



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PÍAUÍ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
*Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga*  
*Cep: 64049-550- Teresina-PI-Brasil-Fone (86) 3215-5753*

ANFOTERICINA B CONVENCIONAL ASSOCIADA AO ÁCIDO GÁLICO E AO  
ÁCIDO ELÁGICO EM FORMULAÇÃO TÓPICA PARA TERAPIA  
ANTILEISHMANIA

MICHEL MUÁLEM DE MORAES ALVES

TERESINA-PI  
2019

MICHEL MUÁLEM DE MORAES ALVES

ANFOTERICINA B CONVENCIONAL ASSOCIADA AO ÁCIDO GÁLICO E AO  
ÁCIDO ELÁGICO EM FORMULAÇÃO TÓPICA PARA TERAPIA  
ANTILEISHMANIA

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Ciência  
Animal do Centro de Ciências Agrárias da  
Universidade Federal do Piauí, em exame  
de defesa e obtenção do título de DOUTOR  
EM CIÊNCIA ANIMAL

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça  
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho

TERESINA-PI  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**A474a** Alves, Michel Muálem de Moraes

Anfotericina B convencional associada ao ácido gálico e ao ácido elágico em formulação tópica para terapia antileishmania / Michel Muálem de Moraes Alves - 2019.

101 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Teresina, 2019.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivete Lopes de Mendonça.

1. Farmacologia - Veterinária 2. Produtos naturais 3. Compostos fenólicos 3. Ativação de macrófagos 4. Associação de fármacos 5. Formulação tópica 6. Polaxamer I. Título.

**CDD 636.089 51**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DA DEFESA DE TESE APRESENTADA POR  
MICHEL MUÁLEM DE MORAES ALVES

Aos dezoito dias do mês de março do ano de dois mil e dezenove, às 14:30 horas, no Auditório do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-Tronco – NUPCelt, da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, Teresina-PI, a Banca Examinadora infranomeada procedeu ao julgamento da defesa da tese intitulada “**Anfotericina B convencional associada ao ácido gálico e ao ácido elágico em formulação tópica para terapia antileishmania**”, apresentada pelo doutorando MICHEL MUÁLEM DE MORAES ALVES, da Área de Saúde e Reprodução Animal, do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, desta Universidade. A Presidente da Banca Examinadora, Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça, iniciando os trabalhos concedeu a palavra ao candidato MICHEL MUÁLEM DE MORAES ALVES para uma breve exposição do seu trabalho. Em seguida, a Sra. Presidente concedeu a palavra, pela ordem e sucessivamente aos examinadores, os quais passaram a arguir o candidato durante o prazo máximo de 30 (trinta) minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ulтимado a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando-o APROVADO.

A / NAp

Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI	(X) ( )
Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo (Interno) / DBF/CCS/UFPI	(X) ( )
Profa. Dra. Flavia Raquel Fernandes do Nascimento (Externa) / UFMA	(X) ( )
Profa. Dra. Sabrina Maria Portela Carneiro (Interna) / CFT/CCS/UFPI	(X) ( )
Profa. Dra. Maria Das Graças Prianti (Externa) / CET	(X) ( )

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato MICHEL MUÁLEM DE MORAES ALVES APROVADO. Nada mais havendo a tratar eu, Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme, foi por todos assinada.

Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça ..... *Ivete Lopes de Mendonça*  
Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo ..... *Daniel Dias Rufino Arcanjo*  
Profa. Dra. Flavia Raquel Fernandes do Nascimento ..... *Flavia Raquel Fernandes do Nascimento*  
Profa. Dra. Sabrina Maria Portela Carneiro ..... *Sabrina Maria Portela Carneiro*  
Profa. Dra. Maria Das Graças Prianti ..... *Ma Prianti*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, por me amar primeiro, pelo zelo e cuidado, por suas infinitas promessas. Pela sua graça, favor que eu não mereço e misericórdia que se renova a cada manhã.*

*À minha amada esposa Gabriela Muálem, por ser meu catalizador me impulsionando cada vez mais alto, onde os meus sonhos se tornam realidade, obrigado pela sua compreensão incondicional e por sonhar junto comigo a carreira que escolhi. Obrigado meu amor, você além de minha esposa, também é minha melhor amiga. Te amo!*

*Aos meus amados pais Gilvan Barbosa e Nadja Muálem, por seus ensinamentos de insistência, determinação e perseverança, por toda educação e amor. Vocês são um dos principais motivos de eu ter chegado até aqui e de já planejar os próximos passos. Tenho orgulho de ser filho de vocês. A toda minha família, em especial minha querida vovozinha Dona Benedita Muálem, uma verdadeira baluarte. Aos meus irmãos Deyvid e Marina e também aos meus sogros Gilberto Silveira e Liane Tajra.*

*À Universidade Federal do Piauí, ao programa de Pós-graduação em Ciência animal e ao Núcleo de Pesquisas em Plantas medicinais, pela oportunidade de qualificação. À CAPES e FAPPEPI pelo apoio financeiro dessa pesquisa.*

*A minha orientadora, Professora Ivete Lopes de Mendonça pois há muito, enxergou em mim o potencial pesquisador e mestre, obrigado professora, sempre busco colocar em prática tudo que aprendi com a senhora e pode ter certeza que a senhora foi parte importante desta edificação.*

*Aos professores Juan Carlos Ramos Gonçalves, André Luiz Menezes, Mariana Chaves e Márcia Rizzo pelo carinho, atenção e colaboração. O favor de vocês foi imprescindível para a execução deste estudo, obrigado por toda a contribuição científica e intelectual de vocês.*

*Ao meu grande amigo professor Daniel Dias Rufino Arcanjo, por onde eu vou digo que você foi um irmão que a UFPI me deu. Obrigado amigo, por todos os momentos de conversas edificadoras que tivemos em meio aos inúmeros pedaços de bolo de goma e cafezinhos, obrigado por toda a ajuda, conselhos e incentivos. Você*

*é um grande amigo e sua amizade de mui valor pra mim. Amo você e sua família!*

*À todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por todo conhecimento adquirido ao longo dessa qualificação.*

*Aos meus queridos amigos, companheiros de jugo e de laboratório: Layane Amorim, Rodolfo Ritchelly, Ingredy Lopes, Rita de Cássia, Enoque Sobrinho, Lucas Vidal, Valéria Sousa, Laís Pinheiro. Vocês foram demais, uma equipe na qual tenho orgulho e satisfação de fazer parte e caminhar junto com vocês. Obrigado por toda ajuda, cuidado e zelo com os experimentos, manejo e bem-estar dos animais. Com vocês me sinto seguro.*

*Aos meus amigos Kayo Alves, Jessica Freire, Felipe Viana, Elviline Coelho e Gláucia Lopes. Muito obrigado por toda ajuda e organização nota 10! Desde a escolha e preparo das formulações até o end point vocês mantiveram o ritmo junto comigo.*

*A Dra Adeline Carvalho, ao Seu Carlos, Dona Kaline e Dona Rolsilda por toda dedicação aos animais do Biotério.*

*Agradeço a todos que sonham junto comigo e que torcem e me motivam com alegria a seguir e abraçar essa carreira que escolhi.*

## *AGRADECIMENTO ESPECIAL*

*Reservo este singelo espaço para agradecer a uma pessoa muito especial: Professor Fernando Aécio de Amorim Carvalho.*

*Professor e amigo, difícil achar meios que possam transformar o sentimento de gratidão em meu coração em palavras expressivas. Nossa caminhada já é de 4 anos, tenho muita alegria de dizer que foram os 4 anos mais íntensos, proveitosos, descontraídos e produtivos desse percurso. Meu desejo é que isso possa se perpetuar por muitos e longos anos vindouros. Você é um profissional respeitado e íntegro. De tudo, o que mais admiro é o potencial em replicar e gerar nos seus alunos suas características, isto é algo que absorvi e que também transmitirei aos meus alunos, se assim Deus permitir.*

*Um grande e afetuoso abraço a você e toda sua família.  
Deus te abençoe!*

*Lutem e lutem novamente, até cordeiros virarem leões.*

*Robin Wood*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE FIGURAS

#### Revisão de Literatura

<b>Figura 1</b>	Distribuição geográfica da Leishmaniose Tegumentar	26
<b>Figura 2</b>	Formas digenéticas da <i>Leishmania major</i> .	27
<b>Figura 3</b>	Ciclo biológico de parasitos do Gênero <i>Leishmania</i> .	28
<b>Figura 4</b>	Estruturas químicas de fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses	31
<b>Figura 5</b>	Estrutura química do Polaxamer	38

#### Capítulo 1

<b>Figura 1</b>	Resposta imune à infecção por leishmania	44
<b>Figura 2</b>	Fagocitose de partículas de zimozan por macrófagos submetidos à tratamento por drogas teste.	46
<b>Figura 3</b>	Macrófago sem estímulo por drogas que o ativam (A) e espraído (B) após o estímulo de prospecção com drogas derivadas de produtos naturais	47
<b>Figura 4</b>	Atividade lisossomal de macrófagos submetidos à tratamento por drogas test	48
<b>Figura 5</b>	Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos tratados com drogas teste	49
<b>Figura 6</b>	Quantificação de cálcio intracelular em macrófagos submetidos a estímulos por drogas teste.	51

#### Capítulo 2

<b>Figura 1</b>	Esquema metodológico desse estudo.	64
<b>Figura 2</b>	Perfil de liberação <i>in vitro</i> de gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.	70
<b>Figura 3</b>	Avaliação clínica dos BALB/c infectados por <i>L. major</i> e tratados com géis tópicos.	71
<b>Figura 4</b>	Número em escala Log <sub>10</sub> de parasitas recuperados na lesão leishmaniotica por <i>L. major</i>	72
<b>Figura 5</b>	Macrófagos observados através de imprinting da lesão leishmaniótica em camundongos BALB/c tratados com gel de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.	73
<b>Figura 6</b>	Fotomicrografias de lesão cutânea leishmaniótica causada por <i>L. major</i> em camundongos BALB/c após tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.	75
<b>Figura 7</b>	Ativação da capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais murinos retirados de camundongos BALB/c após tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.	76
<b>Figura 8</b>	Ativação da atividade lisossomal de macrófagos peritoneais murinos retirados de camundongos BALB/c após tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.	77

<b>Figura 9</b>	Ativação da síntese de óxido nítrico pela concentração de nitrito, de macrófagos peritoneais murinos retirados de camundongos BALB/c após tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.	78
<b>Figura 10</b>	Quantificação de cálcio intracelular pela marcação com FLUO-3-AM, de macrófagos peritoneais murinos retirados de camundongos BALB/c após tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE, observados em microscopia confocal.	79
<b>Figura 11</b>	Quantificação de cálcio intracelular pela marcação com FLUO-3-AM, de macrófagos peritoneais murinos retirados de camundongos BALB/c após tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.	79
<b>Figura 12</b>	Percentual de macrófagos peritoneais murinos infectados por formas promastigotas de <i>L. major in vitro</i> , de camundongos BALB/c tratados com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE	80
<b>Figura 13</b>	Amastigotas internalizadas em macrófagos peritoneais murinos infectados e tratados com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE Anf B + AE.	81

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

### Revisão de Literatura

<b>Quadro 1.</b>	Forma de apresentação da doença e espécies relacionadas	27
<b>Capítulo 1</b>	.	
<b>Tabela 01:</b>	Substâncias que ativam macrófagos em suas respectivas atividades.	52
<b>Capítulo 2</b>		
<b>Tabela 1</b>	Avaliação da estabilidade preliminar de gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.	69
<b>Tabela 2</b>	Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> do tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE em camundongos BALB/c infectados experimentalmente por <i>L. major</i>	82

## LISTA DE ABREVIações

<b>AG</b>	Ácido gálico
<b>AE</b>	Ácido elágico
<b>Anf B</b>	Anfotericina B
<b>APC</b>	Célula apresentadora de antígeno
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>BOD</b>	Demanda bioquímica de oxigênio
<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CEEA</b>	Comitê de Ética em Experimentação Animal
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>IL-12</b>	Interleucina-12
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzida
<b>LCD</b>	Leishmaniose cutânea difusa
<b>LCL</b>	Leishmaniose cutânea localizada.
<b>LD</b>	Leishmaniose cutânea disseminada
<b>LMC</b>	Leishmaniose mucocutânea
<b>LPS</b>	Lipopolissacarideo
<b>LT</b>	Leishmaniose tegumentar
<b>LTA</b>	Leishmaniose tegumentar americana
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>MHC</b>	Complexo de histocompatibilidade
<b>MTT</b>	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NPPM</b>	Nucleo de Pesquisas em plantas Medicinais.
<b>PBS</b>	“Phosphate buffered saline”- Salina tamponada com fosfato
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>PK<math>\zeta</math></b>	Proteína quinase zeta.
<b>PMCA4</b>	Plasma membrane Ca <sup>2+</sup> ATPase
<b>SERCA 3</b>	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase <b>3</b>
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde

<b>Th1</b>	Linfócito T auxiliar 1
<b>Th2</b>	Linfócito T auxiliar 2
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	“Tumor necrosis factors” - Fator de necrose tumoral alfa
<b>UFPI</b>	Universidade Federal do Piauí
<b>WHO/OMS</b>	“World Health Organization” - Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	16
<b>ABSTRACT</b> .....	18
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>1.1 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO DE TESE</b> .....	22
<b>1.2 OBJETIVOS</b> .....	24
<b>Geral</b> .....	24
<b>Específicos</b> .....	24
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	25
<b>2.1 Leishmanioses</b> .....	25
<b>2.1.1 Epidemiologia</b> .....	25
<b>2.1.2 Agente Etiológico</b> .....	26
<b>2.1.3 Ciclo biológico</b> .....	28
<b>2.1.4 Resposta imune à infecção por leishmania</b> .....	29
<b>2.1.5 Tratamento das leishmanioses</b> .....	30
<b>2.2 Plantas medicinais e produtos naturais: fonte potencial para terapêutica</b> .....	33
<b>2.2.1 Taninos</b> .....	35
<b>2.3 Formulação tópica de Gel de Polaxamer 407®</b> .....	37
<b>2.4 Associação de drogas</b> .....	38
<b>CAPÍTULO 01:</b> .....	40
<b>Ativação de macrófagos e modulação da resposta imunológica na prospecção de novas drogas antileishmania</b> .....	40
<b>Ativação de macrófagos e modulação da resposta imune na prospecção de novas drogas antileishmania</b> .....	41
<b>RESUMO</b> .....	41
<b>ABSTRACT</b> .....	42
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	43
<b>2. ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS</b> .....	45
<b>2.1 Obtenção de macrófagos</b> .....	45
<b>2.2 Preparo de soluções</b> .....	45
<b>2.3 Avaliação da capacidade fagocítica</b> .....	45
<b>2.4 Avaliação da atividade lisossomal</b> .....	47
<b>2.5 Avaliação da produção de nitrito</b> .....	48

<b>2.6 Quantificação do cálcio intracelular em macrófagos</b> .....	<b>50</b>
3. Drogas com potencial ativador de macrófagos .....	52
4. CONCLUSÃO.....	53
5. Referências .....	54
<b>CAPÍTULO 02:</b> .....	<b>57</b>
<b>Ácido gálico e ácido elágico: Promissores adjuvantes a Anfotericina B convencional para o tratamento da leishmaniose</b> .....	<b>57</b>
<b>Ácido gálico e ácido elágico: Promissores adjuvantes a Anfotericina B convencional para o tratamento da leishmaniose</b> .....	<b>58</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>58</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>59</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>61</b>
<b>Substâncias utilizadas</b> .....	<b>61</b>
<b>Preparo e estabilidade preliminar de gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, .....</b>	<b>AE e Anf B + AE</b>
.....	<b>61</b>
<b>Cinética de liberação in vitro de gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e .....</b>	<b>Anf B + AE</b>
.....	<b>62</b>
<b>Parasitas e animais</b> .....	<b>62</b>
<b>Infecção dos camundongos BALB/c por L. major e tratamento com os géis tópicos</b> .....	<b>63</b>
<b>Avaliação clínica dos camundongos BALB/c infectados por L. major e tratados com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE ...</b>	<b>64</b>
<b>Avaliação da carga parasitária</b> .....	<b>64</b>
<b>Análise histopatológica</b> .....	<b>65</b>
<b>Avaliação dos parâmetros de ativação de macrófagos</b> .....	<b>65</b>
Preparo de soluções .....	65
Determinação da capacidade fagocítica .....	65
Avaliação da atividade lisossomal .....	66
Quantificação de nitrito .....	66
Quantificação de cálcio citosólico .....	67
<b>Avaliação da porcentagem de macrófagos infectados por formas promastigotas de L. major e índice de sobrevivência de amastigotas internalizadas em macrófagos oriundos de camundongos BALB/c normais e tratados com os géis tópicos</b> .....	<b>67</b>

<b>Avaliação da toxicidade in vivo do tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE em camundongos BALB/c infectados experimentalmente por L. major.....</b>	<b>68</b>
Hematócrito .....	68
<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>68</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
<b>Preparo e estabilidade preliminar de gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE .....</b>	<b>68</b>
<b>Perfis de liberação in vitro de gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE .....</b>	<b>69</b>
<b>Atividade antileishmania de gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE .....</b>	<b>70</b>
<b>Análise histopatológica de amostras de lesão cutânea leishmaniótica causada por L. major de camundongos BALB/c tratados com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE .....</b>	<b>74</b>
<b>Ativação de macrófagos em ensaios ex vivo de camundongos BALB/c infectados por L. major e tratados com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE .....</b>	<b>76</b>
Ativação da Capacidade Fagocítica .....	76
Ativação da Atividade Lisossomal .....	76
Ativação da Síntese de Óxido Nítrico .....	77
Quantificação de cálcio intracelular .....	78
<b>Avaliação de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados por formas promastigotas de L. major in vitro, tratados com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.....</b>	<b>80</b>
<b>Avaliação da toxicidade in vivo do tratamento com Gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE em camundongos BALB/c infectados experimentalmente por L. major.....</b>	<b>81</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>87</b>
<b>Referências .....</b>	<b>89</b>
<b>Referências Bibliográficas gerais.....</b>	<b>93</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>101</b>

## RESUMO

As leishmanioses são zoonoses parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes ao grupo de doenças tropicais negligenciadas. São de difícil controle, não há vacina eficaz e o seu tratamento é baseado em um número limitado de drogas que apresentam uma gama de efeitos indesejáveis, além de já existirem relatos de resistência à essas drogas. O desenvolvimento de novos medicamentos demanda tempo e grandes investimentos financeiros e, tendo em vista essa limitação, a associação farmacológica de fármacos convencionais e a introdução de novas moléculas e tecnologias no desenvolvimento de novas formulações tem despertado interesse de pesquisadores. Neste estudo, demonstramos o efeito de associação da anfotericina B (Anf B) convencional e ácido gálico (AG) ou ácido elágico (AE) em formulação tópica de Gel de Polaxamer 407®. O AG e o AE são dois imunomoduladores naturais anteriormente estudados por nosso grupo e já reportamos sua ação antileishmania e potencial em modular a resposta imune. Foram realizados testes de estabilidade preliminar e de liberação *in vitro* dos fármacos nas formulações de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE na composição e tratamento *in vivo* de camundongos BALB/c infectados por *L. major*. Passados 40 dias da infecção, os animais foram divididos em 6 grupos, tratados 2x/dia, durante 21 dias com os géis de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE e o grupo controle negativo tratado com o veículo (polaxamer 407®). Os animais foram avaliados clinicamente mensurando-se o tamanho das lesões 1x/semana. Ao termino do tratamento e 14 dias após, os animais foram eutanasiados para avaliação *ex vivo* quanto à redução da carga parasitária no local da lesão e ativação de resposta imune celular, por meio da retirada de macrófagos peritoneais para avaliar sua ativação por capacidade fagocítica, atividade lisossomal, quantificação de nitrito e cálcio intracelular. Também foi realizado a infecção *in vitro* dos macrófagos peritoneais dos animais tratados com as formulações para avaliar o índice de sobrevivência de amastigotas internalizadas e o percentual de macrófagos infectados. Todas as formulações apresentaram-se estáveis no tempo T0 nos testes preliminares, sendo a formulação de AG a que houve maior liberação *in vitro*, seguido de AE e das formulações combinadas de Anf B + AG e de Anf B + AE. Houve efeito da associação entre Anf B e AG e Anf B e AE em todos os ensaios realizados. Nos

animais que receberam tratamento houve redução do tamanho da lesão e redução da carga parasitária. O tratamento com as formulações contendo AG e AE foram capazes de ativar macrófagos em todos os parâmetros avaliados, bem como reduziram a quantidade de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófago, indicando, portanto, ação terapêutica e ativação da resposta imune, levando a cura e proteção. O AG e AE produziram efeito de associação com a Anf B, o que torna promissor no tratamento da leishmaniose.

**Palavras-chave:** Produtos naturais, compostos fenólicos, ativação de macrófagos, associação de fármacos, formulação tópica, Polaxamer.

## **ABSTRACT**

Leishmaniasis are parasitic zoonoses caused by protozoa of the genus *Leishmania* belonging to the group of neglected tropical diseases. It is difficult to control, there is no effective vaccine and its treatment is based on a limited number of drugs that have a range of undesirable effects, and there are already reports of resistance to these drugs. The development of new drugs requires time and large financial investments, in view of this limitation, the pharmacological association of conventional drugs and the introduction of new molecules and technologies in the development of new formulations has aroused interest of researchers. In this study we demonstrated the synergistic effect of the combination of conventional amphotericin B (Anf B) and natural molecules, gallic acid (GA) and ellagic acid (EA) in topical formulation of Polaxamer 407® Gel. GA and AE are two natural immunomodulators previously studied by our group and have already reported their antileishmania action and potential in modulating the immune response. Preliminary stability tests and in vitro release of the drugs were formulated in the formulations of Anf B, GA, Anf B + GA, EA and Anf B + EA in the composition and in vivo treatment of *L. major* infected BALB/c mice. After 40 days of infection, the animals were divided into 6 groups, treated 2x/day for 21 days with the gels of Anf B, GA, Anf B + GA, EA and Anf B + EA and the negative control group treated with vehicle (polaxamer 407®). The animals were evaluated clinically by measuring the lesion size 1x/week. At the end of the treatment and 14 days later, the animals were euthanized for evaluation of the ex vivo assays for the reduction of the parasite load at the lesion site and activation of the cellular immune response, by the removal of peritoneal macrophages to evaluate its activation by phagocytic capacity, lysosomal activity, quantification of nitrite and intracellular calcium. In vitro infection of the peritoneal macrophages was also performed to evaluate the survival rate of internalized amastigotes and the percentage of infected macrophages. All formulations were stable at time T0 in the preliminary tests, the GA formulation being the most liberated in vitro, followed by AE and the combined formulations of Anf B + GA and Anf B + EA. There was synergism between Anf B and GA and Anf B and EA in all the tests performed. In the animals that received treatment there was reduction of the size of the lesion and reduction of the parasitic load. The formulations containing GA and EA activated macrophages in all evaluated parameters, as well as reduced the

amount of infected macrophages and the number of amastigotes by macrophage, indicating, therefore, therapeutic action and activation of the immune response, leading to healing and protection. GA and EA produced a synergistic effect with Anf B, which makes this association promising in the treatment of leishmaniasis.

**Key words:** Natural products, phenolic compounds, macrophage activation, drug combination, topical formulation, Polaxamer.

## 1 INTRODUÇÃO

Infecções por protozoários são um problema de saúde pública mundial, especialmente em países subdesenvolvidos, onde aproximadamente 14% da população encontra-se sob risco de serem infectadas (KONDRASHIN et al., 2011; WALDRON et al., 2011). Nesse contexto, as leishmanioses, protozooses causadas por mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das seis principais doenças infecciosas com alta incidência e capacidade de produzir deformidades, afetando mais de 12 milhões de pessoas, sendo 1,5 milhões de novos casos anualmente notificados em todo o mundo (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010). Dentre as formas de manifestações clínicas dessa doença (cutânea, mucocutânea e visceral), a forma cutânea é a mais disseminada e é responsável por causar deformidades físicas nos pacientes, sendo a *Leishmania major* a espécie mais antiga e responsável pelo maior número de casos dessa manifestação no velho mundo, é endêmica na África, norte do Saara, península arábica e parte das Américas (AKHLAGH et al., 2019; KAYE; SCOTT, 2011; MITROPOULOS et al., 2010; NOZAIS, 2003; REITHINGER et al., 2007). A infecção se dá por meio do repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos, que vivem em áreas florestais, cavernas, tocas de roedores e também em área peridomiciliar (REITHINGER; COLEMAN, 2007; REITHINGER et al., 2007).

O parasita é digenético e apresenta duas morfologias distintas: uma forma flagelada, a promastigota, infectante e presente no inseto vetor e outra forma com flagelo não aparente, a amastigota, que está presente no hospedeiro vertebrado. Neste, o parasita alberga e se multiplica no interior hostil de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado, atuando através de mecanismos evasivos de imunossilenciamento, tais como: redução da síntese de iNOS (Óxido Nítrico Sintase induzida) e direcionando o sistema imune a desencadear uma resposta imune celular do tipo Th2, induzindo a célula a expressar interleucinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, por exemplo) que resultam em aumento da carga parasitária. Por outro lado, quando há ocorrência de resposta imune celular do tipo Th1, com alta expressão de interferon gama (INF- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), esta, por sua vez, confere cura ou proteção (MONTALVO et al., 2012; ISLAMUDDIN et al., 2015). Roy e colaboradores (2014) ainda descrevem um novo mecanismo de evasão relacionado ao cálcio intracelular. Quanto este está presente, ocorre a ativação da proteína quinase c (PKC)

clássica que é responsável pela sinalização de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  para ativar resposta Th1. A presença do parasita nas células hospedeiras favorece a diminuição de cálcio intracelular. Uma vez isto ocorrendo, outra via de sinalização é ativada, sendo esta a via atípica da PKC- $\zeta$ , sendo responsável pela sinalização de IL-4 e IL-10 para ativar a resposta Th2.

Os tratamentos convencionais para as leishmanioses são onerosos, limitados, pouco seguros e possuem uma gama de efeitos adversos, além de contribuírem para a resistência do parasita o que retarda o tratamento. A anfotericina B, por exemplo, é utilizada mundialmente como principal fármaco no tratamento da doença, porém possui grandes efeitos colaterais, como cardiotoxicidade e nefrotoxicidade, além de seu elevado custo. (ALIZADEH et al., 2008; ASHFORD, 2000). Como alternativa, produtos naturais derivados de plantas têm sido promissores na atividade antileishmania. Além de demonstrarem potencial citotóxico sobre o parasita, são capazes de agir em sinergismo com o sistema imune do hospedeiro por meio da ativação de macrófagos. (ALVES et al., 2017; CARNEIRO et al., 2012; DE CASTRO OLIVEIRA et al., 2017; DE MEDEIROS et al., 2011; ISLAMUDDIN et al., 2015; RODRIGUES et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015; SOUZA et al., 2017).

Neste contexto os taninos são classificados como polifenóis derivadas do metabolismo secundário das plantas, solúveis em água, quimicamente reativos inter e intra-moleculares por pontes de hidrogênio, sendo a maior parte derivada do metabolismo da glicose por diferentes reações bioquímicas, que consistem na via do ácido chiquímico ou do acetato (DE JESUS et al., 2012). Dentre alguns compostos fenólicos importantes encontram-se o ácido gálico e seus dímeros (ácido digálico ou hexaidroxidifênico) e ácido elágico, sendo caracterizados como lactonas fenólicas de ocorrência natural encontradas em algumas plantas, dentre elas: *Anacardium occidentale* L., *Myracrodruon urundeuva* Allemão, *Anogeissus leiocarpus* (DC.) Guill. & Perr., *Quercus infectoria* Olivier, *Stryphnodendron obovatum* Benth., por exemplo, na forma de taninos hidrolisáveis chamados elagitaninos (KHEIRANDISH et al., 2016; MURAKAMI et al., 1991; RIBEIRO et al., 2015; SHUAIBU et al., 2008; VATTEM; GHAEDIAN; SHETTY, 2005).

A falta de uma vacina segura e eficaz juntamente com os dissabores existentes nos tratamentos convencionais, vêm despertando para a busca por novos fármacos que visam não apenas obter efeitos sobre o parasita em si, como também a capacidade de agir em sinergismo, direcionando a resposta imune do hospedeiro através de sua

modulação (ISLAMUDDIN et al., 2015). Além disso novos tratamentos que promovam muitas vantagens em relação às formulações tradicionais como, por exemplo, promover a liberação sustentada de ativos, solubilizar ativos lipofílicos, aumentar a estabilidade física e química de moléculas lábeis e minimizar os efeitos adversos (muito presentes nas alternativas terapêuticas usuais, como antimonial pentavalente, pentamidina ou anfotericina B) são essenciais para permitir maior adesão e efetividade ao tratamento (TIUMAN et al., 2011). Concomitantemente a esses sistemas, a associação entre fármacos pode proporcionar potencial sinergismo e sucesso terapêutico no enfrentamento dessa doença, sendo uma das abordagens mais promissoras para o desenvolvimento de novas formulações antileishmania (PASTOR et al., 2015; PINK et al., 2005).

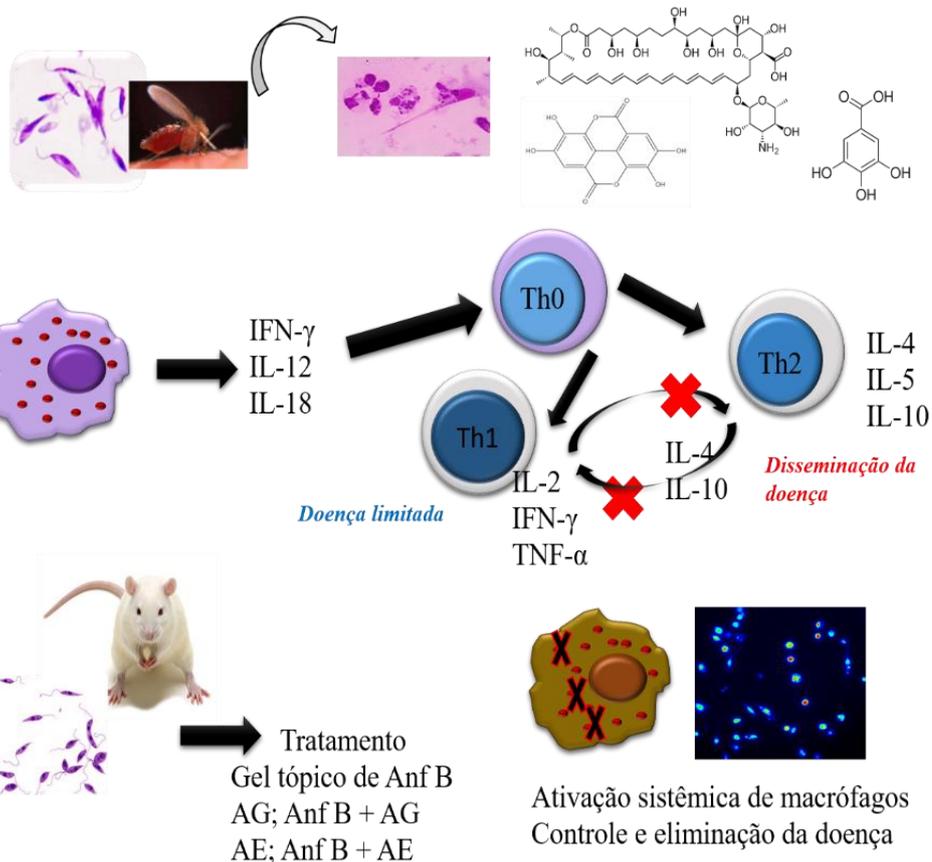
### **1.1 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO DE TESE**

Essa tese de doutorado tem como principal abordagem o uso da associação de fármacos para possível terapia antileishmania. A revisão de literatura trata-se de um apanhado geral sobre a doença, desde a epidemiologia até os tratamentos convencionais. Somado-se a isto, o papel de moléculas naturais derivadas de plantas, como o ácido gálico e o ácido elágico que foram estudados anteriormente por nosso grupo. No capítulo 1, mostra-se a importância dos macrófagos no papel de controle e combate de doenças e de ser um alvo para a busca de possíveis novos fármacos antileishmania. Dentre as moléculas citadas, o AG e o AE são dois imunomoduladores naturais que ativam macrófagos para resolverem a infecção por leishmania. No capítulo 2, realizou-se o tratamento de camundongos BALB/c infectados por *L. major*. Neste estudo, demonstrou-se o potencial efeito de associação existente entre a Anf B convencional, AG e AE. Desenvolveu-se uma formulação tópica para carreamento e liberação desses fármacos. Nosso produto, apresentou ser promissor para o enfrentamento desta enfermidade.

## REVISÃO DE LITERATURA

**CAPÍTULO 1:**  
 ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS E MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA PROSPECÇÃO DE NOVAS DROGAS ANTILEISHMANIA

**CAPÍTULO 2:**  
 ÁCIDO GÁLICO E ÁCIDO ELÁGICO: PROMISSORES ADJUVANTES A ANFOTERICINA B CONVENCIONAL PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE



## 1.2 OBJETIVOS

### **Geral**

- Investigar o potencial terapêutico *in vivo* da associação da Anf B convencional com ácido gálico ou ácido elágico em formulação tópica no tratamento experimental da leishmaniose cutânea, em camundongos BALB/c infectados por *Leishmania major*.

### **Específicos**

- Preparo do gel tópico dos fármacos associados;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas dos géis produzidos;
- Avaliar a cinética de liberação *in vitro* das formulações obtidas;
- Avaliar o potencial terapêutico da associação de Anf B convencional com ácido gálico e ácido elágico em gel de Polaxamer 407® na infecção experimental por *L. major* em camundongos BALB/c;
- Avaliar clinicamente os camundongos tratados com as formulações tópicas;
- Quantificar a carga parasitária de leishmania e avaliação histopatológica de lesões de pele dos camundongos tratados com as formulações tópicas;
- Avaliar a ativação de macrófagos peritoneais dos camundongos tratados: Capacidade fagocítica, atividade lisossomal, óxido nítrico e cálcio intracelular;
- Avaliar a infecção e infectividade *in vitro* de macrófagos peritoneais infectados por *L. major* após o tratamento com as formulações tópicas;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* por meio da dosagem sérica de enzimas renais e hepática dos camundongos após o tratamento com as formulações tópicas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Leishmanioses

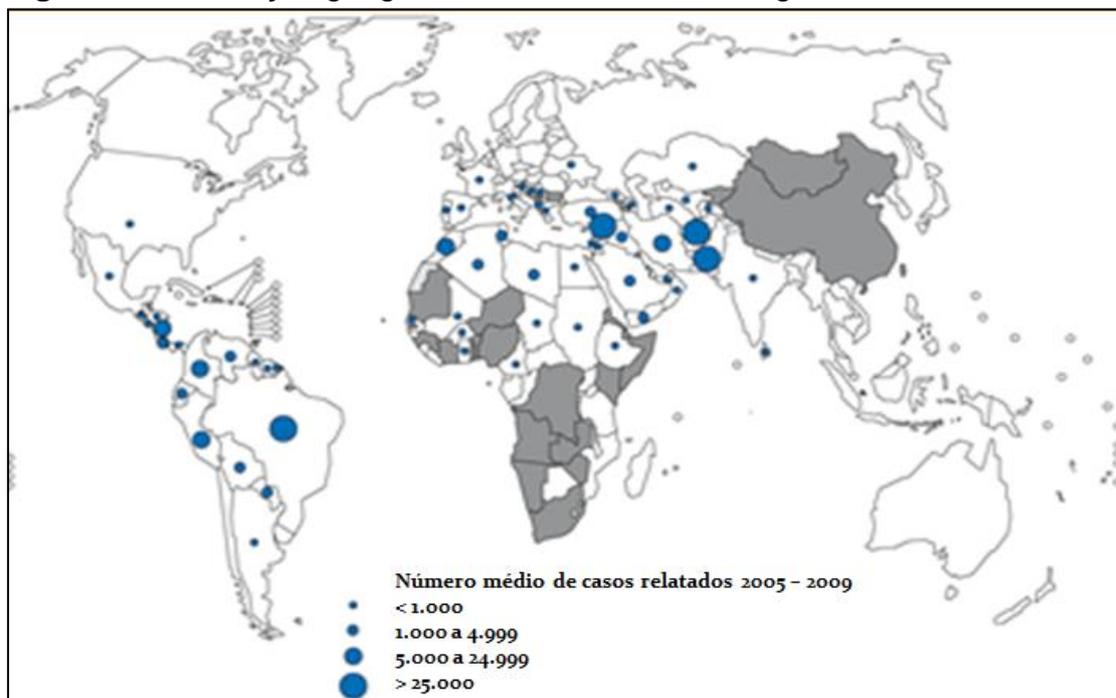
#### 2.1.1 Epidemiologia

Atualmente cerca de um bilhão de pessoas são afetadas por doenças conhecidas como “enfermidades negligenciadas” ou “doenças tropicais negligenciadas” (DTN). Epidemiologicamente, estas doenças não apresentam predisposição por sexo, gênero ou idade, contudo afeta principalmente a população de países menos desenvolvidos, localizados na Ásia, África, América do Sul e Central e em menor proporção, a de países europeus e da América do Norte. Dentre estas doenças estão incluídas a leishmaniose, doença de Chagas, malária, tuberculose, tripanossomíase africana, esquistossomose, dengue, hanseníase, filariose, cisticercose e outras (RATHI et al., 2003). Essas doenças afetam populações pobres, que geralmente estão submetidas a condições precárias ou até mesmo ausentes de higiene, algumas destas podem ocasionar danos permanentes, levando a um alto grau de morbidade e incapacidade física e, no caso da leishmaniose, pode culminar até mesmo na desfiguração (NOZAIS, 2003).

A leishmaniose é uma miscelânea de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Os hospedeiros são infectados durante o repasto sanguíneo das fêmeas do inseto vetor (dípteros - flebotomíneos), que vivem em áreas de florestas, cavernas, em tocas de roedores, ambiente domiciliar e/ou peridomiciliar (SINGH; SIVAKUMAR, 2003). Estas doenças afetam mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, com 1,5 milhões de novos casos a cada ano (AKHLAGH et al., 2019; MITROPOULOS et al., 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO 2018), aproximadamente 350 milhões de pessoas estão em áreas de transmissão de leishmaniose. Sendo que aproximadamente 90% dos casos diagnosticados da forma visceral localizam-se, na Etiópia, Bangladesh, Brasil, Nepal e Sudão. Já a forma tegumentar (LT), é a mais comumente encontrada (Figura 1), 90% dos casos ocorrem no Brasil, Afeganistão, Argélia, Irã, Peru, Arábia Saudita, Sudão, Síria, Peru e Bolívia (MITROPOULOS et al., 2010). São consideradas primariamente como zoonose podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antropozoonose.

As leishmanioses encontram-se entre as seis endemias prioritárias no mundo. No Brasil, são doenças de caráter endêmico, apresentando maior incidência, da leishmaniose tegumentar (LT), sendo que os casos ocorrem em todas as regiões do país, apresentando maior incidência nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (BRASIL 2006).

**Figura 1.** Distribuição geográfica da Leishmaniose Tegumentar.



Fonte: Adaptado de WHO, 2010.

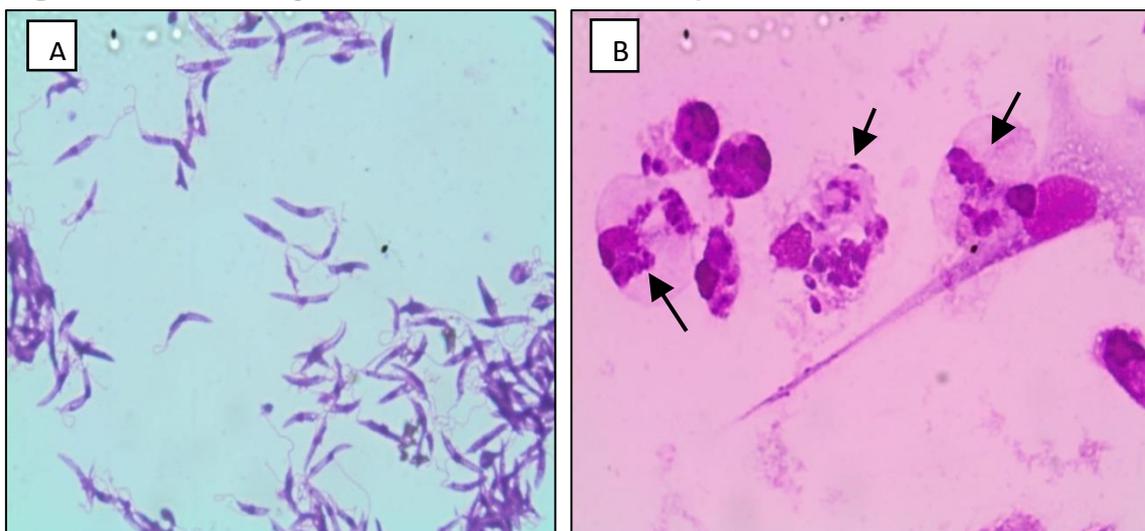
Subordinando-se a causalidade das espécies, a infecção pode se manifestar como Leishmaniose Visceral Americana (LVA). Podendo a LT ainda ser dividida em Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Disseminada (LD), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) e Leishmaniose Mucocutânea (LMC) (CHOI; LERNER, 2001; LINDOSO et al., 2014; WHO 2018)). Ao atentar-se para a LT, devido a sua magnitude, verifica-se que é uma afecção dermatológica que pode envolver fatores psicológicos, que se refletem no âmbito social e econômico devido a elevada ocorrência de deformidades (MITROPOULOS et al., 2010)

### 2.1.2 Agente Etiológico

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários que pertencem ao sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida, família

Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. (HARHAY et al., 2011). São parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, com uma forma sem flagelo aparente, a amastigota (Figura 2B), encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados e outra flagelada ou promastigota encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (Figura 2A). A forma de apresentação da doença está relacionada à espécie causadora da infecção, representadas no Quadro 1.

**Figura 2.** Formas digenéticas da *Leishmania major*.



A) Formas promastigotas obtidas através de cultivo celular em meio Schneider's, coradas com panótico rápido®. B) Formas amastigotas internalizadas em macrófagos murinos. Aumento 1000x.

**Quadro 1.** Forma de apresentação da doença e espécies relacionadas

Apresentação da Doença	Espécies
Leishmaniose visceral	<i>L. (L.) donovani</i> , <i>L. (L.) infantum</i> e <i>L.(V.) chagasi</i>
Leishmaniose cutânea	<i>L. (L.) major</i> , <i>L. (L.) tropica</i> e <i>L. (L.) aethiopica</i> , <i>L. (L.) infantum</i> , <i>L. (L.) mexicana</i> , <i>L. (L.) pifanoi</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L.(V.) guayanensis</i> , <i>L. (V.) panamensis</i> e <i>L. (V.) peruviana</i>
Leishmaniose cutânea difusa	<i>L. (L.) aethiopica</i> , <i>L. (L.) mexicana</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i>
Leishmaniose mucocutânea	<i>L.(V.) braziliensis</i> e <i>L. (V) panamensis</i>
Leishmaniose cutânea disseminada	<i>L. (V) braziliensis</i> e <i>L. (V) amazonensis</i>

Fonte: Modificado de Kaye; Scott, 2011.

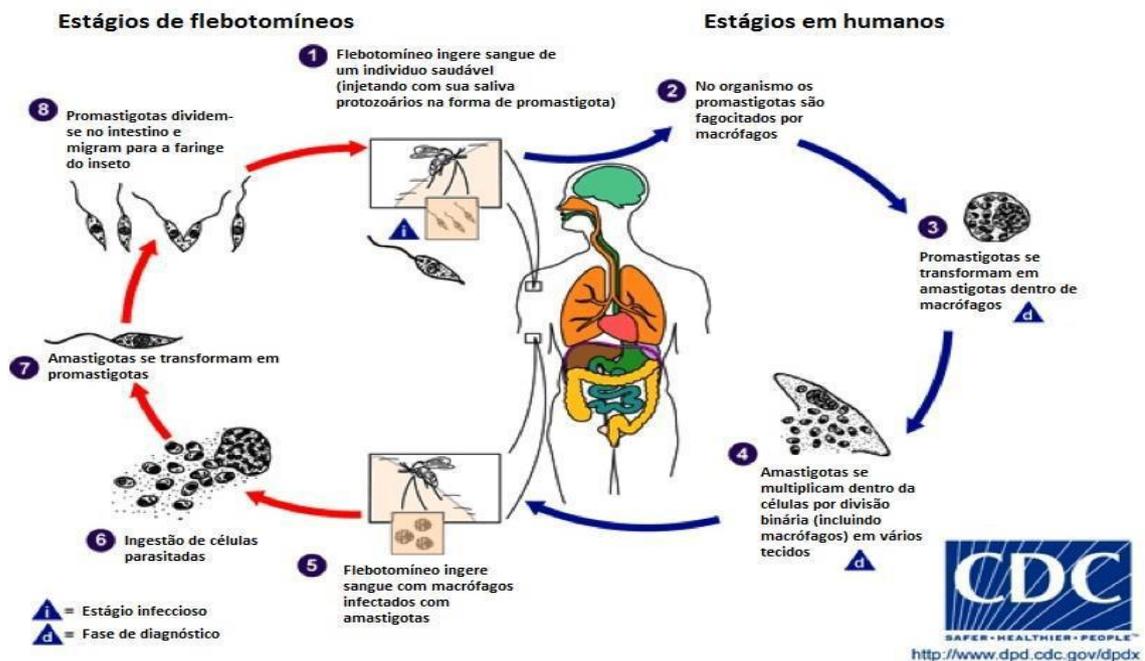
*Leishmania major*, a espécie utilizada neste estudo, é a mais antiga e difundida no velho mundo, sendo a principal espécie causadora de LT responsável por causar

deformidades em seus hospedeiros (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; KAYE; SCOTT, 2011; MITROPOULOS et al., 2010; REITHINGER; COLEMAN, 2007; REITHINGER et al., 2007).

### 2.1.3 Ciclo biológico

A infecção do inseto se dará com a ingestão de células infectadas durante o repasto sanguíneo, onde estas serão digeridas no intestino médio, e o parasita se transformam em promastigotas não infectivas (procíclicas). Em seguida os parasitas passam por um processo de metaciclogênese, em que ocorrem alterações na expressão gênica que os levam a tornarem-se infectivos. Paralelo a esse processo essas formas migram para o trato digestivo anterior do inseto e assim ao se alimentar regurgitam os parasitas e dão continuidade ao ciclo (Figura 3) (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; HARHAY et al., 2011; KAYE; SCOTT, 2011).

**Figura 3.** Ciclo biológico de parasitos do Gênero *Leishmania*.



1) Flebotomíneos regurgitam formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo; 2) As promastigotas ao penetrarem na pele são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares. 3) Promastigotas transformam-se em amastigotas. 4) Os amastigotas se multiplicam por divisão binária simples e prosseguem para infectar outras células. 5) A infecção torna-se sintomática e como resultado ocorre o aparecimento de lesões cutâneas ou forma visceral. 6) Os flebotomíneos se infectam pela ingestão de células infectadas durante o repasto sanguíneo. 7) No inseto, as amastigotas se transformam em promastigotas, e se desenvolvem no intestino. 8) Multiplicam-se e migram para o intestino anterior. Fonte: Adaptado de (HARHAY et al., 2011).

As promastigotas são então fagocitadas por células do sistema monocítico fagocitário, em especial macrófagos (HARHAY et al., 2011). No convívio intracelular os parasitas ficam limitados ao fagossomo, que seguidamente se funde ao lisossomo, formando o fagolisossomo. Neste sofrem alterações morfológicas e bioquímicas radicais, transformando-se em amastigotas, e assim se adaptam às novas condições (ROSYPAL; ZAJAC; LINDSAY, 2003). As leishmanias resistem à ação do fagolisossomo e se multiplicam por divisão binária até que ocupem todo o citoplasma. A rápida multiplicação faz com que ocorra a lise das células, e assim esses parasitas livres alcançam outras células (DOLAI et al., 2009; DUMAS et al., 1997).

#### **2.1.4 Resposta imune à infecção por leishmania**

O sistema imune atua numa rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais, moleculares e celulares. Nesse cenário encontra-se o delicado equilíbrio entre a saúde e a doença, em que tanto a deficiência quanto o exagero resultam em dano tecidual. A resposta imune consiste em uma série de ações celulares e humorais orquestradas. Isso quer dizer que a resposta imune necessita de operações coordenadas entre a imunidade inata (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) e adaptativas (células T) (MACHADO et al., 2012).

A dicotomia existente entre resposta imune celular Th1/Th2 nas infecções por leishmania, permite parasitemia ou debelação da doença (ISLAMUDDIN et al., 2015). Neste caso, uma resposta imune celular do tipo Th2 é indesejada, porque aumenta a susceptibilidade às infecções e permite a multiplicação e disseminação do parasito. No que diz respeito a resposta Th1, por sua vez, confere cura ou proteção, como por exemplo: aumento de capacidade fagocítica, da atividade lisossomal, da síntese de óxido nítrico e do cálcio intracelular, por meio de mecanismos de ativação de macrófagos (ISLAMUDDIN et al., 2015; ROY et al., 2014). Após infecção, nos indivíduos que não têm a capacidade de produzir IFN- $\gamma$  e ativar macrófagos, a leishmania dissemina-se. Nesses pacientes é fácil entender o desenvolvimento da doença, pela deficiência de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e alta produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Assim, é fácil entender o desenvolvimento da doença pela deficiência de IFN- $\gamma$  e alta produção de IL-10. A restauração da resposta imune *in vitro* na leishmaniose visceral

pode ser observada pela neutralização de IL-10 ou pela adição de IL-12 às culturas de células mononucleares de sangue periférico (DOLAI et al., 2009).

A habilidade do parasita em invadir e se replicar no interior de macrófagos tem sido alvo de vários estudos científicos (CLARK et al., 2006). O patógeno ao penetrar no organismo entra em contato imediatamente com os componentes do soro, ocorrendo uma ligação com moléculas do sistema complemento e ativação das vias clássicas e alternativas, contudo os parasitos desenvolveram vários mecanismos para lidar com o estresse oxidativo, dentre eles a produção de enzimas tripanotona e arginase e a inibição da atividade proteínas quinases C (PKC), por meio do aumento da expressão de SERCA 3 e PMCA4 que são receptores de cálcio presentes no retículo sarcoplasmático e na membrana celular, respectivamente (MOREIRA; LEBLANC; OUELLETTE, 2009). A retirada de cálcio do citosol da célula mediante a presença do parasita internalizado, confere inibição da PKC e ativação da PKC- $\zeta$ , sendo esta a responsável pelo aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias que irão ativar a resposta imune do tipo Th2 (ROY et al., 2014).

A evolução da infecção pode tomar vários rumos, dependendo dos tipos de células, da qualidade da resposta mediada por citocinas envolvidas na resposta imune e da espécie de leishmania envolvida no processo (COLOTTI; ILARI, 2011). Contudo o paradigma entre as respostas Th1 e Th2 está longe de explicar a imunopatologia e cura da infecção por leishmania. A caracterização bem definida dos papéis das respostas imunes do tipos Th1 e Th2 também é controversa, alguns estudos indicam que um fenótipo Th1 predominante de células T CD4<sup>+</sup> pode não ser um indicativo de proteção contra a infecção (COLOTTI; ILARI, 2011).

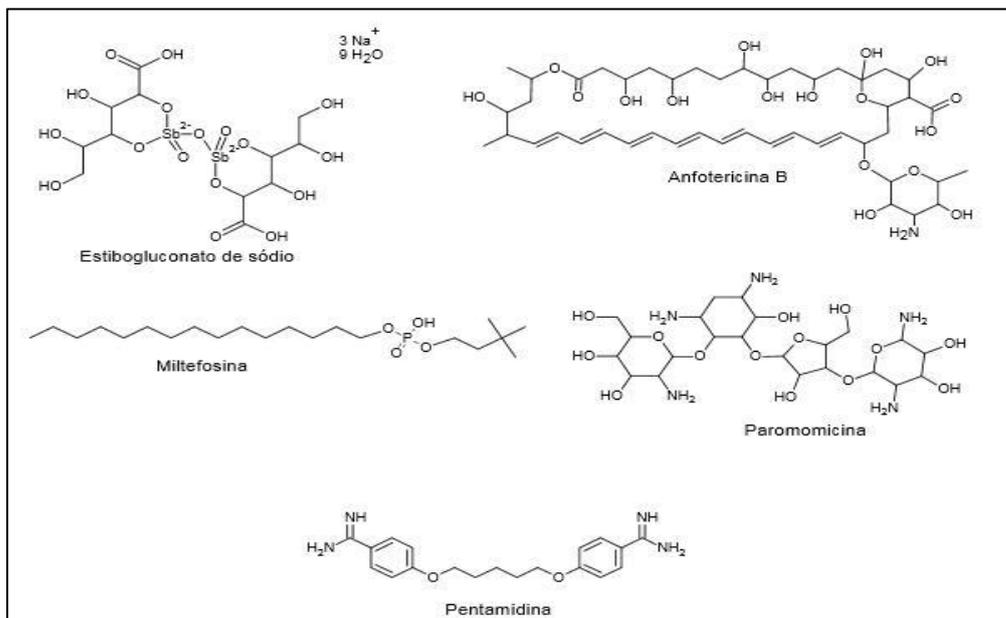
Uma vez conhecendo a imunobiologia induzida pelo parasita, se fazem necessárias investigações farmacológicas que visem modular o sistema imune do hospedeiro reduzindo os efeitos colaterais provocados pelos fármacos convencionais.

### **2.1.5 Tratamento das leishmanioses**

Desde o século passado, a terapia das leishmanioses consiste na administração de agentes da família dos antimoniais pentavalentes, representados por estibogluconato de sódio ou Pentostan<sup>®</sup> (Figura. 4) e antimoniato de meglumina ou Glucantime<sup>®</sup>. O medicamento disponível no Brasil é o antimoniato de N-

metilglucamina, que é utilizado para administração parenteral, pois não possui boa absorção oral. O período de tratamento é de vinte a trinta dias, com cerca de 90% de eficácia (DEN BOER et al., 2011).

**Figura 4.** Estruturas químicas de fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses



Fonte: Santos et al., 2008

A ação dos antimoniais pentavalentes é pouco expressiva quando testada *in vitro* sobre formas promastigotas do parasito. No entanto, a atividade observada em formas intracelulares, amastigotas, é completamente diferente (AMEEN, 2010). A redução de Sb<sup>5+</sup> em Sb<sup>3+</sup> em células fagocíticas hospedeiras é provavelmente uma das razões que permite aos antimoniais pentavalentes uma resposta clínica relevante (DECUYPERE et al., 2012). O mecanismo de ação dessa classe de medicamentos envolve a redução do aporte de ATP e GTP, essenciais para a manutenção biológica do protozoário. Os antimoniais agem por meio de duas vias, primeiramente estimulando os macrófagos infectados a provocar estresse oxidativo no parasito intracelular e também pela ação direta do antimônio reduzido (Sb<sup>3+</sup>) no equilíbrio redox do microrganismo (DECUYPERE et al., 2012). As desvantagens na terapia da leishmaniose cutânea com antimoniais pentavalentes, deve-se a sua administração por via parenteral por longo período, o que dificulta o tratamento em zonas rurais, além disso, a hepatotoxicidade é o efeito adverso mais grave, seguido de problemas

cardíacos, reações dérmicas locais, anorexia, náuseas, vômitos, mialgia, linfocitose e eosinofilia (NEVES; CALDAS; SAMPAIO, 2009; SIQUEIRA-NETO et al., 2010).

Podemos listar como fármaco de segunda escolha a pentamidina e anfotericina B (Anf B), menos utilizados devido à alta toxicidade e alto custo. A pentamidina apresenta efeitos colaterais severos, como toxicidade renal e hepática, pancreatite, hipotensão, disglycemia e problemas cardíacos. A anfotericina B é efetiva no tratamento de leishmaniose visceral, com toxicidade mais baixa quando encapsulada em lipossomas, porém é um medicamento muito caro e, além disso, não é apropriada para o tratamento de outras formas da doença (SANTOS et al., 2008). A anfotericina B é um agente antimicrobiano poliênico com potente atividade tanto para a forma promastigota extracelular como para a forma amastigota intracelular. O fármaco atua inibindo o metabolismo de ergosterol presente na membrana plasmática do parasito. O tratamento de vinte dias custa cerca de quatrocentos e oitenta dólares, dificultando qualquer política de medicamentos embasada nesse esquema terapêutico (SANTOS et al., 2008).

No início deste século, o alquilfosfolípídeo miltefosina, único medicamento oral disponível para o tratamento de leishmaniose visceral, foi registrado na Índia, Europa e América do Sul. É altamente efetivo em crianças, mas pode apresentar complicações gastrintestinais e seu uso em mulheres grávidas é limitado devido à sua teratogenicidade. Além disso, altos índices de desenvolvimento de resistência vêm sendo observados *in vitro* (SANTA-RITA et al., 2004). A miltefosina se apresenta como único tratamento oral para a leishmaniose visceral (BERMAN, 2005; RAMESH BABU et al., 2008). Trata-se de uma hexafofocolina, cuja eficácia contra a leishmaniose tornou-se conhecida em meados dos anos 80. No entanto, sua comercialização como primeiro agente oral contra a leishmaniose visceral na Índia ocorreu apenas em 2002 e contra leishmaniose cutânea na Colômbia em 2005. Hoje, no Brasil, esse fármaco está autorizado pelo Ministério da Agricultura a ser utilizado no tratamento da leishmaniose visceral canina (ROATT et al., 2014). As desvantagens e restrições do seu uso incluem risco de teratogenicidade, potencial de desenvolvimento de resistência e estreita janela terapêutica (GODINHO et al., 2012; LUQUE-ORTEGA; RIVAS, 2007; NATERA et al., 2007).

A pentamidina é utilizada no tratamento da leishmaniose cutânea com esquema de administração em três doses diárias de 2 a 4 mg/kg intramuscular ou intravenoso,

por sete dias consecutivos ou dias alternados. Seu uso contínuo pode induzir diabetes (AMEEN, 2010), porém é considerado uma boa alternativa em relação ao tratamento com antimoniais (ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012). A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídico inicialmente indicado para infecção bacteriana. Seu mecanismo de ação antibacteriano envolve a associação a subunidades ribossomais, interferindo na síntese protéica. Antes de ser desenvolvido para o tratamento da leishmaniose cutânea, já havia indicação de uso para giardíase, amebíase e criptosporidiose (CHAWLA; NGUYEN; GOH, 2011; SINHA; NATH; SANTOS, 2011). Em associação com a imunoterapia utilizando IL-12 em formulação tópica, Fernandes et al., (2001) observaram significativa evolução clínica apontando para cura no tratamento realizado em camudongos BALB/c infectados com *L. major*.

Embora não se conheça amplamente o modo de ação da paromomicina em leishmania, são propostas vias como a interferência na fluidez da membrana, na síntese protéica e no transporte ativo de moléculas (CHAWLA et al., 2011; MAAROUF et al., 1997). O efeito foi relatado em estudos clínicos de fase III na Índia, que demonstraram uma taxa de 94% de eficácia no tratamento intramuscular de leishmaniose visceral (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2008). Grande vantagem no esquema terapêutico para a leishmaniose cutânea é a sua administração tópica, evitando efeitos colaterais de vias sistêmicas, sendo relatada apenas irritação no local da aplicação (AMEEN, 2010; CROFT; OLLIARO, 2011).

Em virtude da onerosidade, da gama de efeitos colaterais e da limitação dos fármacos convencionais, produtos naturais têm sido investigados como fonte de descoberta de novos fármacos.

## **2.2 Plantas medicinais e produtos naturais: fonte potencial para terapêutica.**

Analisando o contexto histórico é possível observar que a utilização de plantas com fins terapêuticos faz parte da evolução humana e foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados pelas civilizações, das quais algumas têm suas próprias referências históricas acerca do uso de plantas medicinais. Estas civilizações ao realizarem experiências com plantas, observaram que algumas destas curavam, matavam ou produziam efeitos colaterais severos (CALIXTO, 2000).

Assim a utilização de plantas com fins terapêuticos é considerada uma prática fitomédica, contudo para que isso ocorra com segurança é necessário a validação de suas propriedades farmacológicas, para o conhecimento dos possíveis efeitos benéficos ou maléficos. Além disso, os profissionais da saúde devem considerar tal prática, observando crenças, valores e estilo de vida (NASCENTE et al., 2017). O crescente interesse por medicamentos de origem vegetal com efeito antiparasitário e a extraordinária diversidade química vegetal, transformam as florestas tropicais em verdadeiros reservatórios de novos princípios ativos. O Brasil é um país rico em diversidade cujo território possui cinco principais biomas, sendo designados como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga. Portanto, é uma rica fonte de substâncias ativas. No entanto, este potencial para a descoberta de plantas com atividades farmacológicas é pobremente explorado ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em países desenvolvidos (CALIXTO, 2000).

No ano de 2006 foi implantada no Brasil, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), sendo instituída pela Portaria do Ministério da Saúde (MS) nº 971.3. Esta portaria tem como objetivo ampliar as opções terapêuticas aos usuários do SUS, tais como a acesso às plantas medicinais, a fitoterápicos e a serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde (CALIXTO, 2000).

Assim, tanto o conhecimento como as potencialidades de uso das plantas medicinais estão longe de serem esgotadas. Novas necessidades certamente encontrarão, na diversidade florística, por meio da descoberta científica o reconhecimento de novas moléculas com atividade terapêutica e com aplicações na indústria farmacêutica tanto no desenvolvimento de fitoterápicos, quanto de novos medicamentos a partir de moléculas isoladas. Para a indústria farmacêutica as plantas foram e continuam sendo de grande relevância, na busca por substâncias ativas, importantes para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas e adjuvantes farmacêuticos (BRITO et al., 2015).

Os produtos naturais oferecem moléculas com impacto profundo na saúde humana, a natureza produz infinitos metabólitos secundários com propriedades biológicas distintas. Diversos estudos já validaram o efeito de produtos naturais como potenciais fontes de novos e seletivos agentes para o tratamento de doenças tropicais causados por protozoários e outros parasitos. (ALVES et al., 2017; CARNEIRO et al.,

2012; DE CASTRO OLIVEIRA et al., 2017; DE MEDEIROS et al., 2011; ISLAMUDDIN et al., 2015; RODRIGUES et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015; SOUZA et al., 2017)

Como parte da pesquisa por novos e melhores medicamentos com alta viabilidade e baixa toxicidade, o Programa de Doenças Tropicais da Organização Mundial de Saúde (OMS) vem considerando a investigação sobre o uso plantas no tratamento de leishmaniose como essencial e de alta prioridade. Ainda não existe nenhum produto natural licenciado para tratamento da leishmaniose humana. Iwu; Jackson; Shuster (1994) citam em sua revisão mais de vinte espécies de plantas que têm demonstrado conter componentes que apresentam atividade significativa contra várias espécies de leishmania.

Os constituintes ativos de algumas destas plantas já foram isolados e suas atividades têm sido confirmadas por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*, mas para a grande maioria destas plantas tem sido reportada apenas a atividade de extratos *in vitro*, faltando o isolamento dos componentes responsáveis por esta atividade biológica, com subseqüentes estudos para confirmação *in vivo*. Até o momento, os estudos experimentais citados na literatura permitiram a identificação de várias classes de substâncias com atividade antileishmania e entre as mais promissoras estão: os alcaloides isoquinolínicos e  $\beta$ -carbolicos, os glicosídeos iridóides e esteroidais, além das quinolonas, lignanas (Ex. pinosinol, medioresinol e liriiosinol; Di GIORGIO et al. 2005) e taninos. (IWU et al., 1994; KOLODZIEJ; KIDERLEN, 2005).

### **2.2.1 Taninos.**

Os taninos são polifenóis derivados do metabolismo secundário das plantas, sendo a maior parte derivada do metabolismo da glicose por diferentes reações bioquímicas, que consistem a via do ácido chiquímico ou do acetado, de grande interesse econômico e ecológico, solúveis em água e com pesos moleculares entre 500 a 3000 Daltons (DE JESUS et al., 2012). Classicamente, as estruturas químicas dos taninos são divididas em dois grupos: hidrolisável e condensado. Os taninos hidrolisáveis consistem em ésteres de ácido gálico e glicosídeos de ácido elágico, formados a partir de shikimato, onde os grupos hidroxil-açúcar são esterificados com ácidos fenólicos (DE JESUS et al., 2012).

Dentre alguns compostos fenólicos importantes encontram-se os ácidos gálico e seus dímeros (ácido digálico ou hexaidroxidifênico e elágico). Sendo caracterizados como lactonas fenólicas de ocorrência natural encontradas na castanha de caju, aroeira-do-sertão, barbatimão e morango, por exemplo, na forma de taninos hidrolisáveis chamados elagitaninos (MURAKAMI et al., 1991; RIBEIRO et al., 2015; VATTEM et al., 2005). Muitas espécies de plantas que produzem taninos são usadas na medicina popular para diferentes fins. O ácido gálico possui propriedades antioxidantes e/ou anti-inflamatória (YANG et al., 2015) antimicrobiana (SARJIT; WANG; DYKES, 2015), propriedades antimutagênicas e anticarcinogênica (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003; LU et al., 2010; PAOLINI et al., 2015). Das atividades biológicas comprovadas do ácido elágico destacam-se: anticarcinogênica, hepatoprotetora, inibidora da DNA topoisomerase (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; VATTEM et al., 2005), antioxidante, anti-inflamatória (PAPOUTSI et al., 2008), gastroprotetora (IINO et al., 2001).

Recentemente, nosso grupo explorou a atividade antileishmania e imunomoduladora dessas moléculas. Ambas demonstraram elevado potencial e eficácia em inibir o crescimento “*in vitro*” de formas promastigotas de *L. major*, demonstraram possuir seletividade aceitável para o parasita em relação às células do hospedeiro (IS > 20) e grande capacidade imunomoduladora, ativando macrófagos e tornando-os efetivos em resolverem a infecção (ALVES et al., 2017)

Por serem duas moléculas de caráter hidrofílico, ambas possuem boa capacidade de atravessar membranas e serem absorvidas rapidamente pelo trato gastrointestinal quando administradas por via oral. No entanto, são rapidamente biotransformadas em metabólitos inativos, com tempo de meia vida curto (ATHUKURI; NEERATI, 2017; XU et al., 2017). Isso nos levou a desenvolver uma formulação tópica de emulgel contendo essas biomoléculas associadas ou não com anfotericina B.

A falta de uma vacina segura e eficaz, juntamente com as adversidades existentes nos tratamentos convencionais, vêm despertado para a busca por novos fármacos que visam apresentar potencial ação antileishmania, como também potencial imunomodulador, que podem ser utilizados como monoterapia ou associados em caráter sinérgico às terapias convencionais em formas inovadoras de formulações farmacêuticas.

### 2.3 Formulação tópica de Gel de Polaxamer 407®

A pele representa um dos órgãos mais extensos do corpo. As duas funções principais da pele são atuar como uma barreira física eficaz contra as influências ambientais indesejadas, bem como prevenir a excessiva perda de água do corpo. A pele é composta de epiderme, derme e tecido adiposo subcutâneo (VAN SMEDEN et al., 2014)

Constitui uma via potencial de aplicação de medicamentos devido seu fácil acesso e sua grande superfície. As limitações desta via de administração estão principalmente associadas com a função de barreira da pele que impõem grandes limites à absorção de fármacos (LEHMANN; KEIPERT; GLOOR, 2001).

Pomadas, cremes e géis são formas farmacêuticas semissólidas destinadas à aplicação tópica. A maioria delas é utilizada pelos efeitos dos agentes terapêuticos que contêm. São utilizadas tanto por seus efeitos tópicos quanto sistêmicos (LEHMANN et al., 2001).

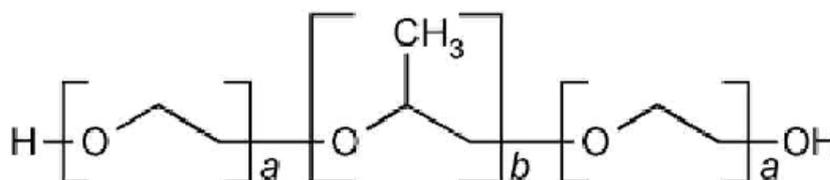
Os géis são uma classe relativamente nova de forma farmacêutica criada pela retenção de grandes quantidades de líquido aquoso ou hidroalcoólico, em uma rede de partículas coloidais sólidas, que podem consistir em substâncias inorgânicas, tais como sais de alumínio ou polímeros orgânicos de origem natural ou sintética. Eles têm um componente aquoso superior que permite uma maior dissolução do fármaco, e permite a migração fácil do fármaco por meio de um veículo que é, essencialmente, um líquido, em comparação com o unguento ou base de creme. Estes são superiores em termos de uso e aceitabilidade do paciente, porém, apesar das muitas vantagens dos hidrogéis, a principal limitação é na liberação de fármacos hidrofóbicos (KHULLAR et al., 2012).

Vários estudos demonstraram que *pluronic lecithin organogel* (organogel de lecitina - PLO) têm a capacidade única para liberar fármacos através da pele para um sítio específico quando outras vias de administração não são viáveis (BELGAMWAR, 2008; LEHMAN, 2001).

PLO é um sistema de duas fases consistindo de uma fase oleosa (lipofílica) e uma fase aquosa (hidrofílica). Os componentes químicos do PLO são *pluronic F-147* ou polaxamer 407®, lecitina de soja, palmitato ou miristato de isopropila, sorbato de potássio, ácido sórbico e água (PANDEY; BELGAMWAR; SURANA, 2009)

O *pluronic F-147* ou polaxamer 407<sup>®</sup> (Figura 5), utilizado na concentração entre 15 e 50%, é uma cera branca usada como agente emulsionante, solubilizante e molhante; é um copolímero de cadeia longa que tem a propriedade única de ser sólido à temperatura ambiente e líquido à temperatura refrigerada. Assim, em contato com a pele o gel facilita a adesão do produto, sendo excelente carreador de moléculas, com propriedades tensoativas e promotora de permeabilidade cutânea, sendo capaz de promover desarranjo do estrato córneo da pele, promovendo liberação de fármacos até as camadas mais profundas da pele (PINHEIRO et al., 2016; UR-REHMAN; TAVELIN; GROBNER, 2011; VAN HEMELRIJCK; MULLER-GOYMANN, 2012).

**Figura 5:** Estrutura química do Polaxamer



As letras a e b representam cadeias hidrofílicas e hidrofóbicas, respectivamente (UR-REHMAN et al., 2011)

## 2.4 Associação de drogas

A descoberta de drogas é um processo caro que requer uma média de 10 a 20 anos, além de um investimento de mais de US \$ 1 bilhão antes que um novo composto com atividade contra um alvo específico possa ser aplicada clinicamente (HUGHES et al., 2011) Como consequência, sistemas de entrega que transportam medicamentos convencionais podem melhorar a eficácia destes compostos e, conseqüentemente, reduzir seus efeitos colaterais (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018). Concomitantemente a esses sistemas, a combinação entre drogas pode proporcionar potencial sinergismo e sucesso terapêutico no enfrentamento dessa doença, sendo uma das abordagens mais promissoras para o desenvolvimento de novas formulações antileishmania (PASTOR et al., 2015; PINK et al., 2005).

As principais vantagens de terapia combinada são: sinergismo, redução da toxicidade, regimes de tratamento mais curtos e redução do desenvolvimento da resistência (CASTRO et al., 2014; PASTOR et al., 2015; PINK et al., 2005). Vários estudos mostraram que algumas combinações de drogas aumentaram seus efeitos antileishmania. Por exemplo, uma combinação de miltefosina com paromomicina demonstrou atividade superior contra a leishmaniose visceral em modelos animais (SEIFERT; CROFT, 2006); enquanto que as combinações de paromomicina e gentamicina foram mais efetivas contra a forma cutânea em camundongos BALB/c (TOLOUEI et al., 2011). Do mesmo modo combinação de glucantime com ácido ascórbico foi eficiente no tratamento de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum* (CASTRO et al., 2014).

Diante do que se apresenta e considerando a necessidade da descoberta de novas abordagens para tratamento da leishmaniose, como a monoterapia ou a associação de fármacos aos já utilizados nos tratamentos convencionais, optou-se por realizar a associação entre a Anf B e as moléculas naturais (AG e AE) em formulação tópica em gel de polaxamer 407<sup>®</sup> para tratamento experimental da leishmaniose cutânea no modelo murino.

**CAPÍTULO 01:**

**ATIVACÃO DE MACRÓFAGOS E MODULAÇÃO DA RESPOSTA  
IMUNOLÓGICA NA PROSPECÇÃO DE NOVAS DROGAS  
ANTILEISHMANIA**

**Revista: Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**

## **Ativação de macrófagos e modulação da resposta imune na prospecção de novas drogas antileishmania**

### **RESUMO**

As leishmanioses são zoonoses parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes ao grupo de doenças tropicais negligenciadas. Encontram-se distribuídas por todo o mundo onde, atualmente, 12 milhões de pessoas estão acometidas pela doença e um número alarmante de 1,5 milhões de novos casos surgindo a cada ano. É de difícil controle, não há vacina eficaz e o seu tratamento é baseado em um número limitado de drogas que apresentam uma gama de efeitos indesejáveis, além de já existirem relatos de resistência à essas drogas. A busca de novos fármacos se dá não apenas para investigar a atividade intrínseca contra o parasita, também visa investigar o possível efeito sinérgico de novas drogas com a resposta imune do hospedeiro. Neste trabalho, apresentamos os macrófagos como alvo da investigação de novas drogas antileishmania e apresentamos metodologias para avaliar tal ativação. Os macrófagos desempenham papel importantíssimo na resposta imune celular, pois são células do sistema monocítico fagocitário e a primeira linha de defesa do organismo contra os parasitas do gênero leishmania. Capacidade fagocítica, atividade lisossomal, indução do aumento de óxido nítrico e cálcio intracelular são parâmetros de avaliação de ativação dessas células que as tornam mais hostis para debelar a parasitemia e levar o paciente à cura. Neste contexto revisamos 19 substâncias já investigadas e que ativam macrófagos, o que as tornam promissoras no tratamento antileishmania.

**Palavras-chave:** Ativação de macrófagos, Resposta imune celular, Leishmanioses, Produtos naturais

## ABSTRACT

Leishmaniasis are parasitic zoonoses caused by protozoa of the genus *Leishmania* belonging to the group of neglected tropical diseases. They are distributed all over the world where 12 million people are currently affected by the disease and an alarming number of 1.5 million new cases arise each year. It is difficult to control, there is no effective vaccine and its treatment is based on a limited number of drugs that have a range of undesirable effects, and there are already reports of resistance to these drugs. The search for new drugs is not only to investigate the intrinsic activity against the parasite, but also to investigate the possible synergistic effect of new drugs with the immune response of the host. In this work, we present macrophages as the target of the investigation of new antileishmania drugs and present methodologies to evaluate such activation. Macrophages play an important role in the cellular immune response, since they are cells of the mononuclear phagocytic system and the first line of defense of the organism against the parasites of the genus *leishmania*. Phagocytic capacity, lysosomal activity, induction of increase of nitric oxide and intracellular calcium are parameters of evaluation of activation of these cells that make them more hostile to stop the parasitemia and lead the patient to cure. In this context we bring 19 substances already investigated and that activate macrophages, what makes them promising in the treatment antileishmania.

**Keywords:** Activation of macrophages, Cellular immune responses, Leishmaniasis, Natural products

## 1. INTRODUÇÃO

Infecções por protozoários são um problema de saúde pública mundial, principalmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, correspondendo a 14% da população mundial sob risco de infecção por essas doenças (Kondrashin, Baranova, Morozova, & Stepanova, 2011; Waldron, et al., 2011). Inseridas nesse quadro, as leishmanioses fazem parte do grupo de doenças tropicais negligenciadas, onde 12 milhões de pessoas estão infectadas e 1 a 2 milhões de novos casos surgem a cada ano, sendo endêmicas em 98 países e disseminada em pelo menos 5 continentes (Alvar, et al., 2012; Mitropoulos, Konidas, & Durkin-Konidas, 2010).

O potencial infeccioso das leishmanioses se deve não apenas ao contexto sócio-econômico em que vivem essas populações, mas à alta disseminação do vetor e atingindo, inclusive, áreas de ambiente urbano (Harhay, Olliaro, Costa, & Costa, 2011). Deve-se também à capacidade do parasita de albergar-se e multiplicar-se no interior hostil de células altamente especializadas em destruir patógenos intracelulares, como as células do sistema monocítico fagocitário, mais especificadamente, os macrófagos (Dumas, et al., 1997; Islamuddin, et al., 2015; Naderer & McConville, 2008; Roy, et al., 2014)

O ciclo biológico da leishmania, agente etiológico das leishmanioses, se inicia quando a fêmea do inseto vetor, da Família Phlebotominae, realiza o seu repasto sanguíneo. Neste, estão presentes as formas flageladas do parasita, as promastigotas. Durante o repasto, a fêmea regurgita sobre o local da picada as promastigotas metacíclicas que imediatamente são fagocitadas pelos macrófagos presentes na pele do hospedeiro vertebrado. No interior dessas células as promastigotas se tornam sem flagelo aparente, passando a se chamar, portanto, de amastigotas (Harhay, et al., 2011). Para sobreviver no interior dessas células e se disseminar no organismo desse hospedeiro, os parasitas atuam por meio de mecanismos de imunossilenciamento e imunoevasão, para escaparem do estresse oxidativo provocado pela presença de hidrolases positivas, ataque lisossomal no interior dos vacúolos parasitóforos e do cálcio intracelular responsável por facilitar a alteração do citoesqueleto dos macrófagos, além de ser uma molécula microbicida e ferramenta fundamental em despolarizar a f-actina, proteína que invade os vacúolos e destrói o parasita (Dolai, Yadav, Pal, & Adak, 2009; Dumas, et al., 1997).

Os mecanismos que as amastigotas intracelulares utilizam para sobreviverem no interior dos macrófagos e estabelecerem a parasitemia, baseiam-se em uma forte predominância de uma resposta imune celular, desencadeada por linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th-2), já que a restauração da imunidade celular do tipo Th-1 é fundamental para o controle da doença (Gurunathan, et al., 2000; Islamuddin, et al., 2015). Inicialmente, precisamos entender como ocorre a ativação da resposta imune desencadeada por linfócitos T auxiliares. No hospedeiro vertebrado, quando um patógeno é fagocitado por uma célula apresentadora de antígeno (APC), este é atacado por enzimas lisossomais, estresse oxidativo e hidrolases positivas para ser processado e ser apresentado na superfície dessas células, como antígeno, através de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (Gill, et al., 2003; Klein, Hinterberger, Wirnsberger, & Kyewski, 2009). Juntamente com o antígeno a ser apresentado, as células que enfrentaram o patógeno passam também a expressar citocinas.

Esses dois fatores são suficientes para que ocorra a ativação de linfócitos T auxiliares (Luckheeram, Zhou, Verma, & Xia, 2012). Citocinas como as interleucinas 4 e 10 (IL-4 e IL-10) ativam a resposta imune do tipo Th-2, onde os linfócitos Th passam a recrutar e a ativar esses linfócitos B para produzirem imunoglobulinas. Já  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  ativam resposta imune do tipo Th-1, onde os linfócitos Th passam a recrutar mais células do SFM, capacitando-as a aumentar a expressão de óxido nítrico (NO), atividade lisossomal, capacidade fagocítica e íons cálcio para destruir os patógenos intracelulares (Fig 1) (Islamuddin, et al., 2015; Roy, et al., 2014; Valadares, et al., 2011)

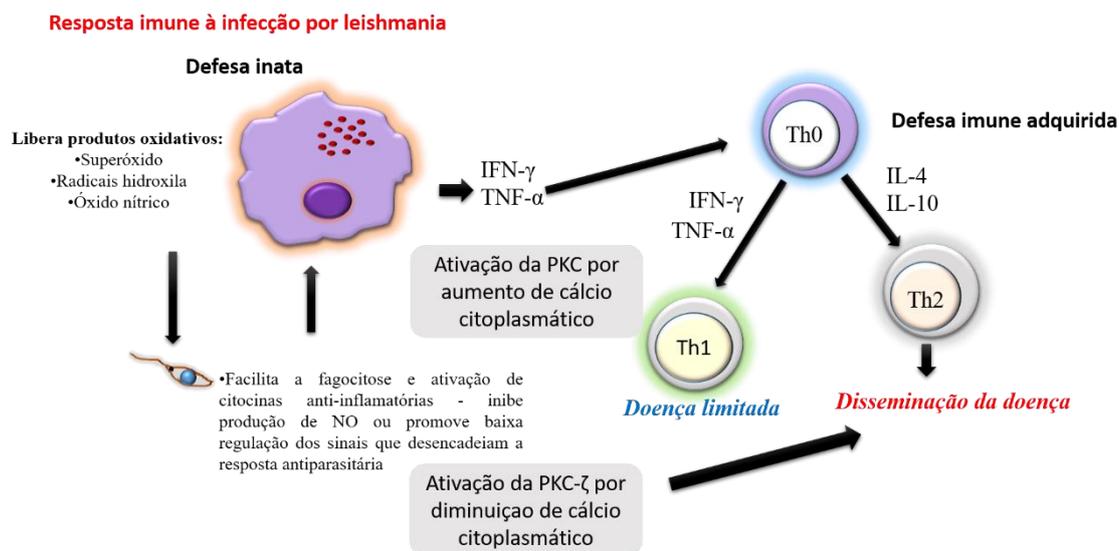


Fig 1. Resposta imune à infecção por leishmania. Durante a patogenia da doença as formas promastigotas de leishmania se transformam em amastigotas no interior hostil dos macrófagos. Estas, para sobreviverem e promoverem parasitemia, inibem a produção de NO ou promovem baixa regulação dos sinais que desencadeiam a resposta antiparasitária, dessa forma estabelecendo perfil de resposta celular do tipo Th-2. Em contrapartida, a resposta imune celular do perfil Th-1 e restauração da imunidade celular é fundamental para o controle da doença, principalmente quando envolve os mecanismos de ativação de macrófagos, tornando-os capazes de debelarem a infecção. Tais mecanismos envolvem sua super regulação da ativação lisossomal, capacidade fagocítica, aumento da produção de NO e cálcio intracelular.

Por possuir tratamento limitado, oneroso e com uma gama de efeitos adversos (Alizadeh, Foroumadi, Ardestani, Poorrajab, & Shafiee, 2008; Ashford, 2000), a busca por novos fármacos, mais eficazes e com menos efeitos tóxicos, é fundamental. Tais fármacos devem, ainda, atuar em sinergismo com a resposta imunológica do hospedeiro, fazendo com que a resposta celular do perfil Th-1 prevaleça, para que células T de memória possam conferir cura definitiva e proteção às possíveis recidivas da doença que ocorrem costumeiramente em áreas endêmicas, onde há grande exposição dos hospedeiros ao vetor e, conseqüentemente, ao agente etiológico (Alves, et al., 2017; Carneiro, et al., 2012; de Medeiros, et al., 2011; Islamuddin, et al., 2015; Rodrigues, et al., 2013; Rodrigues, et al., 2015; Souza, et al., 2017; Valadares, et al., 2011).

Portanto, mediante a imunopatologia da leishmaniose e o papel crucial da ativação de células do sistema imune, especialmente os macrófagos, como alvos farmacológicos para controlar a parasitemia da doença, o objetivo desta revisão foi abordar o papel da

ativação dessas células e sua modulação através de protocolos imunomoduladores para estudo e/ou descoberta de possíveis novos fármacos para o enfrentamento dessa doença bem como fazer um apanhado na literatura de drogas que possuem características imunomoduladoras com atividade antileishmania através destes protocolos.

## 2. ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS

### 2.1 Obtenção de macrófagos

Os macrófagos utilizados para ensaios que avaliam a capacidade imunomoduladora de drogas, podem ser obtidos de linhagem de células imortalizadas como a RAW 264.7 (Kolodziej & Kiderlen, 2005) ou obtidos de lavado peritoneal de camundongos BALB/c (Alves, et al., 2017; Carneiro, et al., 2012; de Castro Oliveira, et al., 2017; de Medeiros, et al., 2011; Rodrigues, et al., 2013; Rodrigues, et al., 2015; Souza, et al., 2017).

Para se obter macrófagos peritoneais murinos, os animais com a idade de 4 a 6 semanas de vida, inicialmente devem ser eutanasiados sob aprovação do comitê de ética responsável por cada centro de pesquisa. Após eutanásia, os animais são afixados em uma superfície plana em decúbito dorsal, em seguida é realizada uma incisão no abdômen dos camundongos para que seja rebatida a pele da região ventral e exposto o peritônio. Independentemente do sexo, são aplicados 8 mL de solução isotônica de salina tamponada com fosfato (PBS – NaCl 145 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, pH 7,4) com o auxílio de agulha e seringa estéril na cavidade peritoneal, onde deve ser realizada uma leve massagem neste local para ser possível obtenção do máximo de células. Após retirada das células, prossegue-se com centrifugação a 3000 rpm, sob temperatura de 4 °C durante 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante deve ser descartado e o pellet ressuspenso em 1 mL de meio RPMI 1640 (suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina-estreptomicina 10.000 UI/10 mg) para prosseguir com a contagem das células em câmara de Neubauer, utilizando como diluidor do cálculo o corante azul de Trypan (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Para cada protocolo utilizado as células devem ser incubadas em estufa a 37 °C a 5% de CO<sub>2</sub> na quantidade de 2 x 10<sup>5</sup> por poço, em placas de cultivo celular de 96 poços (Alves, et al., 2017; de Castro Oliveira, et al., 2017)

### 2.2 Preparo de soluções

A solução estoque de corante vermelho neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) é obtida pela solubilização de 0,002 g do corante em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A solução de extração utilizada consiste de ácido acético glacial 96% (1% v/v) e etanol PA (50% v/v) dissolvidos em água bidestilada. O zimosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) corado para os ensaios de capacidade fagocítica é obtido pela diluição de 0,3 mL da solução estoque de vermelho neutro e 0,02 g de zimosan em 3 mL de PBS, já o fixador é o de Baker formol-cálcio constituído por formaldeído 4% v/v, cloreto de sódio 2% p/v e acetato de cálcio 1% p/v em água destilada (Grando, et al., 2009).

### 2.3 Avaliação da capacidade fagocítica

Macrófagos são plaqueados e incubados em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 4 h conforme item 2.1. Após esse período o sobrenadante é removido para retirar as células que não aderiram na placa e em seguida adiciona-se a droga teste em concentrações

seriadas (800-6,25  $\mu\text{g/mL}$ ) (Alves, et al., 2017). Após 48 h de incubação em estufa a 37  $^{\circ}\text{C}$  e a 5% de  $\text{CO}_2$ , acrescenta-se 10  $\mu\text{L}$  de solução de zimosan corado e incuba-se por 30 min a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Após este procedimento, adiciona-se 100  $\mu\text{L}$  de fixador de Baker para paralisar o processo de fagocitose e, 30 min após, a placa é lavada com solução salina 0,9 % a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitados pelos macrófagos. Remove-se o sobrenadante, adiciona-se 100  $\mu\text{L}$  de solução de extração onde é submetida a agitação leve por 10 minutos. As absorbâncias devem ser lidas a 550 nm (fig 2)

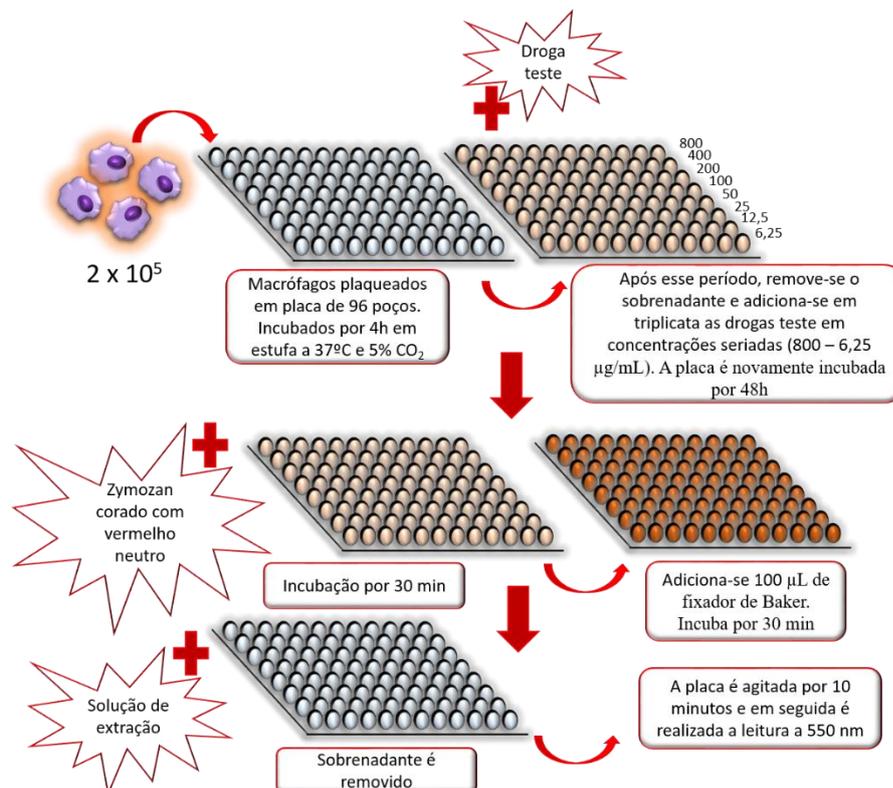


Fig 2: Fagocitose de partículas de zimosan por macrófagos submetidos à tratamento por drogas teste. Os macrófagos são incubados por 48 h à temperatura de 37  $^{\circ}\text{C}$  em estufa a 5% de  $\text{CO}_2$ , na ausência e na presença de diferentes concentrações de drogas teste, e posteriormente, são adicionados 10  $\mu\text{L}$  de zimosan corado. A fagocitose das partículas de zimosan é determinada colorimetricamente após a solubilização com solução de extração.

Os macrófagos desempenham diversas funções, incluindo fagocitose, citotoxicidade tumoral, secreção de citocinas e apresentação de antígenos. Eles representam uma linha de defesa contra patógenos e células tumorais reconhecendo e destruindo-as (Klimp, de Vries, Scherphof, & Daemen, 2002; Peters, Gieseler, Thiele, & Steinbach, 1996; Young & Hardy, 1995). Caracteristicamente, macrófagos ativados demonstram aumento das capacidades de adesão e espraiamento, estimulação da síntese de DNA, aumento de cálcio intracelular, modificação na secreção de citocinas, aumento de níveis de enzimas lisossomais, aumento de atividade microbicida/tumoricida pelo aumento de NO e de espécies reativas do oxigênio (EROs), aumento de *ruffles* de membrana que melhora o desempenho de funções como a locomoção e a fagocitose (Cleary, Kelly, & Husband, 1999). Os macrófagos que são ativados e capazes de resolver infecções por patógenos intracelulares mediante estímulo por drogas que atuam nesse

âmbito possuem característica de alterar a sua morfologia tornando-se com aspecto fusiforme, devido à sua adesão e espraiamento (Fig 3) para aumentar sua área total e fagocitar mais patógenos (Alves, et al., 2017).

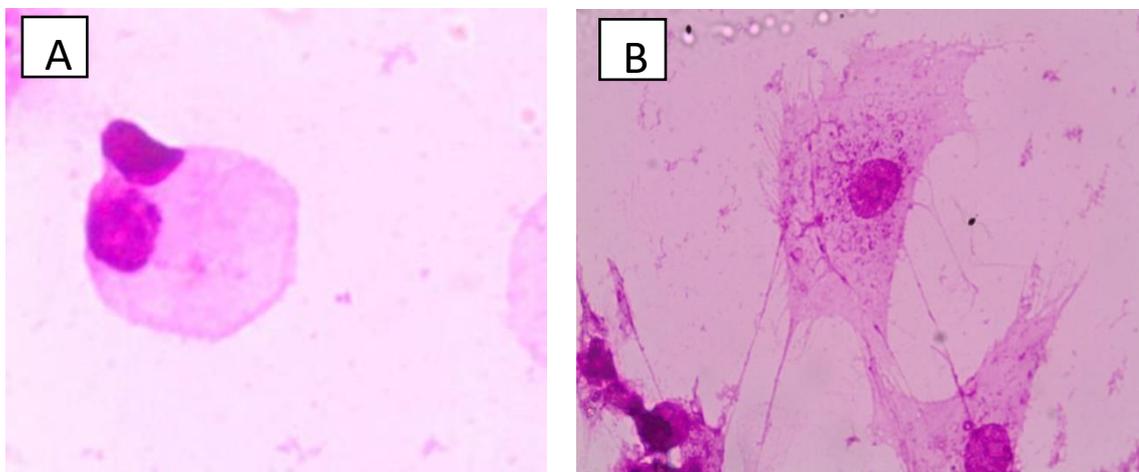


Fig 3. Macrófago sem estímulo por drogas que o ativam (A) e espraiado (B) após o estímulo de prospecção com drogas derivadas de produtos naturais. O espraiamento se deve à sua ativação da capacidade fagocítica.

#### 2.4 Avaliação da atividade lisossomal

Macrófagos são plaqueados e incubados em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 4 h conforme item 2.1. Após esse período o sobrenadante é removido para retirar as células que não aderiram na placa e em seguida adiciona-se a droga teste em concentrações seriadas (800-6,25 µg/mL) (Alves, et al., 2017). Após 48 h de incubação em estufa a 37 °C e a 5% de CO<sub>2</sub>, acrescenta-se 10 µL de solução de vermelho neutro a 2% de DMSO e incuba-se por 30 min a 37 °C. Após este procedimento remove-se o sobrenadante, adiciona-se 100 µL de solução de extração, após 30 min a placa é submetida a agitação leve por 10 minutos. As absorbâncias devem ser lidas a 550 nm (fig4)

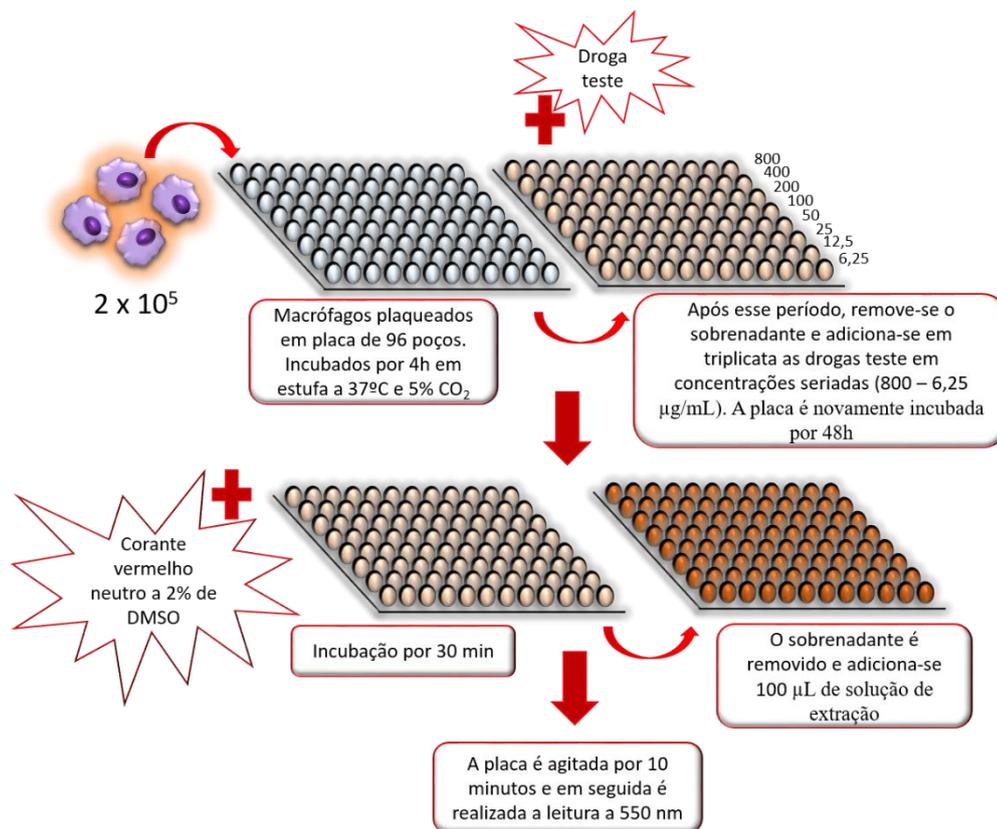


Fig 4: Atividade lisossomal de macrófagos submetidos à tratamento por drogas teste. Os macrófagos são incubados por 48 h à temperatura de 37 °C em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>, na ausência e na presença de diferentes concentrações de drogas teste, e posteriormente, são adicionados 10 µL de vermelho neutro a 2% de DMSO. O vermelho neutro retido nas vesículas de secreção é solubilizado com solução de extração e determinado colorimetricamente.

A fagocitose e o sistema lisossomal são críticos para as funções dos macrófagos, onde ocorre internalização, processamento e apresentação de antígenos derivados de patógenos à células específicas do sistema imune, a fim de proteger o hospedeiro. Após a endocitose do patógeno, o fagossomo recentemente criado sofre eventos sequenciais de fusão com endossomas e depois com lisossomas para produzir um fagolisossoma (Niedergang & Chavrier, 2004). O fagolisossoma é um compartimento cheio de hidrolases ácidas e ERO's onde ocorre a maior parte de degradação do conteúdo englobado. Drogas que atuam ativando macrófagos neste alvo, são capazes iduzir essas células a destruírem patógenos internalizados em seus fagolisossomos, além de auxiliar com *up-regulation* na apresentação de antígeno (Greenberg & Grinstein, 2002; Lee, Harrison, & Grinstein, 2003; Niedergang & Chavrier, 2004)

## 2.5 Avaliação da produção de nitrito

Macrófagos são plaqueados e incubados em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 4 h conforme item 2.1. Após esse período o sobrenadante é removido para retirar as células que não aderiram na placa e em seguida adiciona-se a droga teste em concentrações seriadas (800-6,25 µg/mL) (Alves, et al., 2017). Transcorrido 24 h de incubação a 37 °C

e 5% de CO<sub>2</sub>, transfere-se os sobrenadantes do cultivo celular para outra placa de 96 poços para a dosagem de nitrito (fig5). A curva-padrão para dosagem de nitrito é preparada com nitrito de sódio em água Milli-Q® à concentrações variadas de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 µM diluídos em meio RPMI 1640. No momento da dosagem mistura-se partes iguais das amostras ou das soluções preparadas para obtenção da curva-padrão com o mesmo volume do reagente de Griess (1% Sulfanilamida em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10% (v:v) em água Milli-Q®, adicionados em partes iguais a 0,1% naftilenodiamino em água Milli-Q®) e procede-se a leitura das absorbâncias a 550 nm. (Alves, et al., 2017; Grando, et al., 2009; Soares, Pereira, Meireles, & Saraiva, 2007).

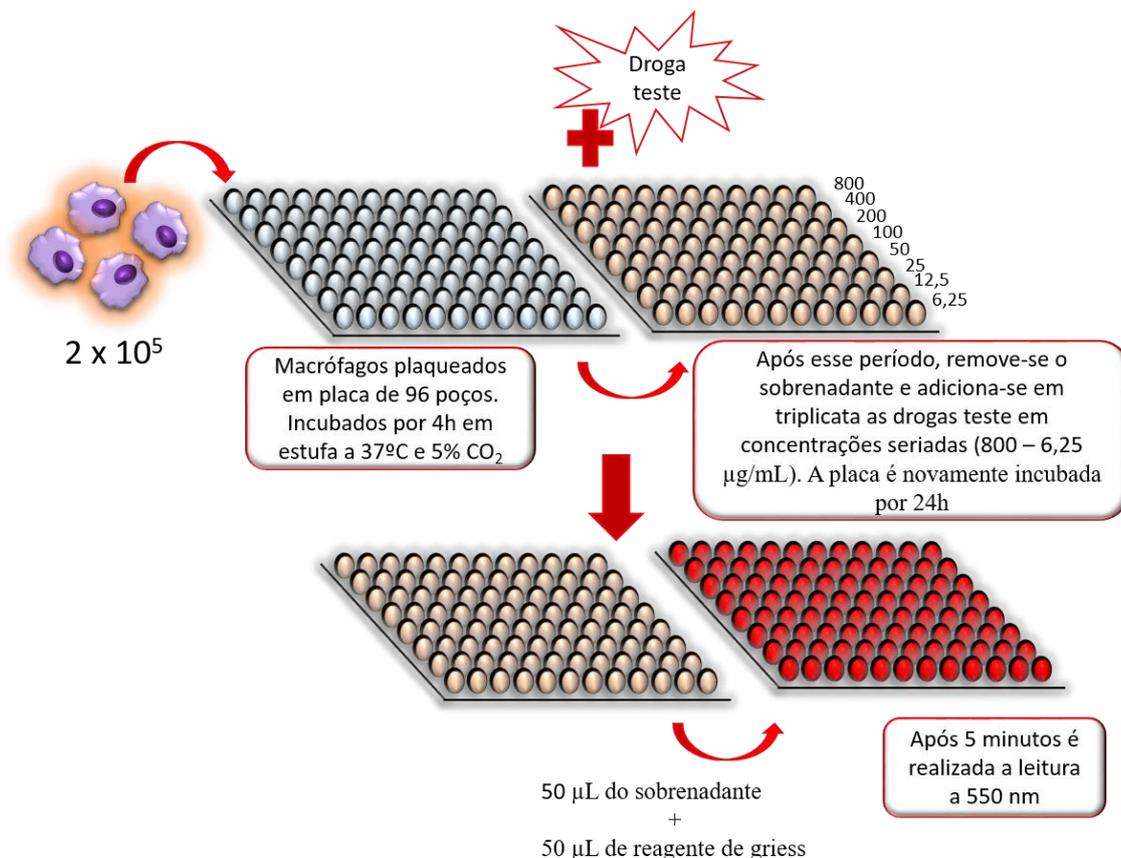


Fig 5. Dosagem colorimétrica de nitrito produzido por macrófagos tratados com drogas teste. Os macrófagos são incubados por 24 h à temperatura de 37 °C em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>, na ausência e na presença de diferentes concentrações de drogas teste, e posteriormente, são adicionadas partes iguais de reagente de Griess e do sobrenadante da placa. O óxido nítrico é dosado a partir da concentração de nitritos produzidos por macrófagos tratados.

Na atividade antileishmania, uma via importante que pode estar envolvida é a produção do NO pelos macrófagos. Ele é considerado, há muito tempo, como o mecanismo mais eficaz envolvido na defesa contra leishmania. Dentro dos fagolisossomo, o NO se combina com ânion superóxido, para produzir peroxinitrito, que é altamente reativo e microbicida (Bogdan & Rollinghoff, 1998; Valadares, et al., 2011). O parasito sobrevive dentro do macrófago mediante a habilidade de inibir a expressão ou atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) através da inibição da produção de

citocinas envolvidas na regulação da iNOS, inibição da síntese de NO por glicosilinositol, fosfolípídeos da superfície de amastigotas ou estímulo à produção do fator de transformação do crescimento TGF- $\beta$  (PARK et al., 2005). Drogas que ativam a via do NO, atuam ativando macrófagos por citocinas tais como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que aumentam a produção de óxido nítrico sintase, uma enzima que catalisa L-arginina para gerar NO e citrulina (Liew, Millott, Parkinson, Palmer, & Moncada, 1990). Uma vez dentro do fagolisossoma, o NO combina-se com o superóxido para produzir nitrito de peróxido, o qual é altamente reativo e atua como um microbicida (Bogdan & Rollinghoff, 1998; Ueda-Nakamura, et al., 2006).

## 2.6 Quantificação do cálcio intracelular em macrófagos

Os macrófagos são plaqueados e incubados a 37 ° C e 5% de CO<sub>2</sub> por 4 h, de acordo com o item 2.1, em placas de microscopia confocal com fundo de vidro de 35 mm de diâmetro. Após esse tempo, o sobrenadante é removido para remover as células não aderentes na placa e, em seguida, a droga teste é adicionada em concentrações seriadas (6,25 - 800  $\mu$ g / mL) (Alves, et al., 2017) em 300  $\mu$ L de meio RPMI contendo fluoróforo sensível ao cálcio (por exemplo, Fura-2 ou Fluo-3) a 10  $\mu$ M é adicionado e incubado por mais 30 min. As células devem ser lavadas duas vezes com PBS estéril para remover o fluoróforo em excesso e 1 mL de tampão HBSS adicionado a cada placa para experimentação. A imagem de cálcio é realizada por microscópio de epifluorescência ou confocal, equipado com filtros de 340/380 nm (excitação) e 525 nm (emissão), acoplado a uma câmera CCD de alta velocidade e software compatível (fig. 6). A concentração de cálcio citosólico (Ca<sup>2+</sup> + i) em cada macrófago, selecionados os ROIs, pode ser estimada pela aplicação da equação  $[Ca^{2+} + i] = Kd * (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ , onde Kd é a constante de dissociação do fluoróforo utilizado, F é a intensidade de fluorescência variável, F<sub>max</sub> e F<sub>min</sub> são, respectivamente, a fluorescência máxima e mínima obtida na presença de ionomicina (5  $\mu$ M) ou EGTA (20 mM) (Alves, et al., 2017).

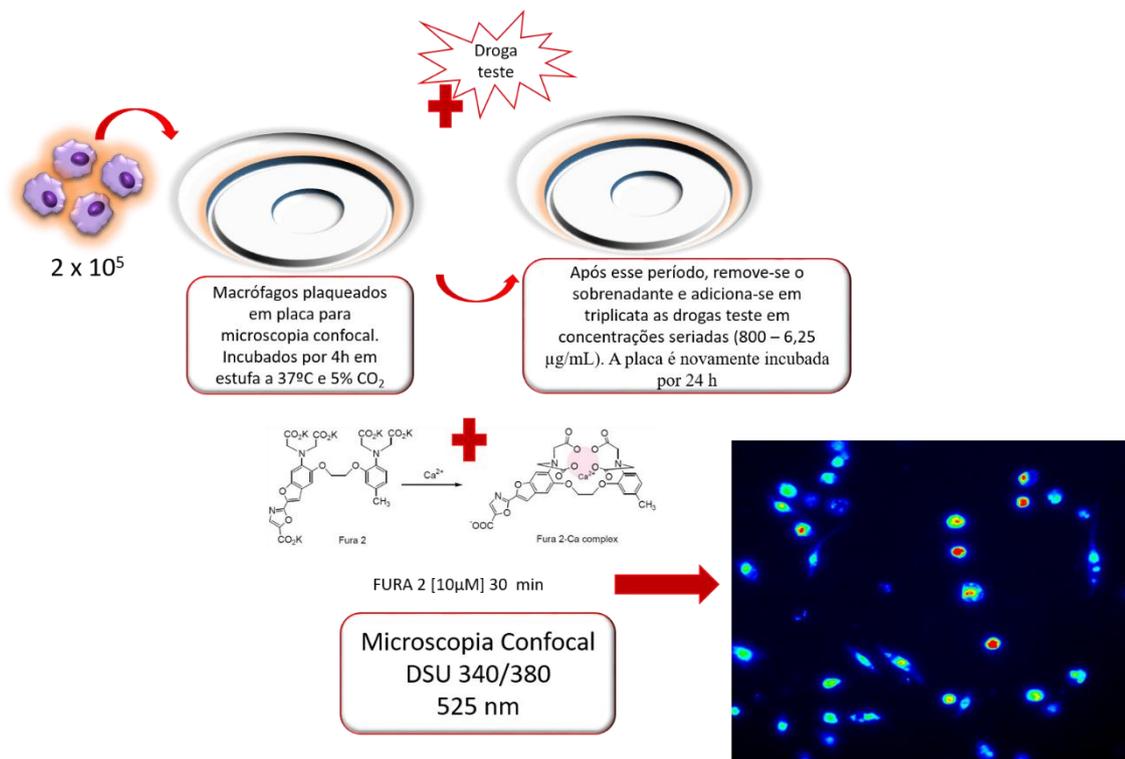


Fig 6. Quantificação de cálcio intracelular em macrófagos submetidos a estímulos por drogas teste. Análise realizada utilizando Fura-2/AM (10 µM) em microscopia de epifluorescência confocal (DSU Olympus, Japan).

As leishmanias internalizadas atuam em mecanismo de efluxo de cálcio no macrófago infectado. Tal mecanismo se remete ao aumento da expressão de dois portais envolvendo o cálcio, o PMCA4 que é o portal responsável pelo efluxo de cálcio para o meio extracelular e a SERCA3, responsável pela estocagem de cálcio para o retículo sarcoplasmático. Este mecanismo está continuamente em funcionamento para a homeostase celular, porém com a presença de amastigotas internalizadas ocorre o aumento da expressão de PMCA4 e SERCA3, promovendo a saída de cálcio para o meio extracelular e estocagem do mesmo para o retículo. Além de ser uma molécula microbicida o cálcio intracelular promove a ativação da via clássica da PKC, onde uma vez ativada promove a sinalização de citocinas pró-inflamatórias tais como (TNF- $\alpha$  e IL-4), que ao se encontrarem com o linfócito juntamente com o antígeno apresentado por células APC's pelas moléculas de MHC-II, ativam os linfócitos T *naive* (Th-0) diferenciando-os em linfócitos TCD4<sup>+</sup> que por sua vez passam a produzir e liberar INF- $\gamma$  para ativação de resposta imune celular Th-1 (Islamuddin, et al., 2015; Roy, et al., 2014). Uma vez aumentada a expressão de PMCA4 e SERCA3 pela presença do parasita, ocorre a diminuição de cálcio intracelular. Na pouca quantidade ou na ausência de cálcio uma outra via de sinalização é ativada, esta ainda pouco conhecida é através da proteína cinase zeta (PK $\zeta$ ). Sabe-se que esta via de sinalização promove a expressão de citocinas anti-inflamatórias tais como IL-10, que ativa os linfócitos T em resposta imunológica do tipo Th-2, ativando linfócitos B a produzir anticorpos (Roy, et al., 2014). Esta resposta Th-2 é o que mascara e promove a patogenia das leishmanioses nos hospedeiros infectados

(Islamuddin, et al., 2015). A ação de novos fármacos sobre a via de aumento de cálcio intracelular está diretamente relacionada a essa via de sinalização (Alves, et al., 2017).

Outro fator envolvido de grande relevância, quando há presença significativa de cálcio intracelular em célula com patógeno internalizado, é a despolimerização da f-actina. A fagocitose por neutrófilos, macrófagos e outros fagócitos profissionais requer uma remodelação rápida da actina. A desagregação da F-actina, fagocitose e maturação do fagocitoma perifagosomal são processos dependentes de cálcio nos macrófagos quando interagem com agentes patogênicos para resolver infecções (Tejle, Magnusson, & Rasmusson, 2002).

### 3. Drogas com potencial ativador de macrófagos

Na tabela 1 está exposto uma variedade de drogas, derivadas de produtos naturais, plantas ou sintéticos que possuem a capacidade de ativar macrófagos nos parâmetros avaliados nesta abordagem.

Tabela 01: substâncias que ativam macrófagos em suas respectivas atividades.

Planta/substância	Atividade				Referência
	Fagocitose <sup>(1)</sup>	Lissossomal <sup>(2)</sup>	NO <sup>(3)</sup>	Ca <sup>++(4)</sup>	
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	X	-	-	-	(Carvalho, et al., 2017)
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	X	-		X	(Melo, et al., 2016)
<i>Syzygium cumini</i>	X	X	X	-	(Rodrigues, et al., 2015)
<i>Eugenia uniflora</i>	X	-	-	-	(Rodrigues, et al., 2013)
<i>Platonia insignis</i>	-	X	-	-	(Souza, et al., 2017)
<i>Limonia strumguyonianum</i>	-	X	X	-	(Krifa, Bouhleb, Ghedira-Chekir, & Ghedira, 2013)
Proanthocyanidins e estruturas análogas	-	-	X	-	(Kolodziej, et al., 2001)
Flavan-e-olgalocatechin tanino	-	-	X	-	(Kolodziej & Kiderlen, 2005)
<i>Allium sativum</i>	-	-	X	-	(Ghazanfari, et al., 2000; Ghazanfari, Hassan, & Khamesipour, 2006)
Quassin isolado de <i>Quassia amara</i>	-	-	X	-	(Bhattacharjee, et al., 2009)

<i>Pelargonium sidoides</i> DC	-	-	X	-	(Kayser, Kolodziej, & Kiderlen, 2001)
<i>Agaricus blazei</i>	-	-	X	-	(Valadares, et al., 2011; Valadares, et al., 2012)
Lupeol	X	X	-	-	(Souza, et al., 2017)
Ácido gálico	X	X	X	X	(Alves, et al., 2017)
Ácido elágico	X	X	X	X	(Alves, et al., 2017)
2,3 Dihidrobenzofurano	X	X	X	-	(de Castro Oliveira, et al., 2017)
$\alpha$ -pineno	X	X	X	-	(Rodrigues, et al., 2015)
Crotoxina	X	-	X	-	(Farias, et al., 2017)
Artemisina	-	-	X	-	(Islamuddin, et al., 2015)

<sup>1</sup>Aumento de atividade fagocítica; <sup>2</sup>Aumento de volume lisossomal; <sup>3</sup>Indução da síntese de óxido nítrico e <sup>4</sup>Aumento de cálcio intracelular.

O fato da doença ser uma imunopatologia (Paranaíba, et al., 2017) com tratamento convencional limitado, oneroso e com uma gama de efeitos adversos (Alizadeh, et al., 2008; Ashford, 2000), desde os ensaios pré clínicos, a busca de novas drogas com ação antileishmania, deve estar harmoniamente ligada também à capacidade dessas novas descobertas em atuar em sinergismo com a resposta immune do hospedeiro, através da ativação de macrófagos. Sendo este, o principal sinal de estabelecimento de resposta celular para controlar a parasitemia. Os macrófagos ativados são capazes de resolver a infecção e controlar sua disseminação (Alves, et al., 2017).

#### 4. CONCLUSÃO

Portanto, os protocolos de ativação de macrófagos como a avaliação da capacidade fagocítica, atividade lisossomal, produção de nitrito e cálcio intracelular, são importantes ferramentas para descoberta de moléculas imunomoduladoras que visam sinergismo com a resposta imune do hospedeiro. Tais moléculas podem ser promissoras no enfrentamento da doença como monoterapia e também podem ser utilizadas como adjuvantes em vacinas e/ou associadas a fármacos convencionais.

## 5. Referências

- Alizadeh, B. H., Foroumadi, A., Ardestani, S. K., Poorrajab, F., & Shafiee, A. (2008). Leishmanicidal evaluation of novel synthetic chromenes. *Arch Pharm (Weinheim)*, *341*, 787-793.
- Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., & den Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, *7*, e35671.
- Alves, M. M. M., Brito, L. M., Souza, A. C., Queiroz, B., de Carvalho, T. P., Batista, J. F., Oliveira, J., de Mendonca, I. L., Lira, S. R. S., Chaves, M. H., Goncalves, J. C. R., Carneiro, S. M. P., Arcanjo, D. D. R., & Carvalho, F. A. A. (2017). Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *390*, 893-903.
- Ashford, R. W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, *30*, 1269-1281.
- Bhattacharjee, S., Gupta, G., Bhattacharya, P., Mukherjee, A., Mujumdar, S. B., Pal, A., & Majumdar, S. (2009). Quassin alters the immunological patterns of murine macrophages through generation of nitric oxide to exert antileishmanial activity. *J Antimicrob Chemother*, *63*, 317-324.
- Bogdan, C., & Rollinghoff, M. (1998). The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol*, *28*, 121-134.
- Carneiro, S. M., Carvalho, F. A., Santana, L. C., Sousa, A. P., Neto, J. M., & Chaves, M. H. (2012). The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). *Biol Res*, *45*, 111-116.
- Carvalho, C. E., Sobrinho-Junior, E. P., Brito, L. M., Nicolau, L. A., Carvalho, T. P., Moura, A. K., Rodrigues, K. A., Carneiro, S. M., Arcanjo, D. D., Cito, A. M., & Carvalho, F. A. (2017). Anti-*Leishmania* activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action. *Exp Parasitol*, *175*, 59-67.
- Cleary, J. A., Kelly, G. E., & Husband, A. J. (1999). The effect of molecular weight and beta-1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)-beta-D-glucan. *Immunol Cell Biol*, *77*, 395-403.
- de Castro Oliveira, L. G., Brito, L. M., de Moraes Alves, M. M., Amorim, L. V., Sobrinho-Junior, E. P., de Carvalho, C. E., da Franca Rodrigues, K. A., Arcanjo, D. D., das Gracas Lopes Cito, A. M., & de Amorim Carvalho, F. A. (2017). In Vitro Effects of the Neolignan 2,3-Dihydrobenzofuran Against *Leishmania Amazonensis*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, *120*, 52-58.
- de Medeiros, M., da Silva, A. C., Cito, A. M., Borges, A. R., de Lima, S. G., Lopes, J. A., & Figueiredo, R. C. (2011). In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitol Int*, *60*, 237-241.
- Dolai, S., Yadav, R. K., Pal, S., & Adak, S. (2009). Overexpression of mitochondrial *Leishmania major* ascorbate peroxidase enhances tolerance to oxidative stress-induced programmed cell death and protein damage. *Eukaryot Cell*, *8*, 1721-1731.
- Dumas, C., Ouellette, M., Tovar, J., Cunningham, M. L., Fairlamb, A. H., Tamar, S., Olivier, M., & Papadopolou, B. (1997). Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J*, *16*, 2590-2598.
- Farias, L. H. S., Rodrigues, A. P. D., Coelho, E. C., Santos, M. F., Sampaio, S. C., & Silva, E. O. (2017). Crotoxin stimulates an M1 activation profile in murine macrophages during *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology*, *144*, 1458-1467.
- Ghazanfari, T., Hassan, Z. M., Ebtekar, M., Ahmadiani, A., Naderi, G., & Azar, A. (2000). Garlic induces a shift in cytokine pattern in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *Scand J Immunol*, *52*, 491-495.

- Ghazanfari, T., Hassan, Z. M., & Khamesipour, A. (2006). Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against *Leishmania major* by garlic (*Allium sativum*) treatment. *J Ethnopharmacol*, *103*, 333-337.
- Gill, J., Malin, M., Sutherland, J., Gray, D., Hollander, G., & Boyd, R. (2003). Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev*, *195*, 28-50.
- Grando, F. C., Felicio, C. A., Twardowschy, A., Paula, F. M., Batista, V. G., Fernandes, L. C., Curi, R., & Nishiyama, A. (2009). Modulation of peritoneal macrophage activity by the saturation state of the fatty acid moiety of phosphatidylcholine. *Braz J Med Biol Res*, *42*, 599-605.
- Greenberg, S., & Grinstein, S. (2002). Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol*, *14*, 136-145.
- Gurunathan, S., Stobie, L., Prussin, C., Sacks, D. L., Glaichenhaus, N., Iwasaki, A., Fowell, D. J., Locksley, R. M., Chang, J. T., Wu, C. Y., & Seder, R. A. (2000). Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *J Immunol*, *165*, 915-924.
- Harhay, M. O., Oliario, P. L., Costa, D. L., & Costa, C. H. (2011). Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*, *27*, 403-409.
- Islamuddin, M., Chouhan, G., Farooque, A., Dwarakanath, B. S., Sahal, D., & Afrin, F. (2015). Th1-biased immunomodulation and therapeutic potential of *Artemisia annua* in murine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, *9*, e3321.
- Kayser, O., Kolodziej, H., & Kiderlen, A. F. (2001). Immunomodulatory principles of *Pelargonium sidoides*. *Phytother Res*, *15*, 122-126.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., & Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol*, *9*, 833-844.
- Klimp, A. H., de Vries, E. G., Scherphof, G. L., & Daemen, T. (2002). A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, *44*, 143-161.
- Kolodziej, H., Kayser, O., Kiderlen, A. F., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., & Foo, L. Y. (2001). Proanthocyanidins and related compounds: antileishmanial activity and modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$ -release in the murine macrophage-like cell line RAW 264.7. *Biol Pharm Bull*, *24*, 1016-1021.
- Kolodziej, H., & Kiderlen, A. F. (2005). Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells. *Phytochemistry*, *66*, 2056-2071.
- Kondrashin, A. V., Baranova, A. M., Morozova, L. F., & Stepanova, E. V. (2011). [Global trends in malaria control. Progress and topical tasks in malaria control programs]. *Med Parazitol (Mosk)*, 3-8.
- Krifa, M., Bouhleb, I., Ghedira-Chekir, L., & Ghedira, K. (2013). Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of an aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall. *J Ethnopharmacol*, *146*, 243-249.
- Lee, W. L., Harrison, R. E., & Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect*, *5*, 1299-1306.
- Liew, F. Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R. M., & Moncada, S. (1990). Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol*, *144*, 4794-4797.
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*, *2012*, 925135.
- Melo, B. N., Leitao, J. M., Oliveira, L. G., Santos, S. E., Carneiro, S. M., Rodrigues, K. A., Chaves, M. H., Arcanjo, D. D., & Carvalho, F. A. (2016). Inhibitory effects of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) against the infection and infectivity of macrophages by *Leishmania amazonensis*. *An Acad Bras Cienc*, *88*, 1851-1861.

- Mitropoulos, P., Konidas, P., & Durkin-Konidas, M. (2010). New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol*, *63*, 309-322.
- Naderer, T., & McConville, M. J. (2008). The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol*, *10*, 301-308.
- Niedergang, F., & Chavrier, P. (2004). Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr Opin Cell Biol*, *16*, 422-428.
- Paranaíba, L. F., Pinheiro, L. J., Macedo, D. H., Menezes-Neto, A., Torrecilhas, A. C., Tafuri, W. L., & Soares, R. P. (2017). An overview on Leishmania (Mundinia) enriettii: biology, immunopathology, LRV and extracellular vesicles during the host-parasite interaction. *Parasitology*, 1-9.
- Peters, J. H., Gieseler, R., Thiele, B., & Steinbach, F. (1996). Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today*, *17*, 273-278.
- Rodrigues, K. A., Amorim, L. V., de Oliveira, J. M., Dias, C. N., Moraes, D. F., Andrade, E. H., Maia, J. G., Carneiro, S. M., & Carvalho, F. A. (2013). Eugenia uniflora L. Essential Oil as a Potential Anti-Leishmania Agent: Effects on Leishmania amazonensis and Possible Mechanisms of Action. *Evid Based Complement Alternat Med*, *2013*, 279726.
- Rodrigues, K. A., Amorim, L. V., Dias, C. N., Moraes, D. F., Carneiro, S. M., & Carvalho, F. A. (2015). Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent alpha-pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. *J Ethnopharmacol*, *160*, 32-40.
- Roy, N., Chakraborty, S., Paul Chowdhury, B., Banerjee, S., Halder, K., Majumder, S., Majumdar, S., & Sen, P. C. (2014). Regulation of PKC mediated signaling by calcium during visceral leishmaniasis. *PLoS One*, *9*, e110843.
- Soares, D. C., Pereira, C. G., Meireles, M. A., & Saraiva, E. M. (2007). Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from Tabernaemontana catharinensis. *Parasitol Int*, *56*, 135-139.
- Souza, A. C., Alves, M. M. M., Brito, L. M., Oliveira, L. G. C., Sobrinho-Junior, E. P. C., Costa, I. C. G., Freitas, S. D. L., Rodrigues, K., Chaves, M. H., Arcanjo, D. D. R., & Carvalho, F. A. A. (2017). Platania insignis Mart., a Brazilian Amazonian Plant: The Stem Barks Extract and Its Main Constituent Lupeol Exert Antileishmanial Effects Involving Macrophages Activation. *Evid Based Complement Alternat Med*, *2017*, 3126458.
- Tejle, K., Magnusson, K. E., & Rasmusson, B. (2002). Phagocytosis and phagosome maturation are regulated by calcium in J774 macrophages interacting with unopsonized prey. *Biosci Rep*, *22*, 529-540.
- Ueda-Nakamura, T., Mendonça-Filho, R. R., Morgado-Diaz, J. A., Korehisa Maza, P., Prado Dias Filho, B., Aparicio Garcia Cortez, D., Alviano, D. S., Rosa Mdo, S., Lopes, A. H., Alviano, C. S., & Nakamura, C. V. (2006). Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from Ocimum gratissimum. *Parasitol Int*, *55*, 99-105.
- Valadares, D. G., Duarte, M. C., Oliveira, J. S., Chavez-Fumagalli, M. A., Martins, V. T., Costa, L. E., Leite, J. P., Santoro, M. M., Regis, W. C., Tavares, C. A., & Coelho, E. A. (2011). Leishmanicidal activity of the Agaricus blazei Murill in different Leishmania species. *Parasitol Int*, *60*, 357-363.
- Valadares, D. G., Duarte, M. C., Ramirez, L., Chavez-Fumagalli, M. A., Lage, P. S., Martins, V. T., Costa, L. E., Ribeiro, T. G., Regis, W. C., Soto, M., Fernandes, A. P., Tavares, C. A., & Coelho, E. A. (2012). Therapeutic efficacy induced by the oral administration of Agaricus blazei Murill against Leishmania amazonensis. *Parasitol Res*, *111*, 1807-1816.
- Waldron, L. S., Ferrari, B. C., Cheung-Kwok-Sang, C., Beggs, P. J., Stephens, N., & Power, M. L. (2011). Molecular epidemiology and spatial distribution of a waterborne cryptosporidiosis outbreak in Australia. *Appl Environ Microbiol*, *77*, 7766-7771.
- Young, H. A., & Hardy, K. J. (1995). Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol*, *58*, 373-381.

## **CAPÍTULO 02:**

### **ÁCIDO GÁLICO E ÁCIDO ELÁGICO: PROMISSORES ADJUVANTES A ANFOTERICINA B CONVENCIONAL PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE**

**Revista: PLoS Neglected Tropical Diseases**

## Ácido gálico e ácido elágico: Promissores adjuvantes a Anfotericina B convencional para o tratamento da leishmaniose

### RESUMO

Neste estudo demonstramos o potencial efeito de associação de anfotericina B (Anf B) convencional e ácido gálico (AG) ou ácido elágico (AE) em formulação tópica de Gel de Polaxamer 407<sup>®</sup> para tratamento tópico da leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c. O AG e o AE são dois compostos naturais anteriormente estudados por nosso grupo cuja ação antileishmania e potencial ativador de macrófagos já foi reportada. Foram realizados testes de estabilidade preliminar e cinética de liberação *in vitro* dos fármacos nas formulações de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE na composição e tratamento *in vivo* de camundongos BALB/c infectados por *L. major*. Passados 40 dias da infecção, os animais foram divididos em 6 grupos, tratados 2x/dia, durante 21 dias com os géis de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE e o grupo controle negativo tratado com o veículo (polaxamer 407<sup>®</sup>). Os animais foram avaliados clinicamente mensurando-se o tamanho das lesões 1x/semana. Ao término do tratamento e após 14 dias, os animais foram eutanasiados para avaliação *ex vivo* quanto à redução da carga parasitária no local da lesão, análise histopatológica e ativação de resposta imune celular, com a retirada de macrófagos peritoneais para avaliar sua ativação por capacidade fagocítica, atividade lisossomal, quantificação de nitrito e cálcio intracelular. Também foi realizado a infecção *in vitro* dos macrófagos peritoneais para avaliar o número de amastigotas sobreviventes e o percentual de macrófagos infectados, bem como avaliação da toxicidade hepática e renal através da dosagem sérica das enzimas ALT, UR e CR. As formulações não apresentaram alterações no teor dos fármacos para o estresse térmico e discretas alterações nos outros parâmetros. A formulação com AG apresentou a maior porcentagem liberada, seguido de AE e das formulações combinadas de Anf B + AG e de Anf B + AE. Houve efeito de associação entre Anf B e AG e Anf B e AE em todos os ensaios realizados. Nos animais que receberam tratamento houve redução do tamanho da lesão e redução da carga parasitária. Observou-se na análise histopatológica dos tratamentos com AG, AE e Anf B associada, lesão circunscrita com presença de fibroblastos, tecido de granulação e deposição de colágeno, além da presença de macrófagos ativados e eosinófilos. As formulações contendo AG e AE ativaram macrófagos em todos os parâmetros avaliados, bem como reduziram a quantidade de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófago, resultando, portanto, em ativação de células da resposta imune inata, o que pode gerar cura e proteção. Não foram detectados sinais de toxicidade renal e hepática. O AG e AE produziram efeito de associação com a Anf B, o que os torna promissores em conjunto com Anf B convencional no tratamento da leishmaniose cutânea.

**Palavras-chave:** Produtos naturais, compostos fenólicos, ativação de macrófagos, associação de drogas, gel.

## ABSTRACT

In this study we demonstrated the potential association effect of conventional amphotericin B (Anf B) and gallic acid (GA) or ellagic acid (EA) on topical formulation of Polaxamer 407® Gel for topical treatment of cutaneous leishmaniasis in BALB / c mice. GA and EA are two natural compounds previously studied by our group whose antileishmania action and macrophage activator potential has already been reported. Preliminary stability and kinetics of in vitro release of the drugs in the formulations of Anf B, GA, Anf B + GA, EA and Anf B + EA in the composition and in vivo treatment of *L. major* BALB / c mice were performed. After 40 days of infection, the animals were divided into 6 groups, treated 2x / day for 21 days with the gels of Anf B, GA, Anf B + GA, EA and Anf B + EA and the negative control group treated with vehicle (polaxamer 407®). The animals were evaluated clinically by measuring the lesion size 1x / week. At the end of treatment and after 14 days, the animals were euthanized for ex vivo evaluation to reduce the parasite load at the lesion site, histopathological analysis and activation of cellular immune response, with the removal of peritoneal macrophages to evaluate their activation by phagocytic capacity, lysosomal activity, quantification of nitrite and intracellular calcium. In vitro infection of peritoneal macrophages was also performed to evaluate the number of surviving amastigotes and the percentage of infected macrophages, as well as the evaluation of liver and renal toxicity by serum ALT, UR and CR. The formulations showed no changes in the drug content for thermal stress and slight changes in the other parameters. The formulation with GA presented the highest percentage released, followed by AE and the combined formulations of Anf B + GA and Anf B + EA. There was an association effect between Anf B and AG and Anf B and AE in all the tests performed. In the animals that received treatment there was reduction of the size of the lesion and reduction of the parasitic load. In the histopathological analysis of the treatments with GA, EA and associated Anf B, circumscribed lesion with presence of fibroblasts, granulation tissue and collagen deposition, in addition to the presence of activated macrophages and eosinophils. The formulations containing GA and EA activated macrophages in all evaluated parameters, as well as reduced the amount of infected macrophages and the number of amastigotes by macrophage, resulting, therefore, in the activation of cells of the innate immune response, which can generate healing and protection . No signs of renal and hepatic toxicity were detected. GA and EA produced a synergistic effect with Anf B, which makes them promising adjuncts in association with conventional Anf B in the treatment of cutaneous leishmaniasis.

**Key words:** Natural products, phenolic compounds, macrophage activation, drug association, gel.

## INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes ao grupo de doenças tropicais negligenciadas [1]. Endêmica em 98 países, a doença acomete 12 milhões de pessoas em todo o mundo e o tamanho da população em risco é de 350 milhões. Estima-se que 1,5 milhões de novos casos surgem a cada ano [1-3]

Amplamente distribuída, a doença atinge o Oriente Médio, África e parte das Américas. A infecção se dá através do repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos, que vivem em áreas florestais, cavernas, tocas de roedores e também em áreas peridomiciliares [4,5] Dentre as formas de manifestação clínica (cutânea, mucocutânea e visceral), a forma cutânea é responsável por causar deformidades físicas nos pacientes, sendo a *Leishmania major* uma das principais espécies responsáveis por esse dissabor [5-7]. Devido à falta de uma vacina eficaz e as medidas de controle limitadas, o tratamento quimioterápico ainda é a principal forma de combate à doença [8].

Os medicamentos usados no tratamento são limitados, onerosos e possuem uma gama de efeitos colaterais, o que limita seu uso em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento [2,8,9]. Produtos naturais têm sido amplamente investigados na descoberta de novos bioativos antileishmania, que venham a possuir tanto atividade contra o parasita quanto capacidade de atuar em sinergismo com a resposta imune do hospedeiro. Portanto, a medicina natural e tradicional podem fornecer importantes alternativas de tratamento para a leishmaniose [10-14].

Ácido gálico (AG) e ácido elágico (AE) são dois compostos naturais derivado do metabolismo secundário de plantas, cujo potencial antileishmania e imunomodulador dessas moléculas foi anteriormente estudado por nosso grupo [15]. Dentre os vários fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose, a Anfotericina B (Anf B) é um antibiótico poliênico e considerado padrão-ouro no tratamento contra leishmaniose [16-18]. A atividade seletiva desta droga contra parasitas de *Leishmania* é devida a sua alta afinidade por esteróis 24-substituídos, que são predominantes na membrana plasmática desses microorganismos, em comparação ao colesterol presente na membrana das células dos mamíferos [19,20]. No entanto, o uso de Anf B foi limitado por seus efeitos colaterais tóxicos, em especial, cardio e nefrotoxicidade, além de provocar mialgia, artralgia, anorexia, febre e urticária; bem como toxicidade hepática, esplênica e renal, revelada por exames laboratoriais anormais, como uréia, creatinina, enzimas aspartato

aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) [9,21,22]. O desenvolvimento de sistemas de liberação de Anf B em formulações lipídicas reduziu sua toxicidade, e essas novas tecnologias foram melhor explorados contra a doença [23].

A descoberta de drogas é um processo caro que requer uma média de 10 a 20 anos, além de um investimento de mais de US \$ 1,0 bilhão antes que um novo composto, com atividade contra um alvo específico, possa ser liberada para o uso clínico [24]. Como consequência, sistemas de liberação que transportam medicamentos convencionais podem melhorar a eficácia destes compostos e, conseguinte, reduzir seus efeitos adversos [25]. Concomitantemente a esses sistemas, a combinação entre drogas pode proporcionar potencial sinergismo e sucesso terapêutico no enfrentamento dessa doença, sendo uma das abordagens mais promissoras para o desenvolvimento de novas formulações antileishmania [26,27].

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial terapêutico de formulações tópicas de Anf B, AG, AE e o efeito terapêutico e imunomodulador da associação de Anf B + AG e Anf B + AE veiculadas em gel de Polaxamer 407<sup>®</sup>, utilizando camundongos BALB/c como modelo experimental [17,28].

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Substâncias utilizadas**

Meio de cultura Schneider's, meio RPMI, Soro fetal bovino (SFB) e os antibióticos Penicilina e Estreptomicina foram adquiridos da Sigma Chemical (Sigma-Aldrich Brasil). Ácido Gálico (AG), Ácido Elágico (AE) foram adquiridos da Alfa Aesar (Brasil). O FLUO-3-AM foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA). O antibiótico Anfotericina B e os anestésicos Tiopental e Lidocaína, foi adquiridos da Cristália (São Paulo, SP). O Polaxamer 407<sup>®</sup> e o propilenoglicol foram obtidos da ChemSpecs e Dinâmica, respectivamente.

### **Preparo e estabilidade preliminar de gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE**

Para a obtenção do gel de Anf B, AG, AG + Anf B, AE e AE + Anf B o Polaxamer 407<sup>®</sup> foi hidratado sob refrigeração por 24 horas (over night). Na sequência, os fármacos foram incorporados por levigação com propilenoglicol (aprox. 20%). Após 24 horas do preparo das formulações, observou-se macroscopicamente a homogeneização e estabilização das formulações [29,30]. Utilizou-se a concentração de 3% para a

formulação de Anf B, AG e AE [31]; para as formulações de Anf B + AG ou Anf B + AE essa concentração foi reduzida para 1,5% de cada composto no intuito de se avaliar o efeito da associação.

O estudo de estabilidade preliminar foi realizado por meio da análise dos seguintes parâmetros: características organolépticas, pH, condutividade elétrica e teor. Na análise organoléptica das formulações, foram observados o seu aspecto, cor, homogeneidade e processos de instabilidade como separação de fase. Os parâmetros foram analisados no início dos estudos (TO) e logo em seguida aos testes de estresse térmico e ciclo gelo-degelo.

As amostras para o estresse térmico foram submetidas às temperaturas no intervalo entre 40-80°C, com progressão de elevação de 10°C/30minutos em banho-maria termostaticado (Nova ética, Brasil). As formulações foram avaliadas ao término do período de 80°C, após as preparações retornarem à temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). As preparações para o ciclo gelo-degelo foram submetidas a  $-5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  em refrigerador (Electrolux, Brasil), por 24h, e  $50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 24h, em estufa (Icamo, Brasil), completando um ciclo. Ao final de 12 dias (6 ciclos), as formulações foram analisadas após retornarem à temperatura ambiente (25°C) [32]

#### **Cinética de liberação *in vitro* de gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE**

O estudo foi conduzido utilizando-se membranas de acetato de celulose em células de difusão tipo Franz com área difusional de  $1,77 \text{ cm}^2$  e volume de  $\pm 15 \text{ mL}$ . O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato pH 7,4 associado a 20% de EtOH num sistema composto por células individuais ( $32 \pm 0,5$  °C, 100 rpm). Aplicou-se 200 mg de formulação no compartimento receptor diretamente sobre a membrana. As amostras da solução receptora foram coletadas nos tempos 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6 h. As leituras das alíquotas coletadas foram realizadas em UV/Vis  $\lambda=266,6 \text{ nm}$  para AG,  $363,4 \text{ nm}$  para AE e  $405,4 \text{ nm}$  para Anf B. O volume total da fase receptora foi substituído a cada amostragem para reposição do meio e manutenção das condições *sink* [32]

#### **Parasitas e animais**

Utilizou-se camundongos fêmeas da espécie *Mus musculus* linhagem BALB/c, com idade de 6 a 8 semanas e peso entre 20 e 25 gramas, alocados no biotério setorial localizado no Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos sob condições de controle de temperatura a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro-escuro de 12 horas com água e ração *ad libitum*.

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (CEEA/UFPI 265/16).

A *Leishmania major* MHOM/IL/80/Friedlin, foi obtida no Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais – NPPM-UFPI, mantidas por sucessivas passagens em camundongos BALB/c e replicadas em frascos de cultivo celular com meio de cultura de Schneider's (Sigma Chemical Co, St Louis, USA) inativado e solução de penicilina/estreptomicina (10.000 UI/mL e 50 µg/mL de estreptomicina Sigma Chemical Co, St Louis, USA) e mantidas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  [33,34]

### **Infecção dos camundongos BALB/c por *L. major* e tratamento com os géis tópicos**

Os animais foram tricotomizados na região da base da cauda e infectados com formas promastigotas de *L. major* na fase estacionária de crescimento, onde predominavam as formas metacíclicas infectantes. O inóculo foi preparado diluindo-se os parasitas em solução salina estéril (NaCl 0,9%) na quantidade de  $1 \times 10^6$  leishmanias / animal num volume de 50 µL.

Decorridos 40 dias após a infecção, observou-se o início do desenvolvimento das lesões leishmaniótica, nodulares ou ulcerativas, no sítio de inóculo. Os animais foram então divididos em seis grupos (n=8) de acordo com o tratamento a serem submetidos: grupo controle (grupo placebo, tratado com gel de Polaxamer<sup>®</sup> vazio), grupo Anf B 3%; grupo AG 3%; grupo Anf B 1,5% + AG 1,5%; grupo AE 3%; grupo Anf B 1,5% + AE 1,5% em gel de Polaxamer<sup>®</sup>.

Os animais foram tratados após esse período, duas vezes ao dia, durante vinte e um dias, com 50 µL da formulação tópica em cada aplicação indicada para cada grupo, utilizando-se um micropipetador automático. O volume aplicado foi suficiente para cobrir toda a área da lesão ulcerativa no início do tratamento.

A eutanásia para coleta de material biológico e avaliação dos ensaios *ex vivo* foi realizada em duas etapas (fig. 01): A primeira foi seguida após o término do tratamento, a segunda 14 dias após o término do tratamento.



**Figura 01: Esquema metodológico desse estudo.** Após a infecção os animais foram divididos em seus respectivos grupos e receberam tratamento tópico 2x/dia, durante 21 dias. Foram realizadas 2 eutanásias para avaliação dos resultados, a primeira imediatamente após o tratamento e a segunda 14 dias após o tratamento.

Para eutanásia, os animais receberam sobredose de Tiopental (150mg/kg) e Lidocaína (10mg/kg) por via intraperitoneal. Após observar a perda de reflexo de endireitamento, foi coletado amostra sangue do animal por via intracardíaca. O sangue foi destinado para avaliação do hematócrito e parâmetros bioquímicos. Em seguida, foram retirados fragmentos de pele da carga parasitária e exame histopatológico. também foram retirados macrófagos da cavidade peritoneal para realização dos testes de ativação de macrófagos: Capacidade fagocítica, atividade lisossomal, síntese de nitrito, quantificação de cálcio intracelular, bem como infecção *in vitro* por *L. major* para avaliação do número de macrófagos infectados e quantificação de amastigotas sobreviventes no interior dessas células.

#### **Avaliação clínica dos camundongos BALB/c infectados por *L. major* e tratados com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE**

Mensurou-se o peso dos animais durante e após tratamento. Os animais foram acompanhados por um Médico Veterinário antes, durante e após o tratamento por meio da observação diária das lesões e mensuração semanal do diâmetro da lesão ulcerativa/nódulo com um paquímetro (Messen®). Como parâmetro, foi tomado o diâmetro entre as bordas externas da úlcera no sentido perpendicular à linha dorsal e o diâmetro, entre as bordas externas, do eixo vertical coincidente a linha dorsal da lesão no animal. Após a realização das duas medidas, calculou-se a média do diâmetro.

Ao término do tratamento, os animais continuaram a ser acompanhados por um período de 14 dias tendo suas lesões mensuradas semanalmente para verificar possíveis alterações das mesmas.

#### **Avaliação da carga parasitária**

Fragmentos de pele da lesão leishmaniotica foram pesados e acrescentadas em meio Schneider's suplementado na proporção de 100 mg de tecido em 1000 µl. Após, foram triturados e centrifugados a 1500 RPM a 4°C durante 10 minutos. Retirou-se 20 µl do sobrenadante e diluiu-se em 180 µl de meio Schneider's suplementado para se obter a ordem logarítmica de  $10^{-2}$  e, a partir desta, foram realizadas diluições seriadas sucessivas em placa de cultivo de 96 poços, em duplicatas, conservando-se a mesma ordem de

grandeza, iniciando-se na diluição de  $10^{-2}$  e chegando a  $10^{-10}$ . Em seguida, as placas foram incubadas a  $26^{\circ}\text{C}$  e após cinco dias de cultivo, a presença ou não de formas promastigotas foram observadas em microscópio óptico, em avaliação diária durante o período de 14 dias [28].

### **Análise histopatológica**

As amostras de pele da lesão leishmaniotica foram fixadas em formaldeído tamponado a 10% e mantidos por um período mínimo de 48h.

Após a fixação dos fragmentos, as amostras foram conduzidas à rotina histológica habitual para posterior análise por microscopia de luz, que constitui nos processos de desidratação, clarificação, inclusão em parafina, emblocagem e microtomia. Após, com a utilização de micrótomo manual (Leica RM2235<sup>®</sup>) cortes de  $4,0\ \mu\text{m}$  foram confeccionados e aderidos em lâminas de vidro e, posteriormente, submetidos ao processo de diafanização (desparafinização) e reidratação em séries de xilol e álcool, e corados com Hematoxilina-Eosina [35].

### **Avaliação dos parâmetros de ativação de macrófagos**

#### *Preparo de soluções*

A solução estoque de corante vermelho neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi preparada pela solubilização de 0,002 g do corante em 1 mL de DMSO. A solução de extração utilizada para avaliação da capacidade fagocítica e atividade lisossomal constituiu-se de ácido acético glacial 96% (1% v/v) e etanol PA (50% v/v) dissolvidos em água bidestilada. O zimosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) para os ensaios de capacidade fagocítica foi obtido pela diluição de 0,3 mL da solução estoque de vermelho neutro e 0,02 g de zimosan em 3 mL de PBS, já o fixador utilizado foi o de Baker formol-cálcio constituído por formaldeído 4% (v/v), cloreto de sódio 2% (p/v) e acetato de cálcio 1% (p/v) em água destilada [36]

#### *Determinação da capacidade fagocítica*

Macrófagos peritoneais oriundos de animais normais e que foram infectados por *L. major* e tratados com as formulações tópicas previamente descritas foram plaqueados, diluídos em meio RPMI suplementado na quantidade de  $2 \times 10^5$  por poço em triplicata, numa placa de 96 poços e incubados em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  e a 5% de  $\text{CO}_2$ , durante 4h para total aderência das células. Após esse período, removeu-se o sobrenadante e acrescentou-se 100  $\mu\text{L}$  de RPMI e incubou-se novamente as placas nas mesmas condições *Overnight*. Passado esse período, acrescentou-se 10  $\mu\text{L}$  de solução de zimosan corado e incubou-se por 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após este procedimento, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de fixador de

Baker para interromper o processo de fagocitose e, 30 min depois, a placa foi lavada com salina 0,9 % a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitados pelos macrófagos. Removeu-se o sobrenadante, e adicionou-se 100 µL de solução de extração e, após solubilização em agitador de Kline, as absorbâncias foram lidas no leitor de placas Biotek (ELx800) a 550 nm [36].

#### *Avaliação da atividade lisossomal*

Macrófagos peritoneais oriundos de animais normais e que foram infectados por *L. major* e tratados com as formulações tópicas previamente descritas foram plaqueados, diluídos em meio RPMI suplementado na quantidade de  $2 \times 10^5$  por poço em triplicata, numa placa de 96 poços e incubados em estufa a 37 °C e a 5% de CO<sub>2</sub>, durante 4h para total aderência das células. Após esse período, removeu-se o sobrenadante e acrescentou-se 100 µL de RPMI e incubou-se novamente as placas nas mesmas condições *Overnight*. Após, acrescentou-se 10 µL de solução de vermelho neutro a 2% de DMSO e incubou-se por 30 min. Transcorrido esse tempo, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com salina 0,9% a 37 °C e adicionou-se 100 µL de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro presente no interior das vesículas de secreção lisossomais. Após 30 min em agitador de Kline, as absorbâncias foram lidas no leitor de placas Biotek (ELx800) a 550 nm Biotek (ELx800) a 550 nm. [37]

#### *Quantificação de nitrito*

Macrófagos peritoneais oriundos de animais normais e que foram infectados por *L. major* e tratados com as formulações tópicas previamente descritas foram plaqueados, diluídos em meio RPMI suplementado na quantidade de  $2 \times 10^5$  por poço em triplicata, numa placa de 96 poços e incubados em estufa a 37 °C e a 5% de CO<sub>2</sub>, durante 4h para total aderência das células. Após esse período, removeu-se o sobrenadante e acrescentou-se 100 µL de RPMI e incubou-se novamente as placas nas mesmas condições *Overnight*. Transcorrido esse tempo, transferiu-se os sobrenadantes do cultivo celular para outra placa de 96 poços para a dosagem de nitrito. A curva-padrão foi preparada com nitrito de sódio em meio RPMI à concentrações variadas de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 µM diluídos em meio RPMI. No momento da dosagem misturou-se partes iguais das amostras (sobrenadantes) ou das soluções preparadas para obtenção da curva-padrão com o mesmo volume do reagente de Griess (1% Sulfanilamida em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10% (v:v) em água Milli-Q®, adicionados em partes iguais a 0,1% naftilenodiamino em água Milli-Q®) e fez-se a leitura das absorbâncias em leitor de placas Biotek (ELx800) a 550 nm, o resultado foi plotado nas concentrações de nitrito em µM. [38].

### *Quantificação de cálcio citosólico*

Macrófagos peritoneais oriundos de animais normais e que foram infectados por *L. major* e tratados com as formulações tópicas previamente descritas foram plaqueados, diluídos em meio RPMI suplementado na quantidade de  $2 \times 10^5$  por poço em triplicata, numa placa de microscopia confocal e incubados em estufa a 37 °C e a 5% de CO<sub>2</sub>, durante 4h para total aderência das células. Após esse período, removeu-se o sobrenadante e acrescentou-se 100 µL de RPMI e incubou-se novamente as placas nas mesmas condições *Overnight*. Após esse período acrescentou-se o marcador de cálcio FLUO-3-AM na concentração de 10 µM e incubou-se novamente por 30 minutos. Em seguida, removeu-se todo o sobrenadante e acrescentou-se meio HBSS com cálcio e procedeu-se a análise em microscópio confocal de fluorescência Disk Scanning unit (DSU) de epifluorescência (modelo IX81, Olympus, Japão) acoplado a uma câmera Charge-Coupled Devide (CCD) de alta velocidade (Hamamatsu, Japão). Para a avaliação dos níveis de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático em macrófagos, foram utilizados filtros de excitação (340/380nm), e a fluorescência emitida (525 nm) quantificada por software (Cell<sup>^</sup>R, Olympus, Japão).

A concentração de cálcio citosólico ( $[Ca^{2+}]_i$ ) foi estimada pela aplicação da equação  $[Ca^{2+}]_i = K_d * (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ , onde  $K_d$  é a constante de dissociação de Fluo-3 (450 nM),  $F$  é a intensidade de fluorescência variável,  $F_{max}$  e  $F_{min}$  são, respectivamente, a fluorescência máxima e mínima obtida na presença de ionomicina (5 µM) ou EGTA (20 mM) [39]. Dados de imagem de cálcio, foram representativos para dois experimentos independentes de análise de célula única em duplicata.

### **Avaliação da porcentagem de macrófagos infectados por formas promastigotas de *L. major* e índice de sobrevivência de amastigotas internalizadas em macrófagos oriundos de camundongos BALB/c não infectados e camundongos tratados com os géis tópicos**

Macrófagos peritoneais oriundos de animais normais e que foram infectados por *L. major* e tratados com as formulações tópicas previamente descritas foram plaqueados, diluídos em meio RPMI suplementado na quantidade de  $2 \times 10^5$  por poço em triplicata, numa placa de 24 poços contendo uma lamínulas circular de 13mm de diâmetro e incubados em estufa a 37 °C e a 5% de CO<sub>2</sub>, durante 4h para total aderência das células. Após esse período, removeu-se o sobrenadante e acrescentou-se 500 µL de RPMI contendo  $2 \times 10^6$  e incubou-se novamente as placas nas mesmas condições *Overnight*.

Passado esse período, o meio foi subsequentemente aspirado para remover parasitas não internalizados e lavou-se a placa 2x com solução salina (NaCl 0,9%). Em seguida as lamínulas foram removidas e coradas utilizando o panótico rápido<sup>®</sup>. Para cada tratamento, contou-se o número de macrófagos infectados e a quantidade de amastigotas sobreviventes no interior de cada célula, percorrendo os campos das amostras até atingir a contagem de 100 macrófagos, utilizando microscopia óptica com aumento de 1000x [10].

#### **Avaliação da toxicidade *in vivo* do tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE em camundongos BALB/c infectados experimentalmente por *L. major*.**

##### *Hematócrito*

Tubos capilares contendo sangue total oriundo de animais normais e que foram infectados por *L. major* e tratados com as formulações tópicas previamente descritas, foram centrifugados a 3.000 RPM, durante 5 minutos e o valor do hematócrito foi quantificado em escala milimétrica de percentual, por meio da régua de hematócrito.

##### *Parâmetros bioquímicos de função hepática e renal*

A função hepática em amostras de soro foi analisada por dosagem enzimática de ALT, enquanto que a nefrotoxicidade foi avaliada pelos níveis de azoto ureico no sangue (UR) e níveis séricos creatinina (CR), utilizando kits comerciais (Labtest Diagnostica<sup>®</sup>). Como controle, soros de camundongos normais foram utilizados.

#### **Análises estatísticas**

Análise de variância (ANOVA) e teste de t-student foi realizado para a avaliação da estabilidade preliminar das formulações. O teste de Kruskal-wallis foi realizado para comparação da evolução clínica entre os grupos. Foi realizado ANOVA e pós-teste de Bonferroni usado para comparações entre os grupos nos ensaios *ex vivo*, sendo cada estudo feito em triplicata. Diferenças foram considerado significativo quando  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Preparo e estabilidade preliminar de gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE**

A tabela 1 apresenta os resultados da avaliação da estabilidade preliminar das formulações testadas quanto ao Teor (%), pH, Condutividade e características organolépticas no tempo T0, após o estresse térmico e pós ciclo gelo-degelo.

Observando-se o Teor no tempo T0 e pós estresse, podemos observar que todas as formulações apresentaram-se dentro do limite aceitável (90 a 110%) para formulações semissólidas [32]. No entanto, houve uma redução para 62,78% do teor na formulação de Anf B pós ciclo gelo-degelo. Quanto ao pH observa-se que as formulações tinham pH compatível com o da pele, no entanto a formulação de Anf B e Anf B + AE apresentaram-se dentro do limite estabelecido para formulações de permanência prolongada na pele, limite este, entre 4 e 7 [40].

A determinação da condutividade é uma tentativa de classificar o tipo de formulação baseado na distribuição de fases, permitindo a determinação da condutividade de domínios polares ou apolares. No tempo T0, um aumento da condutividade foi observado nas formulações combinadas de Anf B + AG e Anf B + AE. Isso pode ocorrer devido a incorporação de ácidos à formulação.

Após o estresse térmico e ciclo gelo-degelo observou-se um discreto aumento do pH, condutividade e uma modificação das características organolépticas em todas as formulações.

**Tabela 1.** Avaliação da estabilidade preliminar de gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.

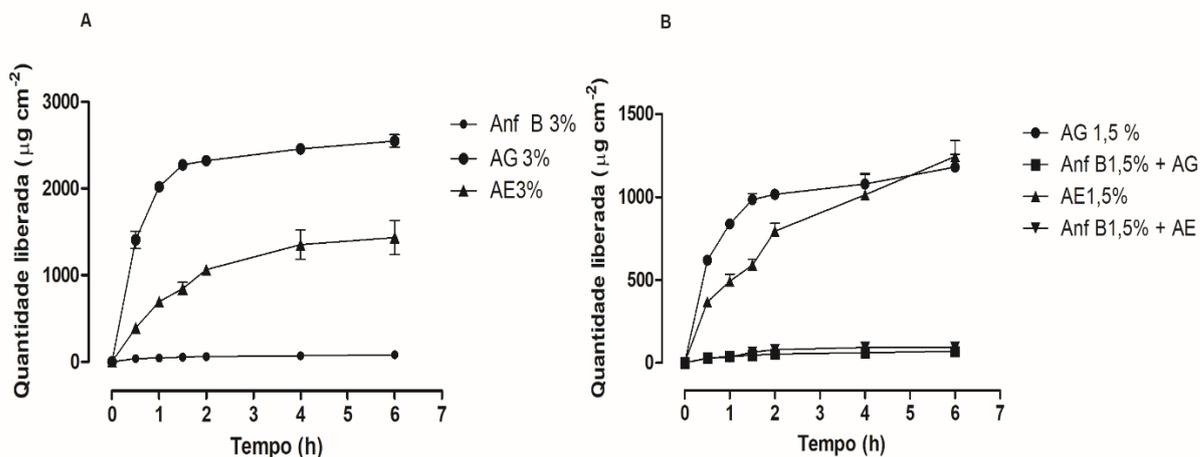
Formulação	Teor (%)	pH	Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Características organolépticas
<i>Tempo 0</i>				
Anf B	90,89 $\pm$ 2,92	5,02 $\pm$ 0,01	142,8 $\pm$ 4,75	Normal
AG	108,15 $\pm$ 0,99	3,33 $\pm$ 0,02	146,57 $\pm$ 0,58	Normal
Anf B + AG	109,49 $\pm$ 5,61 / 91,48 $\pm$ 1,11	3,66 $\pm$ 0,01	228,87 $\pm$ 0,45	Normal
AE	94,01 $\pm$ 3,32	3,76 $\pm$ 0,03	4269,67 $\pm$ 9,50	Normal
Anf B + AE	108,71 $\pm$ 5,55 / 90,76 $\pm$ 2,92	4,60 $\pm$ 0,01	2753,33 $\pm$ 15,28	Normal
<i>Pós estresse térmico</i>				
Anf B	90,31 $\pm$ 3,87	5,11 $\pm$ 0,01***	254,00 $\pm$ 3,46***	Lev. Modificado
AG	102,77 $\pm$ 3,34	3,44 $\pm$ 0,01***	149,70 $\pm$ 1,11*	Lev. Modificado
Anf B + AG	107,58 $\pm$ 3,48 / 90,80 $\pm$ 1,67	3,89 $\pm$ 0,01***	222,73 $\pm$ 0,12***	Lev. Modificado
AE	96,61 $\pm$ 7,89	4,01 $\pm$ 0,02***	4263,33 $\pm$ 5,77	Lev. Modificado
Anf B + AE	99,45 $\pm$ 3,69 / 91,69 $\pm$ 1,07	4,82 $\pm$ 0,01***	2856,67 $\pm$ 57,74*	Lev. Modificado
<i>Pós ciclo gelo-degelo</i>				
Anf B	62,78 $\pm$ 3,12***	4,97 $\pm$ 0,05	214,40 $\pm$ 2,61***	Lev. modificado
AG	97,14 $\pm$ 1,73***	3,48 $\pm$ 0,03***	154,20 $\pm$ 0,61***	Lev. modificado
Anf B + AG	104,02 $\pm$ 3,11/ 82,05 $\pm$ 3,63***	3,87 $\pm$ 0,03***	232,57 $\pm$ 0,55***	Lev. modificado
AE	90,86 $\pm$ 2,92	4,03 $\pm$ 0,02***	4316,67 $\pm$ 5,77**	Lev. modificado
Anf B + AE	107,38 $\pm$ 1,66/ 79,76 $\pm$ 2,00**	4,95 $\pm$ 0,04***	2906,67 $\pm$ 5,77***	Lev. modificado

Considerou-se diferença estatística significativa com  $P > 0,05$  no Teste t de student.

### Perfis de liberação *in vitro* de gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE

As formulações apresentaram os seguintes dados de quantidade liberada acumulada ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e % liberada: Anf B - 80,77 $\pm$ 2,35 ou 2,38% ; AG - 2547,01 $\pm$ 125,58 ou 73,80%; AE - 1511,95 $\pm$ 230,08 ou 63,13% (Fig. 02A) e a associação de Anf B + AG - 70,18 $\pm$ 2,34 ; 1180,65 $\pm$ 136,74 ou 4,05% ; 68,23% ; Anf B + AE - 94,06 $\pm$ 13,98 ; 1245,69 $\pm$ 166,08 ou 5,41% ; 71,75 respectivamente (Fig. 02B). O AG apresentou maior

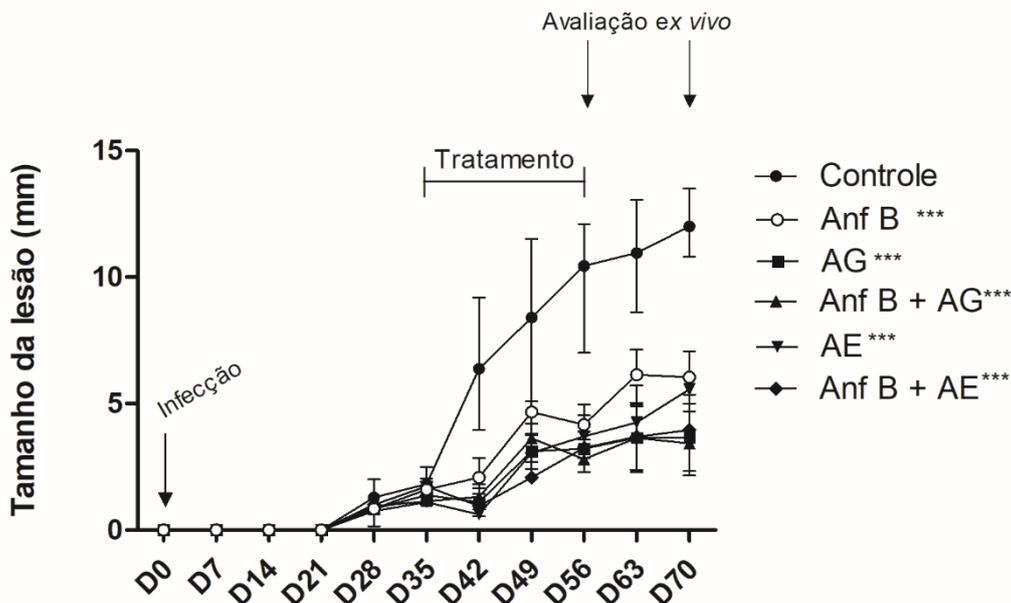
quantidade liberada, seguido do AE e por último a Anf B em 6 horas. As formulações em associação apresentaram uma excelente capacidade de liberar de AG e AE e ajudaram também a aumentar a liberação de Anf B devido a sua baixa solubilidade aquosa. Dessa forma, as formulações tem potencial para aplicação tópica para tratamento da leishmaniose cutânea.



**Figura 02. perfis de liberação *in vitro* de gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.** As formulações de Anf B, AG e AE liberaram respectivamente: 2,38%; 73,80%; 63,13% (A). Em associação com AG e AE a Anf B teve um discreto aumento da quantidade liberada correspondendo a 4,05% e 5,41% respectivamente (B).

### Atividade antileishmania de gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE

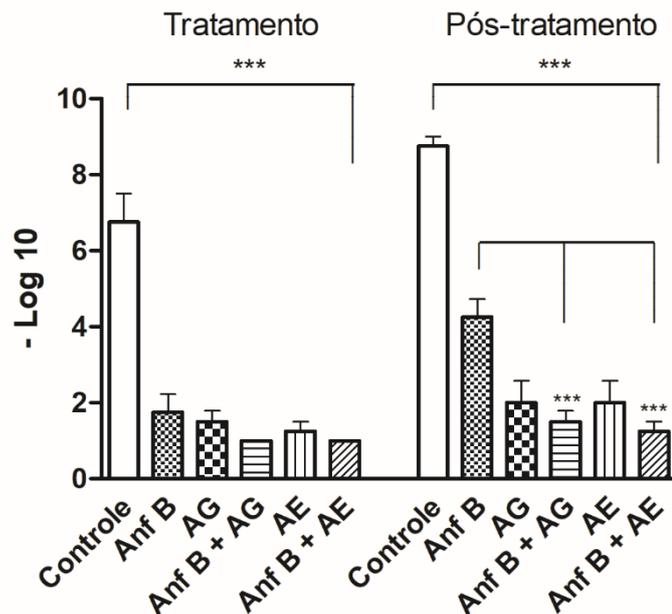
Nos 40 dias após a infecção dos BALB/c por *L.major*, período este que antecedeu o início do tratamento, todos os grupos apresentavam uniformidade no desenvolvimento clínico da doença. A partir deste período, observou-se nos animais que receberam tratamento tópico de gel de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE durante 21 dias consecutivos, retardo no avanço da lesão leishmaniotica e/ou melhora clínica significativa da doença. Esse efeito perdurou até o final do experimento, que foi de 14 dias após o término do tratamento de 21 dias (Fig 03).



**Figura 03: Avaliação do tamanho da lesão dos camundongos BALB/c infectados por *L. major* e tratados com géis tópicos.** Após 40 dias de infecção, os animais foram tratados b.i.d durante 21 dias. Observou-se uma redução das lesões nos animais que receberam tratamento tópico com gel de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.

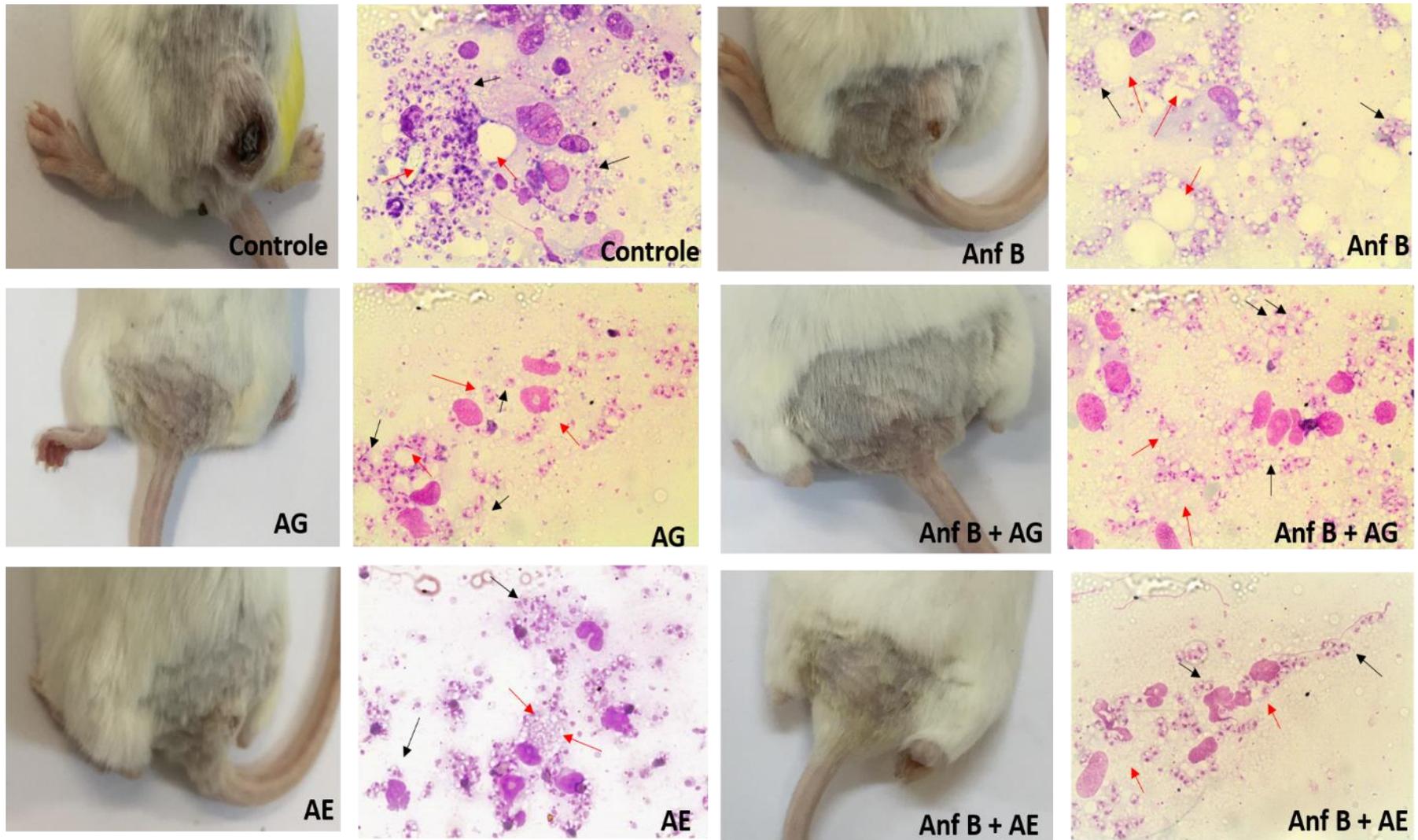
Os grupos que receberam tratamento com Anf B + AG e Anf B + AE, tiveram resultados semelhantes com Anf B, AG e AE, mesmo com a redução da concentração desses fármacos nas formulações, o que indica um possível efeito de associação entre esses fármacos.

Ao se avaliar a carga parasitária dos camundongos BALB/c, foi observado uma redução significativa, em escala logarítmica, de parasitos recuperados do sítio da lesão, dos animais que receberam tratamento tópico de gel de Anf-B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE (fig. 04). Em porcentagem, esses valores representam 74%; 77,7%; 85,1%; 81,4% e 85,1%, respectivamente. Observou-se ainda que esses valores permaneceram reduzidos (51,4%; 68,5%; 82,8%; 77,1% e 85,7% respectivamente) mesmo após 14 dias do término do experimento, sugerindo efeito protetor do ácido gálico e do ácido elágico utilizados nos Géis tópicos, possivelmente por ativar a resposta imune. Para o gel de Anf B foi observado uma maior elevação da carga parasitária quando se finalizou o tratamento, comparado aos outros grupos tratados. As formulações da associação de Anf B e os adjuvantes AG ou AE, mesmo com a redução da concentração de cada princípio ativo, foi notória a redução da carga durante o período de tratamento, demonstrando assim potencial efeito de associação entre Anf B e o GA e o EA.



**Figura 04:** Número em escala Log<sub>10</sub> de parasitas recuperados na lesão leishmaniotica por *L. major*. Após 40 dias de infecção, os animais foram tratados duas vezes ao dia durante 21 dias.. Observou-se uma redução das lesões nos animais que receberam tratamento tópico com gel de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE durante e após o tratamento

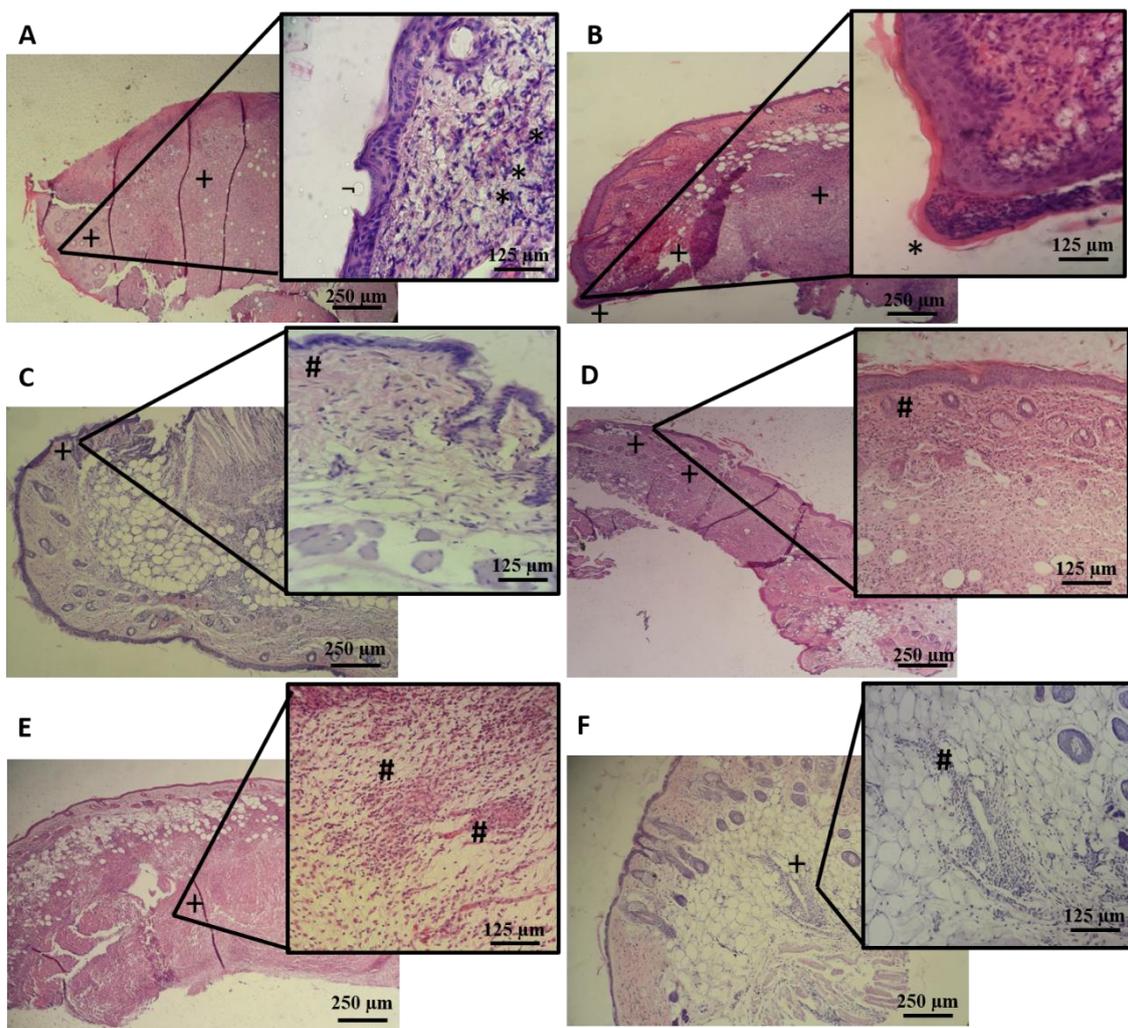
No momento da avaliação *ex vivo*, realizou-se *imprinting* de fragmentos de pele retiradas da lesão leishmaniotica e observou-se a morfologia dos macrófagos de acordo com Alves et al 2017. Foi observado macrófagos bastante espalhados, com aspecto fusiforme e esfumeados, somente daqueles animais que receberam tratamento com AG e AE como também com os grupos Anf B + AG, AE e Anf B + AE, mesmo com redução do princípio ativo. Tais características descrevem que essas células estavam ativadas e, uma vez estando ativadas por ação dos fármacos, foram capazes de reduzir a infecção (Fig 05). No grupo controle e Anf B, foi observado macrófagos com grande quantidade de formas amastigotas, sem espalhamento e com grandes vacúolos parasitófagos.



**Figura 05: Macrófagos observados através de imprinting da lesão leishmaniótica em camundongos BALB/c após o tratamento com gel de Anf B. AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.** As setas pretas indicam as formas amastigotas do parasita internalizadas nos macrófagos, as setas vermelhas indicam os vacúolos parasitófagos. Observa-se nos grupos GA, Anf,B + AG EA, Anf B + AE macrófagos espalhados e esfumados, indicando que eles uma vez estando ativados por estímulo dos fármacos, são capazes de resolver a infecção.

**Análise histopatológica de amostras de lesão cutânea leishmaniótica causada por *L. major* de camundongos BALB/c tratados com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE**

As características histopatológicas da pele observadas foram semelhantes para as análises realizadas durante e após o tratamento. Os animais do grupo controle apresentaram lesão difusa abrangendo derme profunda e superficial, com áreas de necrose, presença de infecção bacteriana secundária, ulcerações, sem sinais de fibrose nem presença de tecido de granulação, degeneração de fibras musculares e macrófagos com grandes vacúolos parasitófagos repletos de leishmania em área de dermatite de interface (Figura 06A). Os animais tratados com gel de Anf B apresentaram áreas de necrose, úlcera, dermatite de interface, e a presença de macrófagos não ativados com grandes vacúolos parasitófagos repletos de leishmania e pústula intraepidérmica (Figura 06B). Nos animais tratados com gel de AG observou-se presença difusa de eosinófilos, e proliferação de fibroblastos no tecido de granulação, além de área circunscrita de dermatite perivascular com macrófagos ativados, esfumeados e espraçados (Figura 06C). Para os animais tratados com gel de Anf B + AG observou-se área focal de acantose, paniculite e dermatite difusa com macrófagos ativados, esfumeados e espraçados, intercalada com tecido de granulação nodular inúmeros vasos neoformados, proliferação de fibroblastos e deposição de fibras colágenas (Figura 06D). Os animais tratados com gel de AE apresentaram lesões multifocais na derme profunda (dermatite multifocal), com presença de eosinófilos e pequenos debris eosinofílicos brilhantes (figura em chama), bem como infiltrado inflamatório mononuclear difuso com macrófagos ativados, esfumeados e espraçados presentes no tecido de granulação pouco maduro (Figura 06E). Por fim, os animais que receberam tratamento com gel de Anf B + AE apresentaram área de lesão circunscrita (dermatite perivascular), intercalada com tecido de granulação pouco maduro, com presença de macrófagos ativados, esfumeados e espraçados, além da presença de eosinófilos, calcificação focal do tecido conjuntivo (Figura 06F).



**Figura 06: Fotomicrografias de lesão cutânea leishmaniótica causada por *L. major* em camundongos BALB/c após tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.** Observou-se grande área de necrose epidérmica, infiltrado inflamatório misto difuso por toda a derme (+), dermatite de interface devido a presença de grande número de formas amastigotas na derme papilar (-), ulceração e necrose (\*) nos animais do grupo controle (A). Nos animais que receberam tratamento com gel de Anf B (B) observou-se área de necrose, lesão inflamatória difusa (+) e Pústula preenchida com neutrófilos degenerados acima do epitélio invadido por formas amastigotas de leishmania. (\*). Os animais do grupo AG (C); Anf B + AG (D); AE (E) e Anf B + AE (F) observou-se área de lesão circunscrita (+), com presença de macrófagos ativados, fibroblastos, tecido de granulação, dermatite perivascular (#) e calcificação focal à direita. Coloração pela H.E. Scale Bar: 250 µm e 125 µm.

### Ativação de macrófagos em ensaios *ex vivo* de camundongos BALB/c infectados por *L. major* e tratados com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE

Macrófagos peritoneais foram retirados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c durante e após o período de tratamento para avaliação da capacidade fagocítica, atividade lisossomal, indução da síntese de óxido nítrico e quantificação de cálcio intracelular.

#### Ativação da Capacidade Fagocítica

Para os macrófagos dos grupos com gel de AG, AE e associação de Anf B + AG e Anf B + AE, observou-se aumento da capacidade fagocítica analisada pela fagocitose de *zymozan*, durante período de tratamento e perdurando por 14 dias após o tratamento (Fig 07). Os macrófagos oriundos de animais tratados com gel de Anf B não possuíram aumento de sua capacidade fagocítica.

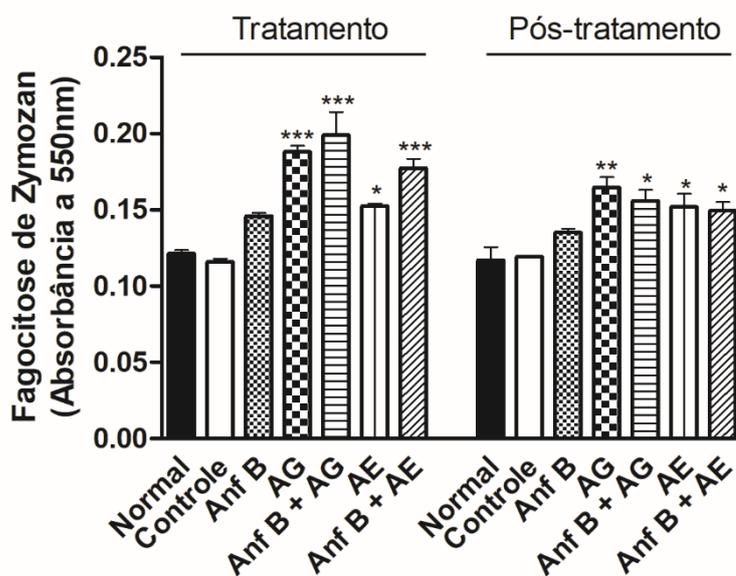
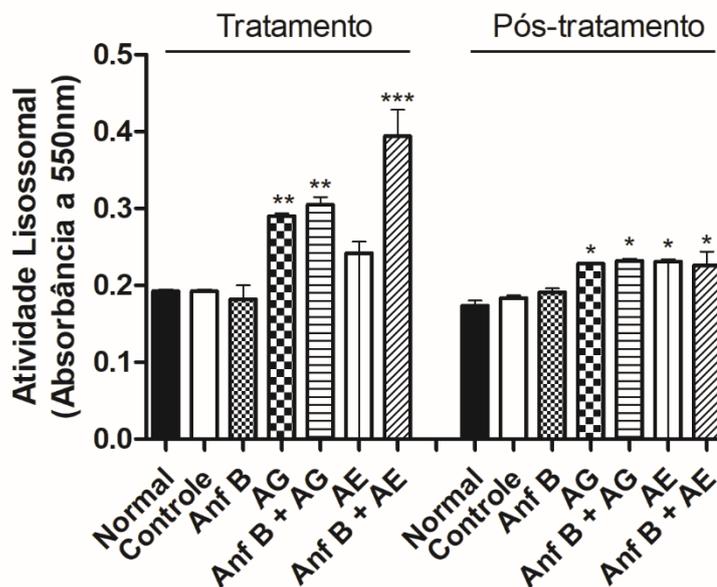


Figura 07: Ativação da capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais murinos retirados de camundongos BALB/c após tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE. Observou-se aumento da fagocitose de *zymozan* dos macrófagos retirados dos animais tratados com Gel de AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.

#### Ativação da Atividade Lisossomal

Para os macrófagos dos grupos com gel de AG, AE e associação de Anf B + AG e Anf B + AE, resultaram no aumento atividade lisossomal, durante período de tratamento e perdurando por 14 dias após o tratamento, em comparação ao controle e aos macrófagos retirados de animais normais (Fig 08). Os macrófagos oriundos de animais tratados com

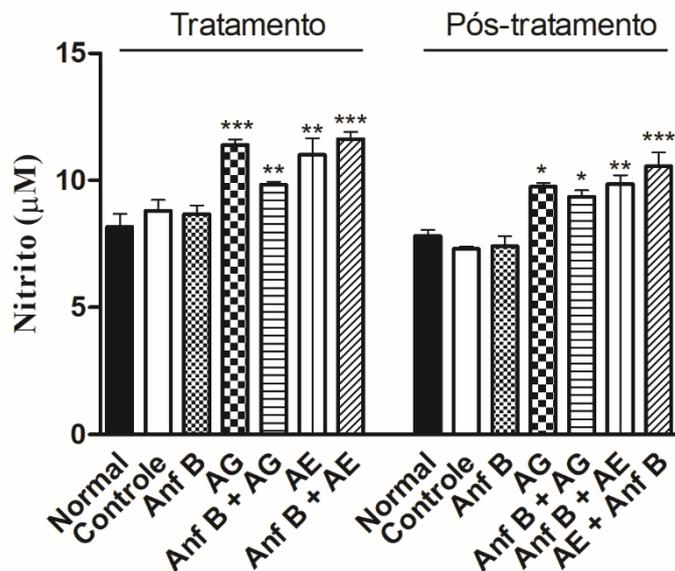
gel de Anf B não possuíram aumento de sua atividade lisossomal e o AE somente após o período de tratamento



**Figura 08:** Ativação da atividade lisossomal de macrófagos peritoneais murinos retirados de camundongos BALB/c após tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE. Observou-se aumento da fagocitose de *zymozan* dos macrófagos retirados dos animais tratados com Gel de AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.

#### *Ativação da Síntese de Óxido Nítrico*

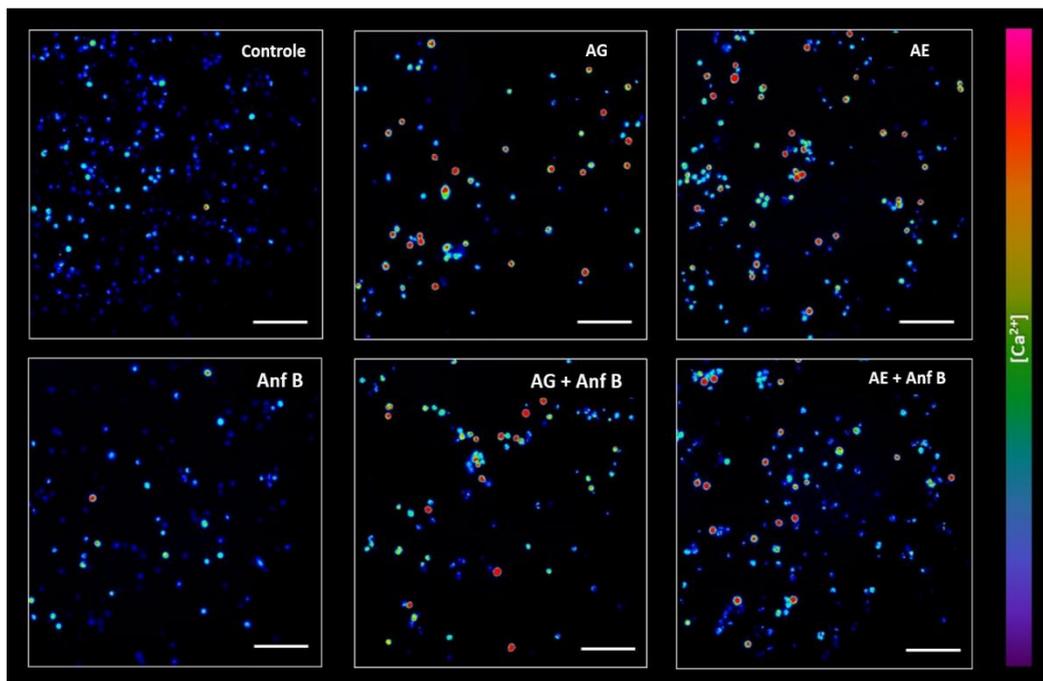
Os macrófagos obtidos dos BALB/c tratados com gel de AG, AE e com a associação de Anf B + AG e Anf B + AE, obtiveram aumento da síntese de óxido nítrico analisada pela concentração de nitrito (produto final do óxido nítrico), durante período de tratamento e perdurando por 14 dias após o tratamento, em comparação ao controle e aos macrófagos retirados de animais normais (Fig 09). Os macrófagos oriundos de animais tratados com gel de Anf B não possuíram aumento da síntese de óxido nítrico.



**Figura 09:** Ativação da síntese de óxido nítrico pela concentração de nitrito, de macrófagos peritoneais murinos retirados de camundongos BALB/c após tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE. Observou-se aumento das concentrações de nitrito dos macrófagos retirados dos animais tratados com Gel de AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.

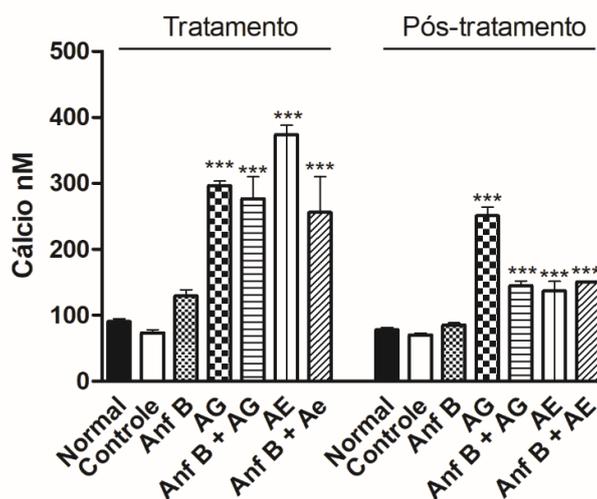
#### *Quantificação de cálcio intracelular*

Em imagem capturada por microscopia confocal para avaliação das concentrações de cálcio intracelular por meio da marcação por FLUO-3-AM, os macrófagos oriundos dos BALB/c tratados com gel de AG, AE e associação de Anf B + AG e Anf B + AE, apresentaram aumento da intensidade de fluorescência, indicando aumento das concentrações de cálcio intracelular (Fig. 10).



**Figura 10:** Quantificação de cálcio intracelular pela marcação com FLUO-3-AM, de macrófagos peritoneais murinos retirados de camundongos BALB/c após tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE, observados em microscopia confocal. Observou-se aumento da intensidade de fluorescência, indicando aumento das concentrações intracelulares de cálcio marcado com FLUO-3-AM dos macrófagos retirados dos animais tratados com Gel de AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.

Ao quantificar as concentrações de cálcio intracelular, observou-se um aumento dessas concentrações durante período de tratamento e perdurando por 14 dias após o tratamento, em comparação ao controle e aos macrófagos retirados de animais normais (Fig 10).

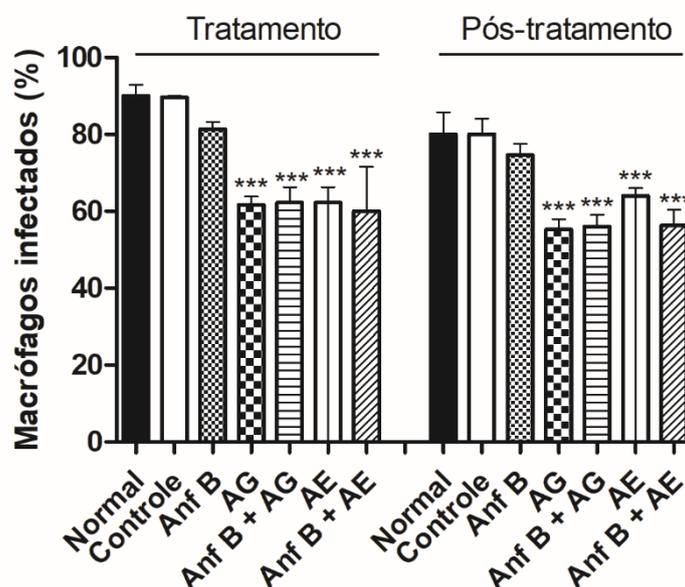


**Figura 11:** Quantificação de cálcio intracelular pela marcação com FLUO-3-AM, de macrófagos peritoneais murinos retirados de camundongos BALB/c após tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE. Observou-se aumento das concentrações intracelulares de cálcio dos macrófagos retirados dos animais tratados com gel de AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.

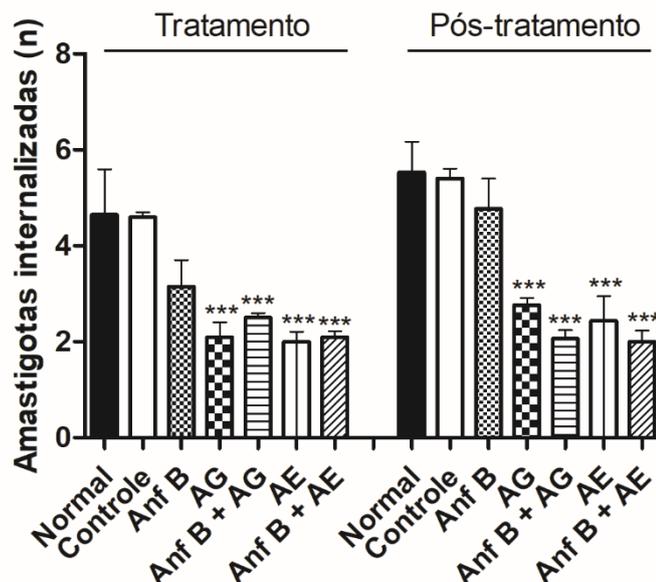
Os macrófagos oriundos de animais tratados com gel de Anf B não apresentaram aumento da concentração de cálcio intracelular.

**Avaliação de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados por formas promastigotas de *L. major* *in vitro*, tratados com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE.**

Os macrófagos oriundos dos BALB/c tratados com gel de AG, AE e associação de Anf B + AG Anf B + AE foram infectados com formas promastigotas de *L. major* para avaliação da porcentagem de macrófagos infectados e da média do número de amastigotas sobreviventes internalizadas por macrófago, no intuito de avaliar a possível resistência do organismo hospedeiro frente à possíveis recidivas da doença. Dessarte, os macrófagos dos animais que receberam tratamento com gel de AG, AE e associação de Anf B + AG e Anf B + AE foram capazes de reduzir o número de macrófagos infectados em torno de 25% em comparação aos outros grupos, durante o período de tratamento e de pós tratamento (Fig. 12). Concomitantemente também reduziram o número de amastigotas sobreviventes em torno de 50%, ou seja, número que representa a metade de amastigotas sobreviventes encontradas nos outros grupos (Fig. 13).



**Figura 12:** Percentual de macrófagos peritoneais murinos infectados por formas promastigotas de *L. major* *in vitro*, de camundongos BALB/c tratados com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE. Observou-se redução significativa da porcentagem de macrófagos infectados nos animais que receberam tratamento com gel de AG, AE e o sinergismo Anf B + AG e Anf B + AE.



**Figura 13:** Amastigotas internalizadas em macrófagos peritoneais murinos infectados e tratados com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE Anf B + AE. Observou-se redução significativa da média de amastigotas sobreviventes dos animais que receberam tratamento com gel de AG, AE e o sinergismo Anf B + AG e Anf B + AE.

#### **Avaliação da toxicidade *in vivo* do tratamento com Gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE em camundongos BALB/c infectados experimentalmente por *L. major*.**

A toxicidade foi avaliada pelos parâmetros bioquímicos através da dosagem sérica de uréia (UR), creatinina (CR) e alanina-aminotransferase (ALT), bem como avaliação do hematócrito e peso total dos animais, durante e após o tratamento com gel tópico de Anf B, AG, AG + Anf-B, AE e AE + Anf B, em comparação ao grupo controle e com animais normais.

Esses resultados demonstram que os grupos tratados apresentaram níveis normais das enzimas séricas, bem como hematócrito e peso total, indicando que não houve toxicidade aparente no período de tratamento, nem no período de pós-tratamento. Em relação ao peso total dos camundongos BALB/c, observou-se que no grupo que recebeu tratamento com gel de Anf B houve uma redução perceptível no peso dos animais, porém não diferiu estatisticamente. O grupo que recebeu AG, AE e sinergismo Anf B + AG e Anf B + AE permaneceram com os valores quantificados nesse estudo o mais próximo dos parâmetros observados nos camundongos normais. Esses resultados estão expostos na tabela 02.

**Tabela 02: Avaliação da toxicidade *in vivo* do tratamento com gel tópico de Anf B, AG, Anf B + AG, AE e Anf B + AE em camundongos BALB/c infectados experimentalmente por *L. major***

	Normal	Controle	Anf B	AG	Anf B + AG	AE	Anf B + AE
Uréia (mg/dL)	56,7 ± 6,8 54,2 ± 4,4	54,5 ± 6,4 46,5 ± 10,2	60,5 ± 7,7 58,6 ± 7	50 ± 4,2 55,6 ± 5,8	57 ± 8,4 55,6 ± 5,8	52,5 ± 4,9 55 ± 3,4	54,5 ± 3,5 58 ± 5,9
Creatinina (mg/dL)	0,2 ± 0,05 0,2 ± 0,05	0,2 ± 0,05 0,2 ± 0,05	0,2 ± 0,07 0,2 ± 0,08	0,2 ± 0,01 0,2 ± 0,05	0,2 ± 0,05 0,2 ± 0,05	0,2 ± 0,05 0,2 ± 0,05	0,2 ± 0,05 0,2 ± 0,05
ALT (U/L)	67 ± 2,9 67,7 ± 4,6	69,3 ± 4,9 69,7 ± 4,2	76 ± 13,7 69,6 ± 3,5	67,5 ± 2,1 66 ± 4,1	74,25 ± 5,6 70 ± 3,6	60 ± 11,3 60,5 ± 0,7	65 ± 5,5 64 ± 9
Hematócrito (%)	49,7 ± 1,7 50 ± 3,9	49 ± 2,8 52,2 ± 2,7	44 ± 6,3 52 ± 5,4	47,3 ± 2,8 52 ± 4,2	49 ± 1,4 51 ± 2,6	51 ± 1,4 50 ± 2	47,2 ± 5,5 49,5 ± 3,3
Peso total (g)	32 ± 2 32,2 ± 1,8	29,8 ± 4,7 29,1 ± 3,8	24 ± 3,8 24,7 ± 1,4	27 ± 3,9 30,3 ± 4,2	26,1 ± 3,2 26,4 ± 3,2	27,7 ± 3,7 28 ± 1,7	27,9 ± 2,5 28,7 ± 4,2

Para avaliar a toxicidade *in vivo*, foram estudados os parâmetros bioquímicos e hematócrito, como também o peso total dos animais que receberam tratamento em comparação aos animais normais. A linha superior de cada parâmetro avaliado representa o período de tratamento e a linha inferior o período de pós tratamento. Esse resultado demonstra que não houve toxicidade *in vivo* nos camundongos BALB/c tratados com os géis.

## DISCUSSÃO

Atualmente, as associações entre drogas estão entre as abordagens mais promissoras para o desenvolvimento de novas formulações antileishmania. As principais vantagens de terapia associada são: sinergismo, redução da toxicidade, regimes de tratamento mais curtos e redução do desenvolvimento da resistência [26,27,41]. Vários estudos mostraram que algumas combinações de drogas aumentaram seus efeitos antileishmania. Por exemplo, uma combinação de miltefosina com paromomicina demonstrou atividade superior contra a leishmaniose visceral em modelos animais [42]; enquanto que as combinações de paromomicina e gentamicina foram mais efetivas contra a forma cutânea em camundongos BALB / c [43]. Do mesmo modo combinação de glucantime com ácido ascórbico foi eficiente no tratamento de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania infantum* [41].

Concomitantemente a combinação de drogas é a inserção de tecnologia farmacêutica na busca de novas terapias antileishmania [31,41]. Nanopartículas, lipossomas e géis de polaxamer são alguns exemplos de vetorização de drogas, ao mesmo

tempo que melhora a biodisponibilidade do fármaco no seu sítio de ação, também diminui a toxicidade, causando menos efeitos adversos [31,44].

Em estudo anterior, nosso grupo reportou o grande potencial antileishmania e imunomodulador do ácido gálico e do ácido elágico, sendo portanto, moléculas promissoras na terapia antileishmania [15]. No entanto, por serem duas moléculas hidrofílicas, sua administração oral é comprometida por conta do metabolismo hepático de primeira passagem [45]. A anfotericina B, fármaco convencional utilizado como escolha para a resolução da doença é de administração parenteral de longa duração, além de ser tóxico e de já possuir relatos de resistência por parte do parasita [19,20].

Os tratamentos tópicos são uma alternativa promissora para o tratamento das leishmanioses, pois oferecem várias vantagens em relação à via parenteral. Estas vantagens não são limitadas apenas à praticidade da administração, mas também podem fornecer uma melhor eficácia terapêutica e maior segurança devido à sua capacidade de liberar o medicamento diretamente ao alvo [31,46]

Nos ensaios de estabilidade preliminar, nossas formulações demonstraram alterações nos parâmetros avaliados após o estresse térmico e o ciclo gelo-degelo, o que já era esperado, já que o Polaxamer 407<sup>®</sup> é composto por dois copolímeros de cadeia longa e que são passíveis de alteração estrutural quando submetidos ao estresse [30]. No entanto possui muitas vantagens como a propriedade única de ser sólido à temperatura ambiente e líquido à temperatura refrigerada. Assim, em contato com a pele o gel facilita a adesão do produto, sendo excelente carreador de moléculas e com propriedades tensoativas e promotora de permeabilidade cutânea [30,31,47]. Além disso, as formulações em gel de poloxamer apresentaram boa capacidade de liberação dos fármacos, com um excelente potencial para aplicação tópica, inclusive para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea, em função da boa capacidade de adesividade ao local de contato [31]

Neste estudo, observou-se o grande potencial que as formulações tópicas em gel de polaxamer 407<sup>®</sup> apresentaram no controle e/ou tratamento da doença, quando reduziu e/ou impediu o avanço da mesma. Os géis de Anf B, AG e AE apresentaram resultados clinicamente semelhantes, quando utilizados nas mesmas concentrações. Surpreendentemente, foi possível observar o efeito de associação entre o gel de Anf B + AG e Anf B + AE em comparação aos grupos Anf B, AG e AE isolados. Esse efeito é

confirmado pelo fato da concentração de cada princípio ativo que compôs a associação estar pela metade, além disso, a liberação dessas moléculas na avaliação do perfil de liberação *in vitro* foram menores em comparação as outras formulações, e mesmo assim apresentou melhores resultados em todas as análises aqui avaliadas. A Anf B por ser o fármaco convencional, é bastante utilizada nos estudos para avaliar o efeito de novas drogas antileishmania como controle positivo [31,48].

Na análise histopatológica ficou claro o potencial efeito de associação de Anf B com AG e/ou AE. A presença de macrófagos ativados e eosinófilos aponta para uma resposta celular específica contra agentes parasitários, sendo assim, os animais que receberam esse tratamento de associação apresentaram promissor avanço na resolução da infecção e progressão para a cicatrização da ferida. Estudos de associação de fármacos convencionais e moléculas adjuvantes, como Anf B com ácido oleico no mesmo tipo de veiculação tópica, e Antimonial Trivalente com ácido ascórbico em lipossomas, também apresentaram resultados histopatológicos que demonstraram evolução da ferida para cicatrização com a formação de granulomas e ativação celular, que corroboram com este estudo [31,41].

Por se tratar de uma imunopatologia, a busca de novos fármacos se dá não apenas pelo efeito de novas moléculas sobre o parasita em si, mas também a sua capacidade de atuar em colaboração com o sistema imune [28,48]. Dentre os alvos a se estudar, os macrófagos estão como um dos principais, pois são células altamente especializadas em destruir patógenos intracelulares quando ativados [49,50]. Demonstrou-se aqui, com as imagens observadas de *imprinting* das lesões dos camundongos tratados com os géis de AG, AE e Anf B + AG e Anf B + AE, a presença dessas células ativadas, apresentando espraiamento e esfumeamento, significando que essas células estavam ativadas e capazes de resolver a infecção [15].

Capacidade fagocítica, atividade lisossomal, produção de óxido nítrico e concentração de cálcio intracelular são alguns exemplos de atividade funcional relacionada à ativação efetiva de macrófagos contra as leishmanioses [10-15,51]. Os macrófagos desempenham diversas funções, incluindo fagocitose, citotoxicidade tumoral, secreção de citocinas e apresentação de antígenos. Estes fagócitos representam uma linha de defesa inata contra patógenos e células tumorais, reconhecendo e destruindo-as [52-54]. Caracteristicamente, macrófagos ativados demonstram aumento da capacidade de adesão e espraiamento, estimulação da síntese de DNA, aumento de

cálcio intracelular, modificação na secreção de citocinas, aumento de níveis de enzimas lisossomais, aumento de atividade microbicida/tumoríca pelo aumento na produção de NO e de espécies reativas do oxigênio (EROs), aumento de *ruffles* de membrana que melhoram o desempenho de funções como a locomoção e a fagocitose [55].

A fagocitose e o sistema lisossomal são críticos para as funções dos macrófagos, onde ocorre internalização, processamento e apresentação de antígenos, derivados de patógenos, às células específicas do sistema imune adaptativo. Após a endocitose do patógeno, o fagossomo recentemente criado sofre eventos sequenciais de fusão com endossomas e depois com lisossomas para produzir um fagolisossoma [56]. O fagolisossoma é um compartimento cheio de hidrolases ácidas e ERO's onde ocorre a maior parte de degradação do conteúdo englobado. Drogas que atuam ativando macrófagos neste alvo, são capazes induzir essas células a destruir patógenos internalizados em seus fagolisossomos, além de auxiliar com *up-regulation* na apresentação de antígeno [56-58]

Na atividade antileishmania, uma via importante que pode estar envolvida é a produção do NO pelos macrófagos. Ele é considerado, há muito tempo, como o mecanismo mais eficaz envolvido na defesa contra leishmania. Dentro dos fagolisossomos, o NO se combina com ânion superóxido para produzir peroxinitrito, que é altamente reativo e microbicida [18,59]. O parasito sobrevive dentro do macrófago mediante a habilidade de inibir a expressão ou atividade do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) por meio da inibição da produção de citocinas envolvidas na regulação da iNOS, inibição da síntese de NO por glicosilinositol, fosfolípídeos da superfície de amastigotas ou estímulo à produção do fator de transformação do crescimento TGF- $\beta$  [59]. Fármacos que ativam a via do NO atuam pela ativação de macrófagos por citocinas, tais como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que aumentam a produção de óxido nítrico sintase, uma enzima que catalisa L-arginina para gerar NO e citrulina [60]. Uma vez dentro do fagolisossoma, o NO combina-se com o superóxido para produzir nitrito de peróxido, o qual é altamente reativo e atua como um microbicida [59,61].

O cálcio intracelular, juntamente com o diacilglicerol (DAG), são responsáveis pela ativação da proteína cinase C (PKC) que desencadeia resposta imune Th1, que confere cura e proteção contra as leishmanioses [48,62]. Outro fator envolvido de grande relevância, quando há presença significativa de cálcio intracelular em célula com patógeno internalizado, é a despolimerização da F-actina. A fagocitose por neutrófilos,

macrófagos e outros fagócitos requer uma remodelação rápida da actina. A despolimerização da F-actina, fagocitose e maturação do fagocitoma perifagosomal são processos dependentes de cálcio nos macrófagos quando interagem com agentes patogênicos para resolver infecções [63].

AG e AE são duas moléculas imunomoduladoras naturais capazes de resolver a infecção de macrófagos por leishmania, por atuarem intrinsecamente sobre o parasita, como também por atuarem através de ativação de macrófagos [15]. O mecanismo de ação da Anf B é atuar inibindo a síntese de ergosteróis do parasita, causando assim o rompimento da sua membrana plasmática [19,20]. Quando se associou a Anf B com esses imunomoduladores naturais, pôde-se observar também capacidade de atuar em sinergismo com a resposta imune do hospedeiro, o que tornam estes compostos promissores no enfrentamento da doença. Nossos resultados demonstram que a atividade das substâncias testadas envolve essas vias de ativação de macrófagos, o que possivelmente potencializou Anf B em associação a essas moléculas, mesmo em dose reduzida.

Em ambientes endêmicos, existe a grande probabilidade de um indivíduo que já passou ou está em tratamento desta doença, ser exposto novamente à infecção, as chamadas recidivas [4]. Neste estudo, demonstrou-se que a função imunomoduladora dos nossos compostos ativa macrófagos de forma sistêmica durante o tratamento e também após o tratamento, sugerindo possível geração de memória imunológica, além disso um veículo gelificado com 20% de propilenoglicol pode ter favorecido a penetração das moléculas, já que o propilenoglicol é um promotor clássico de primeira geração e o polaxamer também possui características promotoras [30, 31, 47]. Este fato explica-se pela redução da infecção e infectividade dos macrófagos oriundos dos camundongos tratados com os compostos naturais e associação de Anf B a estes, quando submetidos à infecção por formas promastigotas de *L. major*, simulando o que acontece em área endêmica.

Estes compostos também demonstraram segurança, quando avaliamos função hepática, função renal e peso total dos camundongos. Apesar de não ter havido diferenças estatísticas em comparação à Anf B, sabe-se que a Anf B é extremamente tóxica se administrada parenteralmente e causa inúmeros dissabores aos pacientes que recebem seu tratamento [64]. AG e AE possuem excelente índice de seletividade, sendo mais seletivos

para causar efeito tóxico para o parasito em comparação às células de mamíferos [15]. A associação entre Anf B + AG e Anf B + AE demonstrou, pelos parâmetros aqui avaliados, com valores mais próximos aos animais normais do que a Anf B isoladamente.

Este estudo é o primeiro a descrever o efeito de associação Anf B convencional e compostos fenólicos em gel tópico, abordando a excelência da capacidade imunomoduladora desses compostos naturais, minimizando a toxicidade do fármaco convencional e maximizando o potencial terapêutico. Sendo, portanto, esta associação promissora no tratamento da leishmaniose, já que se utilizou camundongos BALB/c como modelo experimental, uma vez que essa linhagem é altamente susceptível à infecção por *Leishmania major* [46].

## CONCLUSÃO

Os géis tópicos de AG, AE e Anf B + AG e Anf B + AE possuíram boa capacidade de liberação dos fármacos, ao se veículo gelificado com 20% de propilenoglicol favoreceu a penetração das moléculas, apresentando grande potencial em tratar a ferida cutânea leishmaniótica causada por *L major* em camundongos BALB/c experimentalmente infectados. O efeito de associação Anf B + AG e/ou Anf B + AE demonstrou ser promissor na evolução clínica para cura por atuar sistemicamente na ativação de resposta imune celular e debelar a infecção às possíveis recidivas. Portanto, o AG ou o AE são promissores no tratamento da doença como monoterapia ou utilizados como adjuvantes de vacinas ou associados à anfotericina B convencional.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo é continuidade da investigação das moléculas naturais ácido gálico e ácido elágico. Anteriormente realizamos ensaios *in vitro* sobre as formas evolutivas do parasito, citotoxicidade frente às células do hospedeiro e parâmetros de ativação de macrófagos. Em todos os testes essas moléculas se demonstraram promissoras, o que posso destacar ainda é a grande capacidade de serem moléculas ativadoras das células imune, onde provaram atuar intrinsecamente contra o parasita e em sinergismo com a ativação de macrófagos.

Para prosseguirmos com os testes pré-clínicos, escolhemos um modelo experimental bastante aceito no meio científico e bastante susceptível à manifestação

cutânea da leishmaniose causada por *L. major*. No entanto, tivemos um primeiro obstáculo: Por se tratarem de duas moléculas hidrofílicas, realizar o tratamento por administração oral seria limitado, pois o metabolismo hepático de primeira passagem reduziria bastante o tempo de meia vida bem como sua biodisponibilidade. Foi então quando surgiu a ideia de se utilizar o Polaxamer 407<sup>®</sup> como carreador e promotor dessas moléculas. Ao debruçarmos na literatura e checar a abordagem de outros cientistas e/ou grupos de pesquisas do Brasil e do mundo que trabalham na busca de novos fármacos antileishmania, observamos uma linguagem comum: o uso da combinação de drogas. Foi então onde chegamos a resultados surpreendentes e satisfatórios quando associamos a Anf B convencional com estas moléculas.

Nossos próximos passos serão abordagens clínicas em pacientes naturalmente infectados, acrescentar ao nosso gel substâncias estabilizadoras da formulação e realizar estudos de toxicidade.

## Referências

1. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7: e35671.
2. den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J (2011) Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect* 17: 1471-1477.
3. Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318.
4. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH (2011) Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol* 27: 403-409.
5. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, et al. (2007) Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7: 581-596.
6. Kaye P, Scott P (2011) Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 9: 604-615.
7. Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M (2010) New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol* 63: 309-322.
8. Ashford RW (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269-1281.
9. Sundar S, Chakravarty J (2013) Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother* 14: 53-63.
10. Carneiro SM, Carvalho FA, Santana LC, Sousa AP, Neto JM, et al. (2012) The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). *Biol Res* 45: 111-116.
11. de Castro Oliveira LG, Brito LM, de Moraes Alves MM, Amorim LV, Sobrinho-Junior EP, et al. (2017) In Vitro Effects of the Neolignan 2,3-Dihydrobenzofuran Against *Leishmania Amazonensis*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 120: 52-58.
12. de Medeiros M, da Silva AC, Cito AM, Borges AR, de Lima SG, et al. (2011) In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitol Int* 60: 237-241.
13. Rodrigues KA, Amorim LV, Dias CN, Moraes DF, Carneiro SM, et al. (2015) *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent alpha-pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation in vitro. *J Ethnopharmacol* 160: 32-40.
14. Souza AC, Alves MMM, Brito LM, Oliveira LGC, Sobrinho-Junior EPC, et al. (2017) *Platonia insignis* Mart., a Brazilian Amazonian Plant: The Stem Barks Extract and Its Main Constituent Lupeol Exert Antileishmanial Effects Involving Macrophages Activation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017: 3126458.
15. Alves MMM, Brito LM, Souza AC, Queiroz B, de Carvalho TP, et al. (2017) Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 390: 893-903.
16. Cunha MA, Leao AC, de Cassia Soler R, Lindoso JA (2015) Efficacy and Safety of Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Mucosal Leishmaniasis from the New World: A Retrospective Study. *Am J Trop Med Hyg* 93: 1214-1218.
17. Lage LM, Barichello JM, Lage DP, Mendonca DV, Carvalho AM, et al. (2016) An 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system is effective for the treatment of murine tegumentary leishmaniasis. *Parasitol Res* 115: 4083-4095.
18. Valadares DG, Duarte MC, Oliveira JS, Chavez-Fumagalli MA, Martins VT, et al. (2011) Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. *Parasitol Int* 60: 357-363.
19. Lachaud L, Bourgeois N, Plourde M, Leprohon P, Bastien P, et al. (2009) Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. *Clin Infect Dis* 48: e16-22.

20. Sundar S, Chakravarty J (2008) Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Investig Drugs* 17: 787-794.
21. Mishra J, Dey A, Singh N, Somvanshi R, Singh S (2013) Evaluation of toxicity & therapeutic efficacy of a new liposomal formulation of amphotericin B in a mouse model. *Indian J Med Res* 137: 767-776.
22. Ribeiro TG, Franca JR, Fuscaldi LL, Santos ML, Duarte MC, et al. (2014) An optimized nanoparticle delivery system based on chitosan and chondroitin sulfate molecules reduces the toxicity of amphotericin B and is effective in treating tegumentary leishmaniasis. *Int J Nanomedicine* 9: 5341-5353.
23. Sundar S, Singh A (2016) Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. *Ther Adv Infect Dis* 3: 98-109.
24. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL (2011) Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* 162: 1239-1249.
25. Uliana SRB, Trinconi CT, Coelho AC (2018) Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology* 145: 464-480.
26. Pastor J, Garcia M, Steinbauer S, Setzer WN, Scull R, et al. (2015) Combinations of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide against *Leishmania*. *Acta Trop* 145: 31-38.
27. Pink R, Hudson A, Mouries MA, Bendig M (2005) Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4: 727-740.
28. Valadares DG, Duarte MC, Ramirez L, Chavez-Fumagalli MA, Lage PS, et al. (2012) Therapeutic efficacy induced by the oral administration of *Agaricus blazei* Murill against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res* 111: 1807-1816.
29. Pandey MS, Belgamwar VS, Surana SJ (2009) Topical delivery of flurbiprofen from pluronic lecithin organogel. *Indian J Pharm Sci* 71: 87-90.
30. Ur-Rehman T, Tavelin S, Grobner G (2011) Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. *Int J Pharm* 409: 19-29.
31. Pinheiro IM, Carvalho IP, de Carvalho CE, Brito LM, da Silva AB, et al. (2016) Evaluation of the in vivo leishmanicidal activity of amphotericin B emulgel: An alternative for the treatment of skin leishmaniasis. *Exp Parasitol* 164: 49-55.
32. Figueiredo KA, Neves JKO, Silva JAd, Freitas RMD, Carvalho ALM (2016) Phenobarbital loaded microemulsion: development, kinetic release and quality control. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 52: 251-264.
33. Rafiee A, Riazi-Rad F, Darabi H, Khaze V, Javadian S, et al. (2014) Ferroportin-encapsulated nanoparticles reduce infection and improve immunity in mice infected with *Leishmania major*. *Int J Pharm* 466: 375-381.
34. Tuladhar R, Oghumu S, Dong R, Peterson A, Sharpe AH, et al. (2015) Ox40L-Ox40 pathway plays distinct roles in regulating Th2 responses but does not determine outcome of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*. *Exp Parasitol* 148: 49-55.
35. Rabito MF, Britta EA, Pelegrini BL, Scariot DB, Almeida MB, et al. (2014) In vitro and in vivo antileishmania activity of sesquiterpene lactone-rich dichloromethane fraction obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. *Exp Parasitol* 143: 18-23.
36. Grando FC, Felicio CA, Twardowschy A, Paula FM, Batista VG, et al. (2009) Modulation of peritoneal macrophage activity by the saturation state of the fatty acid moiety of phosphatidylcholine. *Braz J Med Biol Res* 42: 599-605.
37. Bonatto SJ, Folador A, Aikawa J, Yamazaki RK, Pizzato N, et al. (2004) Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. *Cell Immunol* 231: 56-62.
38. Soares DC, Pereira CG, Meireles MA, Saraiva EM (2007) Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. *Parasitol Int* 56: 135-139.

39. Goncalves JC, Silveira AL, de Souza HD, Nery AA, Prado VF, et al. (2013) The monoterpene (-)-carvone: a novel agonist of TRPV1 channels. *Cytometry A* 83: 212-219.
40. Figueiredo KA, Medeiros SC, Neves JK, da Silva JA, da Rocha Tome A, et al. (2015) In vivo evaluation of anticonvulsant and antioxidant effects of phenobarbital microemulsion for transdermal administration in pilocarpine seizure rat model. *Pharmacol Biochem Behav* 131: 6-12.
41. Castro RA, Silva-Barcellos NM, Licio CS, Souza JB, Souza-Testasica MC, et al. (2014) Association of liposome-encapsulated trivalent antimonial with ascorbic acid: an effective and safe strategy in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. *PLoS One* 9: e104055.
42. Seifert K, Croft SL (2006) In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 73-79.
43. Tolouei S, Hasheminia S, Narimani M, Khamesipour A, Shatalebi M, et al. (2011) Leishmanicidal Activity of Films Containing Paromomycin and Gentamicin Sulfate both In Vitro and In Vivo. *Iran J Parasitol* 6: 60-65.
44. Mady FM, Shaker MA (2017) Enhanced anticancer activity and oral bioavailability of ellagic acid through encapsulation in biodegradable polymeric nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 12: 7405-7417.
45. Xu C, Yu Y, Ling L, Wang Y, Zhang J, et al. (2017) A C8-Modified Graphene@mSiO<sub>2</sub> Composites Based Method for Quantification of Gallic Acid in Rat Plasma after Oral Administration of Changtai Granule and Its Application to Pharmacokinetics. *Biol Pharm Bull* 40: 1021-1028.
46. Mendonca DVC, Martins VT, Lage DP, Dias DS, Ribeiro PAF, et al. (2018) Comparing the therapeutic efficacy of different amphotericin B-carrying delivery systems against visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol* 186: 24-35.
47. van Hemelrijck C, Muller-Goymann CC (2012) Rheological characterization and permeation behavior of poloxamer 407-based systems containing 5-aminolevulinic acid for potential application in photodynamic therapy. *Int J Pharm* 437: 120-129.
48. Islamuddin M, Chouhan G, Farooque A, Dwarakanath BS, Sahal D, et al. (2015) Th1-biased immunomodulation and therapeutic potential of *Artemisia annua* in murine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e3321.
49. Gill J, Malin M, Sutherland J, Gray D, Hollander G, et al. (2003) Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev* 195: 28-50.
50. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B (2009) Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 9: 833-844.
51. Rodrigues KA, Amorim LV, de Oliveira JM, Dias CN, Moraes DF, et al. (2013) *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-*Leishmania* Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 279726.
52. Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T (2002) A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 44: 143-161.
53. Peters JH, Gieseler R, Thiele B, Steinbach F (1996) Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today* 17: 273-278.
54. Young HA, Hardy KJ (1995) Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol* 58: 373-381.
55. Cleary JA, Kelly GE, Husband AJ (1999) The effect of molecular weight and beta-1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)-beta-D-glucan. *Immunol Cell Biol* 77: 395-403.
56. Niedergang F, Chavrier P (2004) Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr Opin Cell Biol* 16: 422-428.
57. Greenberg S, Grinstein S (2002) Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14: 136-145.

58. Lee WL, Harrison RE, Grinstein S (2003) Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect* 5: 1299-1306.
59. Bogdan C, Rollinghoff M (1998) The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 28: 121-134.
60. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S (1990) Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 144: 4794-4797.
61. Ueda-Nakamura T, Mendonca-Filho RR, Morgado-Diaz JA, Korehisa Maza P, Prado Dias Filho B, et al. (2006) Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitol Int* 55: 99-105.
62. Roy N, Chakraborty S, Paul Chowdhury B, Banerjee S, Halder K, et al. (2014) Regulation of PKC mediated signaling by calcium during visceral leishmaniasis. *PLoS One* 9: e110843.
63. Tejle K, Magnusson KE, Rasmusson B (2002) Phagocytosis and phagosome maturation are regulated by calcium in J774 macrophages interacting with unopsonized prey. *Biosci Rep* 22: 529-540.
64. Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Coura-Vital W, Ker HG, Moreira N, et al. (2014) Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. *Front Immunol* 5: 272.

## Referências Bibliográficas gerais

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 10, p. 1397-421, May 14 2006.

AKHLAGH, A. et al. 10-Year Trends in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Hamadan Province, West of Iran (2007-2016). **Front Public Health**, v. 7, p. 27, 2019.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **J Cell Sci**, v. 112 Pt 18, p. 2993-3002, Sep 1999.

ALIZADEH, B. H. et al. Leishmanicidal evaluation of novel synthetic chromenes. **Arch Pharm (Weinheim)**, v. 341, n. 12, p. 787-93, Dec 2008.

ALVES, M. M. M. et al. Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by Leishmania major. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 390, n. 9, p. 893-903, Sep 2017.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin Exp Dermatol**, v. 35, n. 7, p. 699-705, Oct 2010.

ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 2, p. 109-18, Feb 2012.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-81, Nov 2000.

ATHUKURI, B. L.; NEERATI, P. Enhanced Oral Bioavailability of Diltiazem by the Influence of Gallic Acid and Ellagic Acid in Male Wistar Rats: Involvement of CYP3A and P-gp Inhibition. **Phytother Res**, v. 31, n. 9, p. 1441-1448, Sep 2017.

BERMAN, J. Clinical status of agents being developed for leishmaniasis. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 14, n. 11, p. 1337-46, Nov 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de Informação de Agravos de Notificação—Sinan: normas e rotinas / Ministério da Saúde,

Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRITO, S. M. et al. Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC-DAD. **Food Chem**, v. 186, p. 185-91, Nov 01 2015.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 2, p. 179-89, Feb 2000.

CARNEIRO, S. M. et al. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biol Res**, v. 45, n. 2, p. 111-6, 2012.

CASTRO, R. A. et al. Association of liposome-encapsulated trivalent antimonial with ascorbic acid: an effective and safe strategy in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104055, 2014.

CHAWLA, A.; NGUYEN, K. D.; GOH, Y. P. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 738-49, Oct 10 2011.

CHOI, C. M.; LERNER, E. A. Leishmaniasis as an emerging infection. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v. 6, n. 3, p. 175-82, Dec 2001.

CLARK, R. A. et al. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. **J Immunol**, v. 176, n. 7, p. 4431-9, Apr 01 2006.

COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. **Amino Acids**, v. 40, n. 2, p. 269-85, Feb 2011.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 10, p. 1478-83, Oct 2011.

DE CASTRO OLIVEIRA, L. G. et al. In Vitro Effects of the Neolignan 2,3-Dihydrobenzofuran Against *Leishmania Amazonensis*. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 120, n. 1, p. 52-58, Jan 2017.

DE JESUS, N. Z. et al. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 3, p. 3203-28, 2012.

DE MEDEIROS, M. et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitol Int**, v. 60, n. 3, p. 237-41, Sep 2011.

DECUYPERE, S. et al. Molecular mechanisms of drug resistance in natural *Leishmania* populations vary with genetic background. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1514, 2012.

DEN BOER, M. et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 10, p. 1471-7, Oct 2011.

DOLAI, S. et al. Overexpression of mitochondrial *Leishmania major* ascorbate peroxidase enhances tolerance to oxidative stress-induced programmed cell death and protein damage. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 11, p. 1721-31, Nov 2009.

DUMAS, C. et al. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. **EMBO J**, v. 16, n. 10, p. 2590-8, May 15 1997.

FERNANDES, A. P. et al. Combined interleukin-12 and topical chemotherapy for established *Leishmaniasis* drastically reduces tissue parasitism and relapses in susceptible mice. **J Infect Dis**, v. 183, n. 11, p. 1646-52, Jun 1 2001.

GODINHO, J. L. et al. Efficacy of miltefosine treatment in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice. **Int J Antimicrob Agents**, v. 39, n. 4, p. 326-31, Apr 2012.

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**, v. 27, n. 9, p. 403-9, Sep 2011.

HUGHES, J. P. et al. Principles of early drug discovery. **Br J Pharmacol**, v. 162, n. 6, p. 1239-49, Mar 2011.

IINO, T. et al. Less damaging effect of whisky in rat stomachs in comparison with pure ethanol. Role of ellagic acid, the nonalcoholic component. **Digestion**, v. 64, n. 4, p. 214-21, 2001.

ISLAMUDDIN, M. et al. Th1-biased immunomodulation and therapeutic potential of *Artemisia annua* in murine visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 1, p. e3321, Jan 2015.

IWU, M. M.; JACKSON, J. E.; SCHUSTER, B. G. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitol Today**, v. 10, n. 2, p. 65-8, Feb 1994.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 8, p. 604-15, Jul 11 2011.

KHEIRANDISH, F. et al. Antileishmanial, antioxidant, and cytotoxic activities of *Quercus infectoria* Olivier extract. **Biomed Pharmacother**, v. 82, p. 208-15, Aug 2016.

KHULLAR, R. et al. Formulation and evaluation of mefenamic acid emulgel for topical delivery. **Saudi Pharm J**, v. 20, n. 1, p. 63-7, Jan 2012.

KOŁODZIEJ, H.; KIDERLEN, A. F. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells. **Phytochemistry**, v. 66, n. 17, p. 2056-71, Sep 2005.

KONDRASHIN, A. V. et al. [Global trends in malaria control. Progress and topical tasks in malaria control programs]. **Med Parazitol (Mosk)**, n. 4, p. 3-8, Oct-Dec 2011.

LEE, W. L.; HARRISON, R. E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes Infect**, v. 5, n. 14, p. 1299-306, Nov 2003.

LEHMANN, L.; KEIPERT, S.; GLOOR, M. Effects of microemulsions on the stratum corneum and hydrocortisone penetration. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 52, n. 2, p. 129-36, Sep 2001.

LINDOSO, J. A. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 9, p. e3136, Sep 2014.

LU, Y. et al. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. **Eur J Pharmacol**, v. 641, n. 2-3, p. 102-7, Sep 1 2010.

LUQUE-ORTEGA, J. R.; RIVAS, L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 4, p. 1327-32, Apr 2007.

MAAROUF, M. et al. Biochemical alterations in paromomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes. **Parasitol Res**, v. 83, n. 2, p. 198-202, 1997.

MACHADO, M. et al. Monoterpenic aldehydes as potential anti-*Leishmania* agents: activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. **Exp Parasitol**, v. 130, n. 3, p. 223-31, Mar 2012.

- MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **J Am Acad Dermatol**, v. 63, n. 2, p. 309-22, Aug 2010.
- MONTALVO, A. M. et al. [Leishmaniasis diagnosis: going from microscopic observation of parasite to DNA detection]. **Rev Cubana Med Trop**, v. 64, n. 2, p. 108-31, May-Aug 2012.
- MOREIRA, W.; LEBLANC, E.; OUELLETTE, M. The role of reduced pterins in resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates in the protozoan parasite *Leishmania*. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 3, p. 367-75, Feb 01 2009.
- MURAKAMI, S. et al. Inhibition of gastric H<sup>+</sup>, K(+)-ATPase and acid secretion by ellagic acid. **Planta Med**, v. 57, n. 4, p. 305-8, Aug 1991.
- NASCENTE, A. S. et al. Biomass, gas exchange, and nutrient contents in upland rice plants affected by application forms of microorganism growth promoters. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 24, n. 3, p. 2956-2965, Jan 2017.
- NATERA, S. et al. *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. **Int J Antimicrob Agents**, v. 29, n. 6, p. 637-42, Jun 2007.
- NEVES, D. B.; CALDAS, E. D.; SAMPAIO, R. N. Antimony in plasma and skin of patients with cutaneous leishmaniasis--relationship with side effects after treatment with meglumine antimoniate. **Trop Med Int Health**, v. 14, n. 12, p. 1515-22, Dec 2009.
- NOZAIS, J. P. The origin and dispersion of human parasitic diseases in the old world (Africa, Europe and Madagascar). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98 Suppl 1, p. 13-9, 2003.
- PANDEY, M. S.; BELGAMWAR, V. S.; SURANA, S. J. Topical delivery of flurbiprofen from pluronic lecithin organogel. **Indian J Pharm Sci**, v. 71, n. 1, p. 87-90, Jan 2009.
- PAOLINI, A. et al. Gallic acid exerts a protective or an anti-proliferative effect on glioma T98G cells via dose-dependent epigenetic regulation mediated by miRNAs. **Int J Oncol**, v. 46, n. 4, p. 1491-7, Apr 2015.
- PAPOUTSI, Z. et al. Walnut extract (*Juglans regia* L.) and its component ellagic acid exhibit anti-inflammatory activity in human aorta endothelial cells and osteoblastic activity in the cell line KS483. **Br J Nutr**, v. 99, n. 4, p. 715-22, Apr 2008.

PASTOR, J. et al. Combinations of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide against Leishmania. **Acta Trop**, v. 145, p. 31-8, May 2015.

PINHEIRO, I. M. et al. Evaluation of the in vivo leishmanicidal activity of amphotericin B emulgel: An alternative for the treatment of skin leishmaniasis. **Exp Parasitol**, v. 164, p. 49-55, May 2016.

PINK, R. et al. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 9, p. 727-40, Sep 2005.

RAMESH BABU, J. et al. Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration. **J Neurochem**, v. 106, n. 1, p. 107-20, Jul 2008.

RATHI, S. K. et al. Therapeutic trial of sodium antimony gluconate alone and in combination with ketoconazole in post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 69, n. 6, p. 392-3, Nov-Dec 2003.

REITHINGER, R.; COLEMAN, P. G. Treating cutaneous leishmaniasis patients in Kabul, Afghanistan: cost-effectiveness of an operational program in a complex emergency setting. **BMC Infect Dis**, v. 7, p. 3, Jan 30 2007.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 9, p. 581-96, Sep 2007.

RIBEIRO, T. G. et al. Antileishmanial activity of standardized fractions of *Stryphnodendron obovatum* (Barbatimao) extract and constituent compounds. **J Ethnopharmacol**, v. 165, p. 238-42, May 13 2015.

ROATT, B. M. et al. Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. **Front Immunol**, v. 5, p. 272, 2014.

RODRIGUES, K. A. et al. *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 279726, 2013.

RODRIGUES, K. A. et al. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent alpha-pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **J Ethnopharmacol**, v. 160, p. 32-40, Feb 3 2015.

ROSYPAL, A. C.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 33, n. 4, p. 921-37, viii, Jul 2003.

ROY, N. et al. Regulation of PKC mediated signaling by calcium during visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110843, 2014.

SANTA-RITA, R. M. et al. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **J Antimicrob Chemother**, v. 54, n. 4, p. 704-10, Oct 2004.

SANTOS, A. O. et al. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **J Ethnopharmacol**, v. 120, n. 2, p. 204-8, Nov 20 2008.

SARJIT, A.; WANG, Y.; DYKES, G. A. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. **Food Microbiol**, v. 46, p. 227-33, Apr 2015.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 1, p. 73-9, Jan 2006.

SHUAIBU, M. N. et al. Castalagin from *Anogeissus leiocarpus* mediates the killing of *Leishmania* in vitro. **Parasitol Res**, v. 103, n. 6, p. 1333-8, Nov 2008.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **J Postgrad Med**, v. 49, n. 1, p. 55-60, Jan-Mar 2003.

SINHA, S.; NATH, R.; SANTOS, L. Trapped two-dimensional condensates with synthetic spin-orbit coupling. **Phys Rev Lett**, v. 107, n. 27, p. 270401, Dec 30 2011.

SIQUEIRA-NETO, J. L. et al. Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 5, p. e675, May 04 2010.

SOUZA, A. C. et al. *Platonia insignis* Mart., a Brazilian Amazonian Plant: The Stem Barks Extract and Its Main Constituent Lupeol Exert Antileishmanial Effects Involving Macrophages Activation. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2017, p. 3126458, 2017.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 17, n. 5, p. 787-94, May 2008.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **Int J Infect Dis**, v. 15, n. 8, p. e525-32, Aug 2011.

TOLOUEI, S. et al. Leishmanicidal Activity of Films Containing Paromomycin and Gentamicin Sulfate both In Vitro and In Vivo. **Iran J Parasitol**, v. 6, n. 3, p. 60-5, Aug 2011.

ULIANA, S. R. B.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464-480, Apr 2018.

UR-REHMAN, T.; TAVELIN, S.; GROBNER, G. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. **Int J Pharm**, v. 409, n. 1-2, p. 19-29, May 16 2011.

VAN HEMELRIJCK, C.; MULLER-GOYMANN, C. C. Rheological characterization and permeation behavior of poloxamer 407-based systems containing 5-aminolevulinic acid for potential application in photodynamic therapy. **Int J Pharm**, v. 437, n. 1-2, p. 120-9, Nov 1 2012.

VAN SMEDEN, J. et al. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. **Biochim Biophys Acta**, v. 1841, n. 3, p. 295-313, Mar 2014.

VATTEM, D. A.; GHAEDIAN, R.; SHETTY, K. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 14, n. 2, p. 120-30, 2005.

VINCENDEAU, P. et al. Arginases in parasitic diseases. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 1, p. 9-12, Jan 2003.

WALDRON, L. S. et al. Molecular epidemiology and spatial distribution of a waterborne cryptosporidiosis outbreak in Australia. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 21, p. 7766-71, Nov 2011.

World Health Organization. (2018). Fact Sheet: Leishmaniasis. Available online at: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

XU, C. et al. A C8-Modified Graphene@mSiO<sub>2</sub> Composites Based Method for Quantification of Gallic Acid in Rat Plasma after Oral Administration of Changtai Granule and Its Application to Pharmacokinetics. **Biol Pharm Bull**, v. 40, n. 7, p. 1021-1028, 2017.

YANG, Y. H. et al. Protective effects of gallic acid against spinal cord injury-induced oxidative stress. **Mol Med Rep**, v. 12, n. 2, p. 3017-24, Aug 2015.

## Anexos



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



### CERTIFICADO

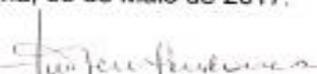
Certificamos que a proposta intitulada "Screening de moléculas naturais e desenvolvimento de bioprodutos tecnológicos para o tratamento das leishmanioses", registrada nº 265/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. FERNANDO AÉCIO DE AMORIM CARVALHO do Departamento de Bioquímica e Farmacologia/ CCS/ UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 05/05/2017.

**Sub-Projetos:**

1. "Screening de biomoléculas para o tratamento das Leishmanioses".
2. "Desenvolvimento tecnológico de uma microemulsão contendo riparina para o tratamento das Leishmanioses: obtenção, caracterização e avaliação farmacológica merip-leish".
3. "Desenvolvimento tecnológico e atividade *in vivo* de emulgel tópico leishmanicida de anfotericina B+ *platonina insignis* Mart."

Finalidade	( ) Ensino ( ) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Junho/ 2017 à Junho/ 2021
Espécie/Linhagem/raça	1. Camundongo isogênico/ Balb/c 2. Caprino/ Mestiço
Nº de Animais	1. 485 2. 01
Peso/ Idade	1. 25 g/ 2-4 semanas 2. 77 kg/ 2 anos
Sexo	1. 245 Machos e 240 Fêmeas 2. 01 Macho
Origem	Camundongos: Biotério do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais- NPPM/ CCS/ UFPI. Ovino: Biotério do Centro de Ciências Agrárias/ UFPI.

Teresina, 05 de Maio de 2017.

  
**Profª. Ivete L. de Mendonça**  
 Comissão de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
 Coordenadora