binding to human or Leishmania Hsp90. **Sci. Rep.** 9, 14756, 2019. doi:10.1038/s41598-019-51239-0.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Brasil: Leishmaniose cutânea e mucosa 2016. **Inf. Leishmanioses**, 1, 2016. www.paho.org/leishmaniasis.

PETERS, N.; Sacks, D. Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. **Immunol. Rev.** 213, 159–179, 2006. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00432.x.

PETERSEN, A. L, 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.** 8, 1–14, 2018. doi:10.3389/fcimb.2018.00303.

PETERSEN, A. L. de O. A. et al. 17-AAG-induced activation of the autophagic pathway in leishmania is associated with parasite death. **Microorganisms** 9, 1–15, 2021. doi:10.3390/microorganisms9051089.

PETERSEN, A. L. de O. A. et al. 17-AAG Kills Intracellular Leishmania amazonensis while Reducing Inflammatory Responses in Infected Macrophages. **PLoS One** 7, 1–12, 2012a. doi:10.1371/journal.pone.0049496.

PETERSEN, A. L. de O. A. et al. 17-AAG Kills intracellular leishmania amazonensis while reducing inflammatory responses in infected macrophages. **PLoS One** 7, 1–12, 2012b. doi:10.1371/journal.pone.0049496.

Powers, M. V.; Workman, P. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. **FEBS Lett.** 581, 3758–3769, 2007. doi:10.1016/j.febslet.2007.05.040.

PRATT, W. B.; TOFT, D. O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. **Exp. Biol. Med.** 2003. doi:10.1177/153537020322800201.

PROKSCH, E. et al. The skin: An indispensable barrier. **Exp. Dermatol.** 17, 1063–1072, 2008. doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x.

QI, J. et al. (2014). 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin Attenuates Inflammatory Responses in Experimental Stroke. **Stroke**, 37, 1713–1718.

RAFIEL, P.; HADDADI, A. Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: Pharmacokinetics and biodistribution profile. **Int. J. Nanomedicine** 12, 935–947, 2017. doi:10.2147/IJN.S121881.

RATH, S. et al. **Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose**: estado da arte. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 26, 550–555, 2003.

RAUKTYS, A. et al. Topical rapamycin inhibits tuberous sclerosis tumor growth in a nude mouse model. **BMC Dermatol.** 8, 1, 2008. doi:10.1186/1471-5945-8-1.

RIETSCHER, R. et al.. Impact of PEG and PEG-b-PAGE modified PLGA on nanoparticle formation, protein loading and release. **Int. J. Pharm.** 500, 187–195, 2016. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.01.021.

ROY, N. et al. Heat shock protein 90 from neglected protozoan parasites. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823, 707–711, 2012. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.12.003.

Ruiz, H. K. et al. New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and *Leishmania* spp. **Int. J. Pharm.** 473, 148–157, 2014. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.07.004.

RUIZ, J. H.; BECKER, I. . CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.** 29, 671–678, 2007. doi:10.1111/j.1365-3024.2007.00991.x.

SALATA, O. V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. **J. Nanobiotechnology** 6, 1–6, 2004. doi:10.1186/1477-3155-2-12.

SANTOS, C. da S.; BRODSKY, C. I. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. **Front. Public Heal.** 2, 1–6, 2014. doi:10.3389/fpubh.2014.00165.

SANTOS, D. M., et al. Chemotherapeutic Potential of 17-AAG against Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 8, 2014a. doi:10.1371/journal.pntd.0003275.

SANTOS, D. M. Chemotherapeutic Potential of 17-AAG against Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 8, 2014b. doi:10.1371/journal.pntd.0003275.

SANTOS, D. O. et al. Leishmaniasis treatment - A challenge that remains: A review. **Parasitol. Res.** 103, 1–10, 2008. doi:10.1007/s00436-008-0943-2.

SAUSVILLE, E. A. Geldanamycin analogs. **J. Chemother.** 16, 68–69, 2004. doi:10.1179/joc.2004.16.supplement-1.68.

SCHLUSSELHUBER, M. et al. . The equine antimicrobial peptide eCATH1 is effective against the facultative intracellular pathogen *rhodococcus equi* in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4615–4621, 2013. doi:10.1128/AAC.02044-12.

SCHMIDT-OTT, R. et al. Topical treatment with hexadecylphosphocholine (Miltexi®) efficiently reduces parasite burden in experimental cutaneous leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 93, 85–90, 1999. doi:10.1016/S0035-9203(99)90192-X.

Schopf, F. H., Biebl, M. M., and BUCHNER, J. The HSP90 chaperone machinery. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 18, 345–360, 2017. doi:10.1038/nrm.2017.20.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. (2017). Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. *Int. J. Mol. Sci.* 18. doi:10.3390/ijms18061296.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nat. Rev. Immunol.** 16, 581–592, 2016. doi:10.1038/nri.2016.72.

SEIFERT, K. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. **Open Med. Chem**, 2011. J. 5, 31–39. doi:10.2174/1874104501105010031.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.** 50, 73–79, 2006. doi:10.1128/AAC.50.1.73-79.2006.

SENAPATI, S. et al. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduct. Target. Ther.* 3, 1–19, 2018. doi:10.1038/s41392-017-0004-3.

SERRANO, D. R. et al. . **Oral particle uptake and organ targeting drives the activity of amphotericin b nanoparticles**, 2015. doi:10.1021/mp500527x.

Shahcheraghi, S. Application of Nano Drugs in Treatment of Leishmaniasis. *Glob. J. Infect. Dis. Clin. Res.* 2, 018–020, 2016. doi:10.17352/2455-5363.000009.

SHANG, L.; NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G. U. Engineered nanoparticles interacting with cells: Size matters. *J. Nanobiotechnology* 12, 1–11, 2014. doi:10.1186/1477-3155-12-5.

Sharma, S. et al. . Development of a novel chitosan based biocompatible and self-healing hydrogel for controlled release of hydrophilic drug. **Int. J. Biol. Macromol.** 116, 37–44, 2018. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.020.

Shenoda, Y et al. “The Cone of Shame”: Welfare Implications of Elizabethan Collar Use on Dogs and Cats as Reported by their Owners. **Animals** 10, 2020. doi:10.3390/ani10020333.

SHIMP, S. K. et al. HSP90 inhibition by 17-DMAG reduces inflammation in J774 macrophages through suppression of Akt and nuclear factor-kappa;B patHWA ys. **Inflamm. Res.** 61, 521–533, 2012. doi:10.1007/s00011-012-0442-x.

SIDERA, K.; PATSAVOUDI, E. HSP90 Inhibitors: Current Development and Potential in Cancer Therapy. **Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.** 9, 1–20, 2013. doi:10.2174/15748928113089990031.

SINDERMANN, H. et al. Miltefosine (Impavido): The first oral treatment against leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol.* 193, 173–180, 2004. doi:10.1007/s00430-003-0201-2.

SINGH, A. P., BISWAS, A., SHUKLA, A., MAITI, P. Targeted therapy in chronic diseases using nanomaterial-based drug delivery vehicles. **Signal Transduct. Target. Ther.** 4, 1–21, 2019. doi:10.1038/s41392-019-0068-3.

SOLIT, D. B.; CHIOSIS, G. et al. Development and application of Hsp90 inhibitors. **Drug Discov. Today** 13, 38–43, 2008. doi:10.1016/j.drudis.2007.10.007.

SOSA, L. et al. Polyene macrolide antibiotic nanoemulsion: a proposal for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Bionatura** 7, 2022. doi:10.21931/RB/2022.07.04.62.

SRIVASTAVA , S.; SHANKAR, P.; MISHRA, J.; SINGH , S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites and Vectors** 9, 2016. doi:10.1186/s13071-016-1553-y.

STAPLETON, S.; LEE, F. Hot topics: antimicrobial resistance. *DVM360* 52, 2021.

Stenberg, V. Y. et al. Evaluation of the psma-binding ligand212pb-ng001 in multicellular tumour spheroid and mouse models of prostate cancer. **Int. J. Mol. Sci.** 22, 2021. doi:10.3390/ijms22094815.

SUNDAR , S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Trop. Med. Int. Heal.** 6, 849-854, 2002. doi:doi:10.1046/j.1365-3156.2001.00778.x.

SUNDAR , S.; CHAKRAVARTY, J. Comment on: Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opin. Pharmacother.** 14, 53–63, 2013. doi:10.1517/14656566.2013.755515.

SUNDAR , S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opin. Pharmacother.** 16, 237–252, 2015. doi:10.1517/14656566.2015.973850.

SUNDAR , S. Amphotericin B Treatment for Indian Visceral Leishmaniasis: Conventional versus Lipid Formulations. **Clin. Infect. Dis.** 38, 377–383, 2004. doi:10.1086/380971.

SUNDAR , S. et al. New treatment approach in indian visceral leishmaniasis : single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine. 47, 2011. doi:10.1086/591972.

SUNDAR , S.; SINGH , A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments. **Parasitology**, 145, 481–489, 2018. doi:10.1017/S0031182017002116.

SUNDAR , S. et al. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: An open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. **Lancet**, 377, 477–486, 2008. doi:10.1016/S0140-6736(10)62050-8.

Taldone, T. et al.. Experimental and structural testing module to analyze paralogue-specificity and affinity in the Hsp90 inhibitors series. **J. Med. Chem.** 56, 6803–6818, 2013. doi:10.1021/jm400619b.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research** 6, 750, 2017. doi:https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1.

TUKAJ, S., GRZEGORZ, W. **Anti-Hsp90 therapy in autoimmune and inflammatory diseases**: a review of preclinical studies. 213–218, 2016. doi:10.1007/s12192-016-0670-z.

Tukaj, S. et al. Immunomodulatory effects of heat shock protein 90 inhibition on humoral immune responses. 585–590, 2014. doi:10.1111/exd.12476.

UDDIN, M. A. et al. Medicine in drug discovery effects of heat shock protein 90 inhibition in the Lungs. **Med. Drug Discov.** 6, 100046, 2020. doi:10.1016/j.medidd.2020.100046.

UNGER, A. et al. Association of Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis Prior to Ulcer Development with High Rate of Failure in Northeastern Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, 80, 574–579, 2009.

UTREJA, P., Verma, S., Rahman, M., and Kumar, L. Use of Nanoparticles in Medicine. **Curr. Biochem. Eng.** 6, 7–24, 2020. doi:10.2174/2212711906666190724145101.

VALE, I. V. et al. (2019). Oral pentamidine-loaded poly (d , l-lactic-co- glycolic) acid nanoparticles : an alternative approach for leishmaniasis treatment. *Nanotechnology* 30.

VAN BOCXLAER, K. et al. Drug permeation and barrier damage in Leishmania-infected mouse skin. **J. Antimicrob. Chemother.** 71, 1578–1585, 2016a. doi:10.1093/jac/dkw012.

VAN BOCXLAER, K. et al. Drug permeation and barrier damage in Leishmania-infected mouse skin. **J. Antimicrob. Chemother.** 71, 1578–1585, 2016b. doi:10.1093/jac/dkw012.

VAN GRIENSVEN, J. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.** 10, 184–194, 2010). doi:10.1016/S1473-3099(10)70011-6.

VAN HEES, S. et al. Improving cellular uptake and cytotoxicity of chitosan-coated poly(lactic-co -glycolic acid) nanoparticles in macrophages. **Nanomedicine** 15, 2671–2688, 2020. doi:10.2217/nmm-2020-0317.

VARIKUTI, S., et al. Topical treatment with nanoliposomal Amphotericin B reduces early lesion growth but fails to induce cure in an experimental model of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana*. **Acta Trop.** 173, 102–108, 2017. doi:10.1016/j.actatropica.2017.06.004.

VERAS, P. S. T.; DE MENEZES, J. P. B. Using proteomics to understand how *Leishmania* parasites survive inside the host and establish infection. **Int. J. Mol. Sci.** 17, 2016. doi:10.3390/ijms17081270.

WANG, Y.; MCALPINE, S. R. N-terminal and C-terminal modulation of Hsp90 produce dissimilar phenotypes. *Chem. Commun.* 51, 1410–1413, 2015. doi:10.1039/c4cc07284g.

WEGELE, H., AND BUCHNER, J. Hsp70 and Hsp90: relay team for protein folding. 1–44, 2004. doi:10.1007/s10254-003-0021-1.

WELSS, T; BASKETTER, D. A.; SCHRÖDER, K. R. In vitro skin irritation: Facts and future. State of the art review of mechanisms and models. **Toxicol. Vitr.** 18, 231–243, 2004. doi:10.1016/j.tiv.2003.09.009.

WHITESELL, L., LIN, N. U. HSP90 as a platform for the assembly of more effective cancer chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823, 756–766, (2012a). doi:10.1016/j.bbamcr.2011.12.006.

WHITESELL, L.; LIN, N. U. HSP90 as a platform for the assembly of more effective cancer chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823, 756–766, 2012b. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.12.006.

WHO. **Leishmaniasis**, 2020. https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1

WHO. **Weekly epidemiological record**. n. 32, 2023. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/372268/WER9832-eng-fre.pdf>

WIESGIGL, M.; CLOS, J.; SCHEKMAN, R. W. Heat Shock Protein 90 Homeostasis Controls Stage Differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol. Biol. Cell* 12, 3307–3316, 2001. doi:10.1091/mbc.12.11.3307.

WOLFRAM, J. et al. Safety of Nanoparticles in Medicine. **Curr. Drug Targets** 16, 1671–1681, 2015. doi:10.2174/1389450115666140804124808.

WYLLIE, S. et al. The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. *Sci. Transl. Med.* 4, 1–7, 2012. doi:10.1126/scitranslmed.3003326.

XIAO, L.; LU, X.; M. RUDEN, D. Effectiveness of Hsp90 Inhibitors as Anti-Cancer Drugs. *Mini-Reviews Med. Chem.* 6, 1137–1143, 2006. doi:10.2174/138955706778560166.

YILDIRIMER, L. et al. Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles. **Nano Today** 6, 585–607, 2011. doi:10.1016/j.nantod.2011.10.001.

ZHANG, L. et al. Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83, 761–769, 2008. doi:10.1038/sj.clpt.6100400.

ZHANG, S., LI, J., LYKOTRAFITIS, G., BAO, G., AND SURESH, S. Size-dependent endocytosis of nanoparticles. *Adv. Mater.* 2009. doi:10.1002/adma.200801393.

ZHANG, X.; ZHANG, P. Polymersomes in Nanomedicine: a review. **Curr. Nanosci.** 13, 124–129. doi:10.2174/1573413712666161018144519.

ZHAO, R., AND HOURY, W. A. Hsp90: A chaperone for protein folding and gene regulation. **Biochem. Cell Biol.** 83, 703–710, 2005. doi:10.1139/o05-158.

ZIJLSTRA, E. E. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.** 3, 87–98, 2003. doi:10.1016/S1473-3099(03)00517-6.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of leishmania parasites. *Annu. Rev. Microbiol* 48, 449–70, 1994.

ZISMANOV, V.; DRUCKER, L.; GOTTFRIED, M. **Combined inhibition of Hsp90 and the proteasome affects NSCLC proteostasis and attenuates cell migration.** 998–1006. doi:10.1097/CAD.000000000000140.