

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

ESCOLA DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FLÁVIA MONTEIRO FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO  
AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM O  
ANTIMONIATO DE MEGLUMINA LIVRE OU LIPOSSOMAL EM  
CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM *LEISHMANIA*  
*INFANTUM*.**

OURO PRETO

2013

FLÁVIA MONTEIRO FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO  
AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM  
ANTIMONIATO DE MEGLUMINA LIVRE OU LIPOSSOMAL EM  
CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM *LEISHMANIA*  
*INFANTUM*.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Simone Aparecida Rezende

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Aparecida Lima de Moura

Ouro Preto

Setembro

2013




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
Escola de Farmácia




Sessão de defesa da 79ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a FLAVIA MONTEIRO FERREIRA com a defesa da dissertação intitulada: “Avaliação da atividade Leishmanicida do extrato aquoso de própolis verde e de sua associação com antimoniato de meglumina livre ou lipossomal em camundongos Balb/c infectados com *Leishmania infantum*”, avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 13 de setembro de 2013.

  
Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão  
UFOP

  
Drª. Denise da Silveira Lemos Giunchetti  
UFMG

  
Profª. Drª. Simone Aparecida Rezende  
UFOP

F383a Ferreira, Flávia Monteiro.  
Avaliação da atividade leishmanicida do extrato aquoso de própolis verde e sua associação com o antimoniato de meglumina livre ou lipossomal em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* [manuscrito] / Flávia Monteiro Ferreira – 2013.  
82 f.: il. color.; graf., tab.

Orientadora: Profª Drª Simone Aparecida Rezende.  
Coorientadora: Profª Drª Sandra Aparecida Lima de Moura.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.  
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

1. Lipossomas - Teses. 2. Própolis - Teses. 3. Leishmaniose visceral - Teses. 4. *Leishmania infantum* - Teses. I. Rezende, Simone Aparecida. II. Moura, Sandra Aparecida Lima de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 615.37:616.993.161

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)

*A menos que modifiquemos nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.*

**Albert Einstein**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, saúde, coragem e determinação pela busca e aperfeiçoamento do conhecimento que tem me concedido a cada dia.

Aos meus pais amados, Natalícia e Wellington pelo amor incondicional, apoio e incentivo. Obrigada por me ensinarem a gratidão, o respeito, a amizade e por sempre possibilitarem a realização dos meus sonhos.

Às minhas irmãs, Marina, Adriana e Elisandréia pelo carinho e apoio.

Ao Mauro, pelo amor, paciência, amizade e incansável apoio nesses últimos anos... por ter sido meu grande companheiro em todos os momentos.

À minha orientadora professora Simone Aparecida Rezende, que me acolheu e aceitou a tarefa de me orientar. Pela grande oportunidade de trabalhar com a pesquisa e por todo empenho e compreensão.

À minha co-orientadora professora Sandra Aparecida Lima de Moura, pela ajuda ao fortalecimento deste trabalho, pelo entusiasmo, disponibilidade e aprendizado da Patologia.

Aos grandes amigos, Renata e Maurício, pessoas especiais que Deus colocou em meu caminho nestes dois anos em. Tudo que eu expressar aqui será pouco diante da eterna gratidão que tenho. É sempre muito acalentador poder contar com um ombro amigo. Obrigada pela ajuda, e que ajuda, nos experimentos que conduziram este trabalho, por compartilharem comigo os bons e maus momentos. Obrigada pela grande amizade!

À Fernanda, excelente aluna de Iniciação Científica (IC), que contribui em todos os momentos para a finalização deste trabalho.

À Míriam, pela ajuda nos experimentos e por estar sempre disposta a ajudar. Muito Obrigada!

À grande equipe do LIP, Amanda, Pauline, Bijay, Rodrigo, Hellen, Leandro e ICs, em especial a Marina, muito obrigada pelo convívio construtivo e pela amizade que demonstraram.

Ao professor Luis Carlos Crocco Afonso, por abrir as portas do LIP e pela imensa paciência.

Aos professores Frédéric Frézard e Denise pela colaboração neste trabalho.

Aos colegas da minha turma de mestrado pelas conversas e risadas.

A todos os funcionários do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFOP, em especial, Mirela, sempre presente e atenciosa às minhas solicitações. Obrigada pela dedicação.

Ao Cipharma pela oportunidade de realização deste trabalho e ao NUPEB por permitir a utilização de sua estrutura aos alunos de outros programas.

À Bioclin-Quibasa pelo fornecimento dos kits através de seu programa de incentivo à pesquisa científica. Aos profissionais dos laboratórios (LAPAC e Laboratório de Enzimologia e Proteômica), muito obrigada pela ajuda.

A Capes, pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para conclusão deste trabalho.

## RESUMO

O presente estudo avaliou a utilização do extrato aquoso de própolis verde (EAPV) e de sua associação ao antimoníato de meglumina livre ou encapsulado em lipossomas para o tratamento da leishmaniose visceral (LV) em modelo murino. *In vitro*, avaliou-se o efeito do EAPV e de sua associação com o antimoníato de meglumina livre sobre a viabilidade de células J774-A1. O EAPV não apresentou toxicidade nas concentrações testadas e foi capaz de reduzir o efeito tóxico do antimoníato de meglumina livre. Para o experimento *in vivo*, camundongos BALB/c isogênicos foram inoculados com  $1 \times 10^7$  promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* (cepa C43). Após duas semanas de infecção, os animais foram divididos em sete grupos (n=8) e tratados com: (1) dose única de tampão fosfato por via intraperitoneal (ip), (2) dose única de antimoníato de meglumina livre (AM) (30 mg/Kg) ip., (3) dose única de lipossomas vazios ip, (4) dose única de antimoníato de meglumina lipossomal (30 mg/Kg) ip., (5) dose diária de EAPV (500 mg/kg/dose) durante 14 dias via oral; (6) associação do EAPV (esquema terapêutico igual ao grupo 5) ao AM (30 mg/kg) ip. e (7) associação do EAPV (esquema terapêutico igual ao grupo 5) ao antimoníato de meglumina lipossomal (30 mg/kg) ip. Duas semanas após o tratamento, os animais foram eutanasiados e avaliou-se a carga parasitária no fígado e baço pelo método de diluição limitante. Além disso, foi realizada análise do perfil de células do baço por citometria de fluxo, toxicidade cardíaca, hepática e renal pela dosagem de marcadores bioquímicos (CKMB, TGO/ALT, TGP/ASP, creatinina) e a histopatologia do fígado e baço. O tratamento com EAPV reduziu a carga parasitária no fígado (44%), mas não no baço. Além disso, verificou-se uma redução na carga parasitária após tratamento com antimoníato de meglumina encapsulado em lipossoma no fígado e baço de aproximadamente 41%. Não foi observada diminuição na carga parasitária após tratamento com antimoníato de meglumina livre em nenhum dos órgãos avaliados. A administração concomitante do EAPV e antimoníato de meglumina livre reduziu a carga parasitária no fígado (24,4%), mas não no baço. No entanto, a administração concomitante do EAPV e antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas reduziu a carga parasitária tanto no fígado quanto no baço, porém no mesmo nível observado pelo tratamento com antimoníato de meglumina lipossomal. Os resultados demonstraram ausência de alteração no padrão fenotípico de células do baço por citometria de fluxo e na função hepática, cardíaca e renal por análises bioquímicas. As análises histopatológicas mostraram que a administração do EAPV assim como do AM lipossomal isoladamente ou em associação ao EAPV levou a uma melhor preservação dos tecidos hepático e esplênico quando comparados aos demais grupos experimentais. Os resultados desse trabalho permitiram concluir que o EAPV foi capaz de provocar uma redução da carga parasitária hepática no mesmo nível observado com dose única de AM lipossomal. No entanto sua associação com antimoníato de meglumina lipossomal foi capaz de reduzir a carga parasitária no fígado e baço de forma semelhante à formulação de antimoníato de meglumina lipossomal isolada. As drogas testadas não causaram alterações no perfil das células do baço bem como não apresentaram toxicidade para os órgãos avaliados.

Palavras chaves: Lipossomas, própolis, antimoníato de meglumina, tratamento, leishmaniose visceral, camundongo, *Leishmania infantum*.



## ABSTRACT

The present study evaluated the use of aqueous extract of green propolis (AEGP) and its association with free or liposomal meglumine antimoniate for the treatment of murine visceral leishmaniasis (VL). *In vitro*, it was evaluated the effect of AEGP on the viability of J774-A1 cells. It was observed that the AEGP showed no toxicity at the concentrations tested and it reduced the toxic effects of free meglumine antimoniate. Isogenic BALB/c mice were intravenously inoculated with  $1 \times 10^7$  *Leishmania (Leishmania) infantum* promastigotes (C43 strain). Two weeks post infection, the animals were divided into seven groups (n=8) and treated intraperitoneally, as a single dose, with either (1) phosphate buffer, (2) Sb(V) at 30 mg/kg, (3) empty liposomes, (4) liposomal Sb(V) – at 30 mg/kg, (5) AEGP at 500 mg/kg (oral, 14 days), (6) association of AEGP (500 mg/kg) with Sb(V) at 30 mg/kg or (7) association of AEGP (500 mg/kg) with Sb(V)-entrapped liposomes at 30 mg/kg. Two weeks after treatment, animals were euthanized and the parasite load associated to the liver and spleen was evaluated through the limiting dilution technique. Immunophenotyping of spleen cells was performed using flow cytometry. Enzyme activities in the serum were used to monitor hepatic, kidney and cardiac functions. Histopathological examinations of the liver and spleen were also conducted. The administration of AEGP reduced parasitic load in the liver, but not in spleen. There was a reduction in parasite load after treatment with liposomal meglumine antimoniate in the liver and spleen 41%. There was no decrease in parasite load after treatment with free meglumine antimoniate in any organ evaluated. Concomitant administration of AEGP and free meglumine antimoniate reduced the parasite load in the liver but not in spleen. However, concomitant administration of AEGP and meglumine antimoniate encapsulated in liposomes reduced the parasite load in both organs. Our results did not reveal any significant alteration in the profile of spleen cells by flow cytometry or in the liver, heart and kidney functions by biochemical analyzes. The histopathological analysis showed that administration of AEGP and/or liposomal Sb(V) was able to protect the liver and spleen tissues when compared to other groups. The results of this study indicate that the AEGP was able to reduce the parasite load only in the liver, however its association with meglumine antimoniate encapsulated in liposomes was able to reduce the parasite load in the liver and spleen. The drugs tested did not cause changes in the profile of spleen cells and showed no organ toxicity evaluated.

**Key words:** liposomes, propolis, meglumine antimony, treatment, visceral leishmaniasis, mouse, *Leishmania infantum*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Ciclo de vida dos parasitas <i>Leishmania</i> .....	20
<b>FIGURA 2</b> - Modelo proposto para o mecanismo de ação de antimoniais pentavalentes. ....	26
<b>FIGURA 3</b> - Características dos lipossomas. ....	27
<b>FIGURA 4</b> - Curva de crescimento <i>in vitro</i> dos parasitos de <i>L. infantum</i> - cepa C43.....	34
<b>FIGURA 5</b> - Processo de encapsulação do antimoniato de meglumina. ....	37
<b>FIGURA 6</b> - Delineamento experimental.....	39
<b>FIGURA 7</b> - Estratégia de análise da subpopulação de linfócitos T.....	43
<b>FIGURA 8</b> - Estratégia de análise da subpopulação de linfócitos B.....	43
<b>FIGURA 9</b> - Estratégia de análise da população de macrófago.....	43
<b>FIGURA 10</b> - Efeito de diferentes concentrações de extrato aquoso de própolis, antimoniato de meglumina e própolis associado ao antimoniato de meglumina sobre a viabilidade de células J774-A1. ....	48
<b>FIGURA 11</b> - Carga parasitária do fígado e baço de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos.....	50
<b>FIGURA 12</b> - Carga parasitária do fígado e baço de camundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos.....	54
<b>FIGURA 13</b> - Número de macrófagos ativados (atividade de NAG) no fígado (a) e baço (b) de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos.....	56
<b>FIGURA 14</b> – Foto micrografias dos cortes histológicos (5µM, HE) representativos das alterações histológicas no fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos .....	58
<b>FIGURA 15</b> – Foto micrografias dos cortes histológicos (5µm, HE) representativos das alterações histológicas no baço de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos. ..	61
<b>FIGURA 16</b> - Perfil da resposta imune adaptativa no contexto <i>ex vivo</i> de células do baço de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos.....	63
<b>FIGURA 17</b> - Perfil da resposta imune inata no contexto <i>ex vivo</i> de células do baço de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos.....	64
<b>FIGURA 18</b> - Perfil sérico de marcadores bioquímicos de camundongos BALB/c infectados com <i>L. infantum</i> e submetidos a diferentes tratamentos.....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Esquema dos diferentes tratamentos realizados. ....	39
<b>Tabela 2-</b> Relação dos anticorpos utilizados para análise do fenótipo de células do baço de camundongos BALB/c . . . . .	40
<b>Tabela 3-</b> Características organolépticas das amostras de própolis coletadas no município de Jaguaraçu . . . . .	80
<b>Tabela 4-</b> Dados cromatográficos e espectrométricos dos constituintes presentes no extrato aquoso da própolis verde de Minas Gerais (sul do Brasil) obtidos por HPLV/ESI/MS ( <i>High Pressure Liquid Chromatography/Electrospray Ionization/Mass Spectroscopy</i> ). . . . .	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABC – ATP binding cassette

ACR2 – Antimoniato redutase

ALT – Alanina amino transferase

AM – Antimoniato de meglumina

ANOVA – Análise de variância

AQP1 – Aquaporina do tipo 1

ASP – Aspartato cetoglutarato aminotranferase

CCA – Centro de Ciência Animal

CK MB – Isoenzima MB da Creatinina Quinase

CHOL – Colesterol

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

Cys – Cisteína

Cys-Gly – Cisteína-glicina

DCP - Dicetilfosfato

DMEM – Meio essencial mínimo Dulbecco

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSPC – Distearoilfosfatidilcolina

EAPV – Extrato Aquoso de Própolis Verde

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

ESI - Eletrospray-ionizante

FDA - *Food and Drug Administration*

GSH – Glutathiona

HDL – Lipoproteína plasmática de alta densidade

HE – Hematoxilina/Eosina

HPLC - *High performance liquid chromatography*

ICP-OES – Espectroscopia de Emissão de Plasma

IL – Interleucina

IP – Intraperitoneal

LAPAC – Laboratório Piloto de Análises Clínicas

LPC – Laboratório de Pesquisas Clínicas

LV – Leishmaniose visceral

MHC-II - Complexo principal de histocompatibilidade de classe II

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

NAG - N-Acetil- $\beta$ -D-Glicosaminidase

OD – Densidade óptica

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR- *Polymerase Chain Reaction*

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

pH – Potencial hidrogeniônico

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

rpm – Rotações por minuto

Sb(V)– Antimonial pentavalente

Sb (III) – Antimonial trivalente

SDS – Lauril sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

SFM – Sistema fagocítico mononuclear

SUVs – Vesículas Unilamelares

T CD4<sup>+</sup> - Linfócito T auxiliar

T CD8<sup>+</sup> - Linfócito T citotóxico

T(SH)<sub>2</sub> – Tripanotona

TDR1 – Redutase Dependente de Tiol

TGF-β – Fator transformador de crescimento beta

TR – Tripanotona redutase

T<sub>t</sub> - Temperatura de transição de fase

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	VI
<b>ABSTRACT</b> .....	VII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	VIII
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	X
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1. LEISHMANIOSE.....	18
2.2. CICLO DE VIDA DO PARASITO.....	19
2.3. RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO.....	20
2.4. TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	22
2.5. MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIMONIAIS.....	24
2.6. LIPOSSOMAS.....	26
2.7. LIPOSSOMAS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE.....	28
2.8. PRÓPOLIS.....	29
<b>3. OBJETIVO GERAL</b> .....	32
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1. ANIMAIS.....	33
4.2. CEPA DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> .....	33
4.3. CULTURA DE <i>LEISHMANIA</i> E CURVA DE CRESCIMENTO.....	33
4.4. CULTURA DE CÉLULAS.....	33
4.5. OBTENÇÃO DA PRÓPOLIS.....	34
4.6. PREPARO DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS.....	35
4.7. OBTENÇÃO DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA (AM).....	35

4.8. PREPARO DOS LIPOSSOMAS .....	35
4.9. ENCAPSULAÇÃO DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA .....	36
4.10. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE E ANTIMONIATO DE MEGLUMINA LIVRE .....	37
4.11. INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	38
4.12. QUANTIFICAÇÃO DE PARASITOS.....	39
4.13. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA LIVRE OU EM FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL CONVENCIONAL. ....	40
4.14. AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE CÉLULAS DO BAÇO, POR CITOMETRIA DE FLUXO, APÓS ADMINISTRAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PROPOSTAS EM ANIMAIS INFECTADOS POR <i>L. INFANTUM</i> . ....	42
4.15. DOSAGEM DA ATIVIDADE DA N-ACETIL- $\beta$ -D-GLICOSAMINIDASE .....	44
4.16. ANÁLISES HISTOLÓGICAS .....	44
4.17. ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	45
4.18. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	46
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
5.1. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR .....	48
5.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA LIVRE OU EM FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL EM CAMUNDONGOS BALB/C. ....	49
5.2.1 ETAPA 1 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE.....	50
5.2.2 ETAPA 2 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE ASSOCIADO AO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA LIVRE OU ENCAPSULADO EM LIPOSSOMA. ....	51
5.3. QUANTIFICAÇÃO DO ACÚMULO/ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS TECIDUAIS DETERMINADA PELA ATIVIDADE DA ENZIMA N-ACETIL- $\beta$ -D-GLICOSAMINIDASE (NAG) EM ANIMAIS	



INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> APÓS ADMINISTRAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PROPOSTAS. ....	55
5.4. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO E BAÇO.....	56
5.5. DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE CÉLULAS DO BAÇO APÓS ADMINISTRAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PROPOSTAS EM CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> . ....	62
5.6. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE APÓS TRATAMENTO COM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA LIVRE OU ENCAPSULADO EM LIPOSSOMA, ASSOCIADOS AO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE.....	66
<b>6 – RESUMO DOS RESULTADOS</b> .....	<b>69</b>
<b>7.CONCLUSÃO</b> .....	<b>71</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>72</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é um crescente problema de saúde pública, sendo endêmica em 88 países e ameaçando cerca de 350 milhões de pessoas ao redor do mundo (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2011). A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma doença crônica grave, causada por espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*. No Brasil, o agente etiológico é a *Leishmania infantum* ou *Leishmania chagasi*, também encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia. Devido às semelhanças encontradas entre as espécies *L. infantum* e *L. chagasi*, atualmente são consideradas a mesma espécie (MAURÍCIO *et al.*, 2000). A principal forma de transmissão do parasita para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. A *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* é a principal espécie transmissora da *L. infantum* no Brasil (GONTIJO *et al.*, 2004). O diagnóstico e tratamento precoce da LV são essenciais já que a doença é frequentemente fatal em pacientes sintomáticos não tratados, principalmente devido às infecções secundárias favorecidas pela intensa imunossupressão dos pacientes (BADARÓ *et al.*, 1994).

Por mais de setenta anos, o tratamento da leishmaniose vem sendo realizado com antimoniais pentavalentes (Sb (V)), que são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento (FREZARD *et al.*, 2005). No entanto, estas drogas são tóxicas, exigem administração endovenosa ou intramuscular, nem sempre são efetivas e são usadas em esquemas prolongados, o que muitas vezes leva o paciente a desistir do tratamento. A elevada toxicidade associada ao uso dos Sb (V) impossibilita sua utilização em gestantes e em pacientes com doenças graves de fígado, rins, coração e pulmões (FREZARD *et al.*, 2005). Desta forma, o estudo de novas drogas e de sistemas de vetorização para o tratamento da leishmaniose tem sido estimulado pela Organização Mundial da Saúde (DEMICHELI *et al.*, 2004).

Neste sentido, o uso de lipossomas que permitem uma liberação lenta do medicamento neles contido, auxiliando na redução da dose da droga e na duração da quimioterapia, pode melhorar o uso dos medicamentos convencionais utilizados no tratamento da LV (STORM & CROMMELIN, 1998). Os lipossomas são capazes de alcançar os fagolisossomos após

fagocitose pelos macrófagos, liberando seu conteúdo após degradação de sua cápsula lipídica no compartimento ácido, permitindo a ação do fármaco diretamente sobre o parasito. Além disso, estudos utilizando extratos vegetais e compostos derivados de plantas vêm sendo realizados na busca de uma terapia eficaz e menos tóxica para o tratamento da leishmaniose (ROCHA *et al.*, 2005; CARVALHO & FERREIRA, 2001, ABREU *et al.*, 1999).

Entre os produtos naturais, um dos mais conhecidos e extensamente pesquisado é a própolis. A própolis é uma substância resinosa que as abelhas coletam de exsudados de diferentes plantas (MARCUCCI, 1996) e apresenta uma composição química muito complexa com mais de 300 componentes descritos até o momento. Já foram relatadas várias atividades para a própolis, dentre as quais hepatoprotetora, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória e antioxidante (ORSOLIC *et al.*, 2010) sendo utilizada no tratamento de várias doenças (MARCUCCI & BANKOVA, 1999). Além disso, foi descrito o papel antiparasitário contra o *Trypanosoma cruzi* e contra a *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* (DE CASTRO, 2001; MACHADO *et al.*, 2007; AYRES *et al.*, 2007).

Outro importante papel da própolis é no controle do processo inflamatório e no reparo tecidual. SONG *et al.* (2002) comprovaram que o extrato etanólico de própolis foi capaz de inibir a angiogênese em estudos utilizando a membrana corio-alantóide de aves. Além disso, estudos demonstraram que a administração de ácidos clorogênicos (principalmente ácido cafeico e ácido 5-cafeoilquínico), compostos presentes na própolis, reduz a expressão de moléculas de adesão importante na migração de leucócitos e inibe a enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) tendo um efeito anti-inflamatório (KRAKAUER, 2002; CHANG *et al.*, 2009; HAN *et al.*, 2009). A atividade anti-inflamatória da própolis, de uma maneira geral, é atribuída a compostos como o ácido cafeico, a quercetina, a narigenina, o éster fenílico e é consequência da supressão da síntese de prostaglandinas, leucotrienos e de óxido nítrico pelos macrófagos (NAGAOKA *et al.*, 2003).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LEISHMANIOSE

A leishmaniose humana é distribuída mundialmente, sendo endêmica em 88 países principalmente em áreas tropicais e subtropicais das Américas, Ásia, África e Europa. Atualmente, estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas estejam infectadas e aproximadamente 367 milhões encontram-se em risco para adquirir a doença, estando a incidência anual estimada em cerca de 500.000 casos para a leishmaniose visceral, 90% dos quais ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia e Nepal. (WHO, 2010).

A leishmaniose é causada por parasitas protozoários transmitidos através da picada de insetos. Esta doença acarreta na manifestação de diferentes sintomas clínicos que dependem da espécie de *Leishmania* e da resposta imune montada pelo hospedeiro (AWASTHI, *et al.*, 2004).

Existem quatro principais formas clínicas para a leishmaniose – leishmaniose cutânea, muco-cutânea, difusa e visceral. A leishmaniose cutânea, causada principalmente por *L. braziliensis* e *Leishmania guyanensis*, no Novo Mundo e *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica*, no Velho Mundo, é caracterizada por uma ou várias lesões ulcerativas em áreas expostas da pele. Essas lesões podem curar-se espontaneamente, embora lentamente, em indivíduos imunocompetentes. A leishmaniose cutâneo-difusa, causada principalmente por *L. braziliensis*, ocorre por disseminação do parasito por via hematogênica ou linfática com consequente formação de lesões não contíguas. Na leishmaniose muco-cutânea, a presença de úlceras destrutivas e progressivas na região do nariz, boca, faringe e laringe, torna essa, a forma mais desfigurante da leishmaniose. Resultantes de uma resposta imune exacerbada e ineficaz à *L. braziliensis*, as ulcerações podem ocorrer meses ou anos após o primeiro episódio de leishmaniose cutânea. A leishmaniose difusa apresenta-se por lesões difusas não ulceradas e ricas em parasitos. Decorre de um processo anérgico caracterizado pela resposta de linfócitos T ausente ou muito deficiente. O principal agente etiológico é a *L. amazonensis* (WHO, 2010; AWASTHI *et al.*, 2004, CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Na LV, o parasito invade órgãos internos, sendo considerada a mais severa forma da doença (WHO, 2010). É causada por *Leishmania donovani* na Europa, Ásia e África, enquanto nas Américas a espécie *L. infantum* é a responsável pelas infecções (HERWALDT, 1999). O tropismo para órgãos como o fígado, baço e medula óssea faz com que após um período de incubação, que geralmente dura entre dois e seis meses, os pacientes com LV apresentem sinais e sintomas característicos tais como surtos irregulares de febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e pancitopenia. Quando não tratada, a LV pode levar à morte em até dois anos (AWASTHI *et al.*, 2004; WHO, 2010).

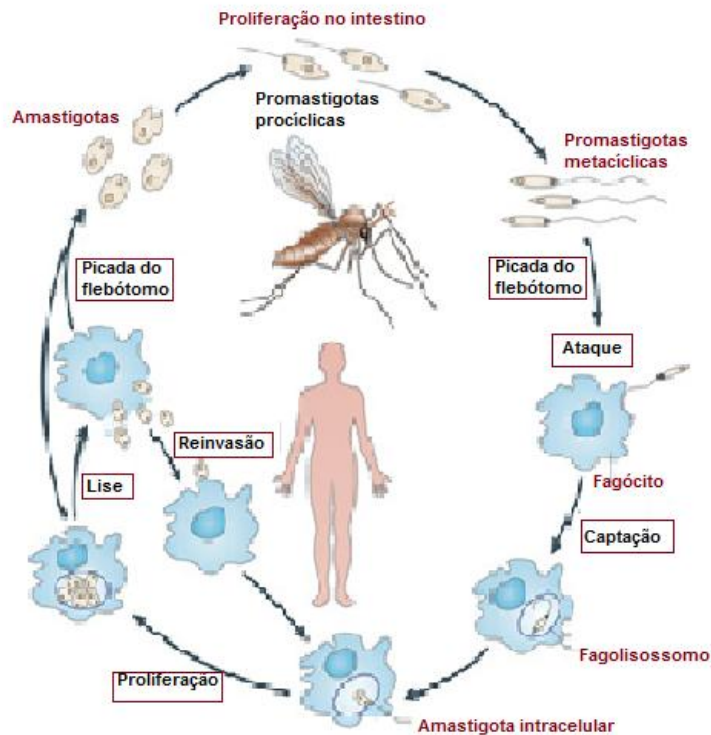
## 2.2. CICLO DE VIDA DO PARASITO

A leishmaniose é causada por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. É caracterizadas pela invasão de células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) do hospedeiro mamífero seguida pela multiplicação no interior dos macrófagos. O parasito pode ser encontrado na forma promastigota, flagelada e extracelular, que está presente no inseto vetor e na forma amastigota, arredondada e intracelular, presente nas células do SFM dos mamíferos (AWASTHI *et al.*, 2004).

O inseto vetor do gênero *Phlebotomus* (presente no Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (presente no Novo Mundo) infecta-se quando suga o sangue de um indivíduo infectado ou reservatório animal. O parasita, em sua forma amastigota, tem aspecto arredondado, mede 3-7µm de diâmetro e vive em macrófagos. O flebótomo ingere macrófagos infectados durante o repasto sanguíneo e os amastigotas são liberados no estômago do inseto onde se transformam em promastigotas, uma forma móvel, flagelada e alongada (10-20µm). Em seguida os promastigotas migram para o trato alimentar do inseto, onde vivem no meio extracelular e se multiplicam por divisão binária. Quando o inseto finalmente realiza o repasto sanguíneo em um mamífero hospedeiro, inocula promastigotas de *Leishmania* juntamente com a saliva. Uma vez no hospedeiro, os promastigotas são fagocitados pelos macrófagos onde rapidamente se transformam em amastigotas, multiplicando-se e conseqüentemente levando à lise destas células. Os amastigotas liberados são fagocitados por outros macrófagos, continuando o ciclo. Por fim, todos os órgãos com alta concentração de células do SFM estão

parasitados, nos casos de leishmaniose visceral, especialmente fígado, baço, linfonodos e medula óssea (Figura 1) (AWASTHI *et al.*, 2004).

**Figura 1- Ciclo de vida dos parasitas *Leishmania*.** Durante o repasto sanguíneo, promastigotas são transmitidas ao hospedeiro mamífero. Formas promastigotas metacíclicas são então fagocitadas por células do SFM. Após estabelecer uma resistência intracelular, promastigotas metacíclicas se transformam em amastigotas, sem flagelos visíveis. Amastigotas se multiplicam nas células hospedeiras, levando à ruptura da mesma e permitindo a reinfeção de outros fagócitos. O ciclo de transmissão se completa quando fagócitos infectados são ingeridos por outro flebotomíneo durante o repasto sanguíneo, e os amastigotas se diferenciam em promastigotas no estômago dos insetos transformando-se posteriormente em formas infectantes – metacíclicas – que infectarão novo hospedeiro mamífero em um próximo repasto sanguíneo. Adaptado de Kaye *et al.*, 2011.



### 2.3. RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO

A leishmaniose é um perfeito exemplo da interação parasito-hospedeiro. Através de anticorpos IgG e de fibronectinas, ocorre o fenômeno de adesão dos promastigotas metacíclicos à superfície dos macrófagos, que possuem receptores para a porção Fc das IgG presentes no local e para as fibronectinas. Os promastigotas aderem a algumas moléculas de superfície como CR1, CR3 e C3b antes de serem internalizados. Uma vez internalizados, promastigotas se transformam em amastigotas intracelulares. Como forma de evitar a

degradação nos fagolisossomos, as espécies de *Leishmania* desenvolveram vários mecanismos, dentre eles, a inibição da fusão do fagolisossomo com organelas endocíticas ricas em hidrolases através de um mecanismo dependente do LPG presente na membrana celular do parasito, o que acarreta perturbação da membrana do fagossomo (MOUGNEAU *et al.*, 2011).

Imediatamente após a inoculação dos parasitas no hospedeiro vertebrado, um processo inflamatório local é iniciado, envolvendo um acúmulo de células no local. Os neutrófilos contribuem para a eliminação da *Leishmania* através de interações celulares com os macrófagos e fagocitose de parasitos. Os monócitos, em grande influxo ao local da picada, fagocitam os parasitos no intuito de debelar a infecção (AWASTHI *et al.*, 2004; MOUGNEAU *et al.*, 2011).

Os linfócitos T “helper” (Th) têm um importante papel na resposta imune. Subpopulações funcionalmente distintas de linfócitos T CD4+, principalmente Th1 e Th2, têm sido identificadas durante o processo de infecção do parasito baseado no perfil de citocinas produzido. A presença de IL-12 durante a ativação dos linfócitos T promove a diferenciação de linfócitos Th0 em Th1, que produzem grandes quantidades de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL-2 contribuindo para a eliminação do parasito por processos que incluem a ativação de macrófagos. Em indivíduos susceptíveis, as células Th0 se diferenciam em células Th2 o que aumenta a secreção de IL-4, IL-5 e IL-13. Essa resposta, por sua vez, confere susceptibilidade a *Leishmania* através da inibição da produção de IFN- $\gamma$  e de IL-12 (AWASTHI *et al.*, 2004). Durante a infecção, ocorrem também expansão e multiplicação de células T CD8<sup>+</sup> e, apesar de não estarem envolvidas na resolução da infecção, contribuem através da liberação de IFN- $\gamma$  e na rápida resolução das lesões em casos de leishmaniose tegumentar. As células dendríticas apresentam um papel primordial na liberação de IL-12 e de interferon do tipo 1, que promovem a diferenciação de células Th0 em células Th1 efetoras, aumentando a resistência à infecção por *Leishmania* (MOUGNEAU *et al.*, 2011).

Estudos têm mostrado que macrófagos sofrem mudanças após a infecção, como por exemplo, o aumento da resistência à apoptose, a diminuição da expressão de moléculas MHC e a inibição da produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI) e nitrogênio (AWASTHI *et al.*, 2004). Além disso, a *Leishmania* diminui a produção de IL-12 pelos macrófagos, diminui a expressão de colesterol na membrana celular e aumenta a produção de

IL-10 pelos mesmos. O fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) é uma potente citocina reguladora que controla tanto o início como a resolução de respostas inflamatórias através da regulação da quimiotaxia, ativação, e a sobrevivência dos linfócitos, células NK, células dendríticas, macrófagos, mastócitos, e granulócitos. A atividade reguladora de TGF- $\beta$  é modulada pelo estado de diferenciação celular e com a presença de citocinas inflamatórias e moléculas co-estimuladoras. No entanto, a infecção por *Leishmania* leva a uma ativa produção dessa citocina pelos macrófagos desencadeando a susceptibilidade à infecção (MOUGNEAU *et al.*, 2011).

#### 2.4. TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

O primeiro tratamento para a leishmaniose surgiu em 1912, quando Gaspar de Oliveira Vianna observou que o tártaro emético era eficaz na terapêutica da leishmaniose tegumentar americana. Essa atividade foi confirmada posteriormente na LV. No entanto, devido aos efeitos tóxicos e graves efeitos colaterais, o tártaro emético foi substituído por compostos estibiados pentavalentes (RATH *et al.*, 2003; DEMICHELI *et al.*, 2004). Outros fármacos como a anfotericina B, a anfotericina B lipossomal, a miltefosina e a paramomicina também estão disponíveis para o tratamento da LV.

Há mais de 70 anos, os Sb(V) são o tratamento de escolha para a LV em muitos países (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Atualmente, existem duas formulações à base de Sb(V) em uso, os complexos de Sb(V) com N-metil-D-glucamina (antimoniato de meglumina (AM) ou Glucantime<sup>®</sup>) e com gluconato de sódio (estibogluconato de sódio ou Pentostam<sup>®</sup>) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; FRÉZARD *et al.*, 2009). No entanto, a necessidade de administração diária por via parenteral (intravenosa ou intramuscular), num período de 28 a 30 dias, associado a efeitos colaterais frequentes como arritmia e pancreatite aguda são limitações sérias, que podem levar o paciente a desistir do tratamento (CHAPPUIS *et al.*, 2007, SUNDAR *et al.*, 2013). Outro inconveniente associado ao tratamento com Sb(V) é a restrição ao tratamento em pacientes com idade inferior a 2 ou superior a 45 anos, grávidas e pessoas com doenças graves de fígado, rins, coração, pulmões e/ou desnutrição grave (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Além disso, o aumento de casos de resistência ao tratamento é



relatado principalmente na Índia e Nepal. Em algumas regiões da Índia, 60% dos pacientes tratados anteriormente com antimoniais são refratários ao tratamento (SUNDAR *et al.*, 2008). As baixas doses administradas e a descontinuidade do tratamento estão entre as maiores causas da resistência aos antimoniais (WHO, 2009).

A anfotericina B é um antibiótico leishmanicida disponível comercialmente, com ação em formas promastigotas e amastigotas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; SUNDAR *et al.*, 2013). Atualmente duas apresentações de anfotericina B são disponibilizadas no mercado: o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; SUNDAR *et al.*, 2013) sendo opções no tratamento de gestantes e de pacientes que tenham contra-indicações ou que apresentaram toxicidade ou refratariedade relacionada ao uso dos antimoniais pentavalentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Devido às elevadas taxas de falhas terapêuticas, em algumas regiões da Índia a anfotericina B convencional (desoxicolato de anfotericina B) substitui o Sb(V), sendo considerada o tratamento de primeira linha para a LV (CHAPPUIS *et al.*, 2007). A administração da anfotericina B dá-se por via parenteral em um regime de 15 infusões em dias alternados as quais provocam dor, febre e rigidez local. Reações adversas como nefrotoxicidade, hipocalcemia e miocardite também são frequentes necessitando de acompanhamento e hospitalização, o que aumenta o custo da terapia. (CHAPPUIS *et al.*, 2007; SUNDAR *et al.*, 2013).

Para minimizar os efeitos adversos da anfotericina B convencional, diferentes formulações lipídicas foram produzidas levando a uma menor exposição dos órgãos não infectados à droga livre. Formulações lipídicas de anfotericina B são rapidamente concentradas em órgãos tais como o fígado e baço e aí permanecem durante longos períodos de tempo. A tolerância é grandemente melhorada e efeitos adversos, incluindo a nefrotoxicidade, são minimizados (SUNDAR *et al.*, 2013). A anfotericina B lipossomal é considerada por muitos especialistas como a melhor droga existente contra LV e é utilizada como tratamento de primeira linha na Europa e nos Estados Unidos. No entanto, o elevado custo da anfotericina B lipossomal ainda é um limitante a sua utilização em muitos países (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

A miltefosina foi o primeiro tratamento oral para a leishmaniose (CHAPPUIS *et al.*, 2007; BALASEGARAN *et al.*, 2012; SUNDAR *et al.*, 2013). Devido à facilidade de uso e a

possibilidade de atendimento ambulatorial, chegou a ser a droga de escolha no programa de eliminação da LV feito na Índia, Nepal e Bangladesh (SUNDAR *et al.*, 2013). No entanto, estudo recente feito por Sundar *et al.* (2013) mostrou que a eficácia do medicamento parece ter diminuído e a taxa de recaída aumentado. A miltefosina é uma droga teratogênica, sendo seu uso estritamente proibido em mulheres grávidas e em mulheres que possam engravidar dentro de dois meses de tratamento. Além disso, a utilização da miltefosina necessita de monitoramento constante de efeitos colaterais gastrointestinais, toxicidade hepática ocasional e nefrotoxicidade (SUNDAR *et al.*, 2013).

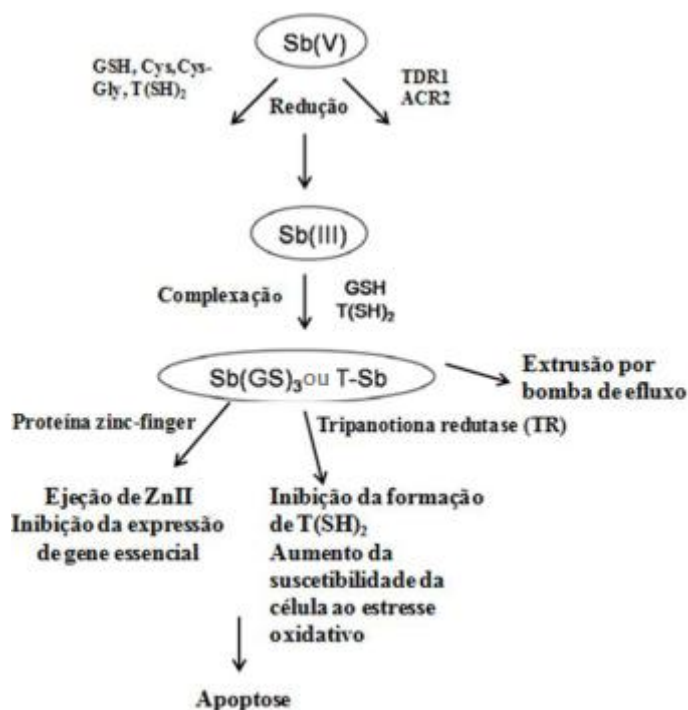
A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo utilizado no tratamento da LV numa formulação parenteral (CHAPPUIS *et al.*, 2007; BALASEGARAN *et al.*, 2012; SUNDAR *et al.*, 2013). Seu consumo na África Oriental aumenta a cada dia embora sua implementação tenha sido limitada a utilização em combinação com estibogluconato de sódio. Um regime terapêutico de 17 dias de estibogluconato de sódio e paromomicina mostrou-se tão seguro e eficaz como o tratamento de 30 dias padrão de estibogluconato de sódio na África Oriental. Uso em monoterapia tem sido evitado devido ao risco de resistência e sua eficácia variável entre as regiões geográficas (BALASEGARAN *et al.*, 2012).

## **2.5. MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIMONIAIS.**

Há mais de 70 anos, os antimoniais pentavalentes estão em uso para o tratamento de todas as formas clínicas da leishmaniose, sendo inclusive a droga de escolha em muitos países (FREZARD *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2003; HALDAR *et al.*, 2011). No entanto, o mecanismo de ação destes compostos ainda não está bem elucidado (SERENO *et al.*, 1998; FREZARD *et al.*, 2009). Alguns estudos sugerem que o Sb(V) atue como uma pró-droga, que *in vivo*, é reduzida a uma forma mais tóxica e ativa, o antimônio trivalente (Sb (III) (FERREIRA *et al.*, 2003; FREZARD *et al.*, 2009; HALDAR *et al.*, 2011). Essa redução requer a participação ativa de compostos tióis tanto do hospedeiro mamífero quanto do parasito. A glutatona (GSH) é o principal tiol presente no citosol das células de mamíferos e parece promover a redução de Sb (V) a Sb (III), por meio de uma reação de óxido-redução, favorecida por pH baixo (5,0) e elevadas temperaturas (37°C). Estas condições são

semelhantes às apresentadas nos fagolisossomos dos macrófagos, onde se encontram as formas amastigotas (FREZARD *et al.*, 2001, HALDAR *et al.*, 2011). A cisteína (Cys) e a glicil-cisteína (Cys-Gly) são tióis predominantes dentro dos lisossomos e a tripanotona ( $T(SH)_2$ ), tiol presente dentro do parasito. Uma enzima parasito-específica, a redutase tiol dependente (TDR1) também parece estar envolvida no processo de redução do Sb (V) a Sb (III). Essa enzima é expressa nas formas amastigotas aproximadamente 10 vezes mais que nas formas promastigotas. Desta forma, essas informações podem explicar a maior especificidade do Sb (III) para as formas amastigotas do parasito (DENTON *et al.*, 2004; HALDAR *et al.*, 2011). A enzima antimônio redutase (ACR2) também presente no parasito está envolvida na redução do Sb (V) (FREZARD *et al.*, 2009). O Sb (III) entra no parasito *Leishmania* através de uma aquagliceroporina (AQP 1). A elevada afinidade do Sb (III) com biomoléculas contendo nitrogênio e sulfidrilas incluindo tióis, peptídeos, proteínas e enzimas é provavelmente responsável pelo seu mecanismo leishmanicida (FRÉZARD *et al.*, 2001; FRÉZARD *et al.*, 2009). A formação de complexos estáveis com os tióis acarreta a morte celular (SUN *et al.*, 2000; FRÉZARD *et al.*, 2001). Uma vez que o Sb (III) encontra-se na célula, ele pode ser conjugado com a  $T(SH)_2$ , e este complexo formado é sequestrado para dentro de um vacúolo ou expelido por proteínas transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*) (MUKHOPADHYAY *et al.*, 1996; LÉGARÉ *et al.*, 2001). A tripanotona redutase (TR), e as proteínas *zinc-finger*, são os principais alvos para o Sb (III) (FRÉZARD *et al.*, 2009). O sistema tripanotona/TR, é responsável por manter a  $T(SH)_2$  em seu estado reduzido, protegendo os tripanossomatídeos dos danos oxidativos e metais pesados tóxicos e entregando equivalentes reduzidos para a síntese de DNA (KRAUTH-SIEGEL & COMINI, 2008). Contudo, o Sb (III) pode interferir no metabolismo da  $T(SH)_2$  por inibir a TR, induzindo um rápido efluxo de  $T(SH)_2$  na *Leishmania* (CUNNINGHAM & FAIRLAMB, 1995, WYLLIE *et al.*, 2004). O Sb (III) também pode se ligar a peptídeos *zinc-finger* CCHC e promover a ejeção de ZnII (DEMICHELI *et al.*, 2008), o que pode ser tóxico para a célula (LEON & ROTH, 2000). O tratamento de amastigotas de *L. infantum* com baixas concentrações de Sb (III) induzem a fragmentação do DNA e consequente apoptose (SERENO *et al.*, 2001) (Figura 2).

**Figura 2- Modelo proposto para o mecanismo de ação de antimoniais pentavalentes.** De acordo com o modelo de pró-droga, o Sb(V) é reduzido a Sb(III) e este exerce a atividade leishmanicida sobre os parasitos. Adaptado de FRÉZARD, *et al.*, (2009).



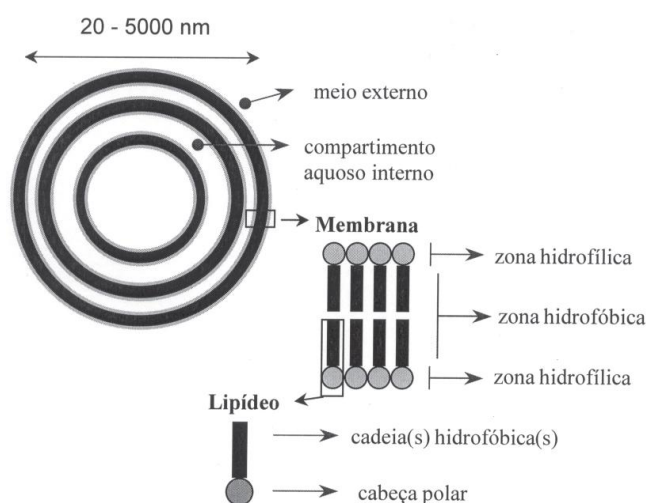
## 2.6. LIPOSSOMAS

Lipossomas são vesículas esféricas, constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídeos que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (FREZARD, 1999) (Figura 3). Podem encapsular substâncias hidrofílicas, que ficam no compartimento aquoso e substâncias lipofílicas, que podem estar inseridas ou adsorvidas na membrana (BATISTA *et al.*, 2007). A encapsulação do fármaco protege o princípio ativo de uma degradação rápida *in vivo* ou mesmo de uma rápida eliminação pelo organismo (FREZARD *et al.*, 2005). Os lipossomas apresentam uma elevada biocompatibilidade, principalmente quando são formados por lipídeos pertencentes ao grupo dos lipídeos naturais (FREZARD, 1999).

Lipossomas convencionais são compostos de fosfolipídeos e colesterol além de um lipídeo com carga negativa ou positiva, o que evita a agregação das vesículas aumentando a estabilidade em suspensão. Estes são rapidamente removidos da circulação devido ao reconhecimento e captura pelas células do SFM. Além dos lipossomas convencionais, lipossomas de longa duração *in vivo* são obtidos por diferentes métodos, incluindo o

revestimento da superfície lipossômica com componentes hidrofílicos naturais como o monossialogangliosídeo GM1 e fosfatidilinositol, ou de polímeros hidrofílicos sintéticos, especificamente os polietilenoglicóis (PEG). Este tipo de lipossomas, conhecido como lipossomas furtivos promove uma presença prolongada da substância no organismo, além de distribuí-la para outros órgãos, além daqueles do SFM (TORCHILIN, 2005; FREZARD *et al.* 2005; BATISTA *et al.*, 2007).

**Figura 3- Características dos lipossomas. FREZARD *et al.* (2005).**



Classicamente, os lipossomas são formados a partir do glicerofosfolípídeo e fosfatidilcolina e possuem tamanho médio que pode variar de 20 a 5000 nm de diâmetro. São facilmente manejáveis, sendo variáveis como tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio interno alteradas de acordo com as necessidades farmacológicas. Assim, os lipossomas podem ter sua fluidez modificada de acordo com sua composição lipídica. Sendo assim, podem ser encontrados na fase cristal-líquido ou “fluídos” quando formados de lipídeos cuja temperatura de transição de fase ( $T_t$ ) é menor que a temperatura do meio estudado e em fase gel quando formados de lipídeos cuja  $T_t$  é maior que a temperatura do meio estudado. O colesterol é frequentemente incorporado à formulação do lipossoma com o objetivo de aumentar a estabilidade do mesmo por aumentar a rigidez das membranas no estado "cristal-líquido" e reduzir a rigidez e os defeitos estruturais das membranas no estado "gel" (FREZARD *et al.*, 2005).

A taxa de encapsulação de uma substância em lipossoma e a relação substância encapsulada/lipídeo são parâmetros importantes que devem ser considerados no momento do preparo de uma formulação. Ambos estão relacionados com a capacidade de encapsulação de uma substância no lipossoma. Na teoria, taxas de encapsulação de 100% podem ser obtidas com a incorporação de substâncias lipofílicas no lipossoma, porém isso é praticamente impossível para substâncias hidrofílicas, uma vez que é necessária a coexistência dos compartimentos aquosos interno e externo (FREZARD *et al.*, 2005).

Dentro do organismo, os lipossomas são naturalmente capturados pelos macrófagos do SFM, sendo este processo favorecido pela opsonização, que ocorre assim que os lipossomas entram na corrente sanguínea. Depois da fagocitose, os lipossomas são degradados pelas fosfolipases lisossomais e a substância é liberada nos fagolisossomas, podendo se difundir para o citosol ou ser excretada para o meio extracelular (FREZARD *et al.*, 2005; SCHETTINI *et al.*, 2006).

## **2.7. LIPOSSOMAS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE**

Durante a década de 70, pesquisadores criaram uma nova abordagem para o tratamento da LV ao utilizarem lipossomas convencionais contendo drogas leishmanicidas. O estudo demonstrou que os antimoniais pentavalentes encapsulados em lipossomas foram 200-700 vezes mais eficazes que na forma livre, em modelo experimental de LV (BLACK *et al.*, 1977; ALVING *et al.*, 1978). Valladares *et al.*, (2001), ao testar uma formulação lipossomal de antimoniato de meglumina em cães, observou uma maior eficácia da droga associada à diminuição da toxicidade, quando comparada com o tratamento com a forma livre do medicamento. A capacidade dos lipossomas de proporcionar uma liberação constante do fármaco e sua tendência de ser capturado por células do SFM principalmente do fígado, baço e medula óssea, órgãos onde se encontram os parasitos, pode explicar tal fato (FRÉZARD *et al.*, 2005).

A quimioterapia antimonial atual apresenta elevada toxicidade e administração complexa, necessitando de melhorias. No entanto, apesar dos resultados promissores obtidos com lipossomas em modelos experimentais de LV, nenhuma formulação farmacêutica de

lipossomas contendo antimoniais atingiu o comércio até agora, em parte devido a dificuldade de estabilizar em longo prazo, formulações lipossomais de compostos solúveis em água (SCHETTINI *et al.*, 2006).

Por outro lado, uma formulação lipossomal de anfotericina B, o AmBisome<sup>®</sup>, foi aprovada pela FDA ("Food and Drug Administration") para o tratamento da leishmaniose (BALASEGARAM *et al.*, 2012). A tolerância é grandemente melhorada e efeitos adversos, incluindo a nefrotoxicidade, são minimizados, o que permite a administração de elevadas doses da droga em curtos períodos de tempo (SUNDAR *et al.*, 2013). O tratamento com a anfotericina B lipossomal foi considerado altamente seguro e eficaz na Índia, Bangladesh e Nepal, onde foi recentemente recomendado como tratamento de primeira linha pelo comitê de especialistas da OMS (WHO, 2010).

## 2.8. PRÓPOLIS

A própolis é conhecida e utilizada pelo homem desde os tempos mais remotos (PEREIRA *et al.*, 2002) e, na metade dos anos 80, tornou-se um produto importante na medicina complementar (LUSTOSA, 2007). Atualmente, em várias partes do mundo, a própolis é comercializada pela indústria farmacêutica como um medicamento alternativo (LOTTI *et al.*, 2010).

A própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas para vedar e esterilizar colmeias (BANKOVA *et al.*, 2000). A palavra própolis é derivada do grego onde *pro* significa "em defesa de" e *polis* "cidade", isto é, em defesa da cidade ou da colmeia (PEREIRA *et al.*, 2002). É coletada de diferentes partes de plantas como brotos, cascas e exsudados de árvores, sendo sua composição química dependente da especificidade da flora local. Este fato resulta na diversidade notável da composição química da própolis, especialmente a proveniente de regiões tropicais (BANKOVA *et al.*, 2005). De acordo com Kumazawa *et al.* (2004), em amostras brasileiras predominam terpenóides e derivados prenilados de ácidos p - cumárico, enquanto as amostras da China e Europa contêm principalmente ésteres de ácidos fenólicos e flavonóides. Apesar das possíveis diferenças na composição, a maioria das amostras de própolis apresenta semelhança considerável na sua

natureza química global: 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de outros compostos orgânicos (GÓMEZ-CARAVACA *et al.*, 2006).

A própolis do sudeste brasileiro, conhecida como própolis verde devido à sua cor, é extensivamente utilizada em alimentos e bebidas, especialmente no Brasil e no Japão, com o objetivo de “melhorar a saúde” e prevenir muitas doenças (CAMPOS *et al.*, 1998; MARCUCCI, 2000; MISSIMA *et al.*, 2007). No Brasil, a planta mais importante como fonte de própolis verde é a *Baccharis dracunculifolia* D. C. (alecrim do campo), uma Asteraceae (KUMAZAWA *et al.*, 2003).

Atualmente, mais de 300 compostos já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis. Os principais constituintes são os compostos fenólicos, sendo representados pelas agliconas de flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres, os quais são responsáveis pelos diversos efeitos terapêuticos (BANKOVA *et al.*, 2005, SOUSA *et al.*, 2007; LUSTOSA *et al.*, 2008).

Dentre as ações farmacológicas citadas na literatura, destacam-se as atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, imunomodulatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, anticâncer e hepatoprotetora (ORSI *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2002, SFORCIN *et al.* 2002). Diversos estudos relataram a atividade anti-inflamatória da própolis utilizando diferentes modelos experimentais (MIYATAKA *et al.*, 1997, HU *et al.*, 2005 e PAULINO *et al.*, 2006). Orsatti *et al.* (2010) demonstraram que a administração de um extrato hidroalcolico de própolis (200 mg / kg) por 3 dias em ratos inibiu a produção de IFN- $\gamma$  em culturas de esplenócitos. Em outros estudos, camundongos C57BL / 6 tratados com extrato hidroalcolico de própolis verde brasileira (200 mg / kg) durante 14 dias mostraram uma inibição da produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2 por células do baço, o que sugere uma atividade anti-inflamatória (MISSIMA *et al.*, 2009; MISSIMA *et al.*, 2010). Moura *et al.* (2011) ao utilizar um modelo de esponja murino para avaliar o efeito do extrato aquoso de própolis verde no processo de angiogênese inflamatória, observou um efeito antiangiogênico e antifibrótico do EAPV. Além disso, observou uma seletividade da ação da própolis em macrófagos uma vez que o EAPV foi capaz de inibir significativamente a atividade de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) 14 dias após a implantação.

Além disso, alguns estudos têm demonstrado que o extrato hidroalcolico de própolis apresenta propriedades antiparasitárias (STARZYK *et al.*, 1997; FREITAS *et al.*, 2006). Pesquisas feitas por De Castro (2001) em modelo *in vitro* evidenciaram uma ação antiparasitária do extrato etanólico de própolis contra o *T. cruzi*. Além disso, ação contra



outros parasitos como *Giardia duodenalis* (extrato hidroalcolico) (FREITAS *et al.*, 2006), *Trichomonas vaginalis* (extrato hidroalcolico) (STARZYK *et al.*, 1997) e *Leishmania* (MACHADO *et al.*, 2007) já foram relatadas. O estudo da própolis na leishmaniose é recente. Os primeiro estudos foram feitos por Ayres *et al.* (2007) que demonstraram que amostras de extrato etanólico de dois tipos de própolis brasileira reduziram a infecção *in vitro* de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* sem apresentar efeito tóxico nas culturas celulares. Machado *et al.* (2007) demonstraram que o extrato hidroalcolico de própolis foi capaz de matar diferentes espécies de *Leishmania*.

Associações de fármacos têm sido testadas para o tratamento da LV, na busca de uma terapia combinada capaz de aumentar a tolerabilidade e compatibilidade, aumentar a resposta imunológica, reduzir o período de tratamento, assegurando assim um melhor efeito terapêutico e toxicidade reduzida (JHA, 2006). Neste sentido, uma vez que os lipossomas são fagocitados por células do SFM, principalmente no fígado, baço e medula óssea, o uso de uma formulação lipossomal permite uma ação mais direta do fármaco sobre os parasitas, que se concentram principalmente nesses órgãos, além de diminuir os efeitos tóxicos do Sb(V). Além disso, considerando-se que a própolis apresenta diversos efeitos terapêuticos, dentre eles anti-inflamatório, hepatoprotetor, antioxidante, cicatrizante e leishmanicida, o que pode auxiliar no tratamento da LV bem como favorecer a recuperação tecidual dos órgãos, este trabalho buscou avaliar o efeito do tratamento oral com EAPV e sua associação com o tratamento parenteral com antimoniato de meglumina livre ou lipossomal sobre a carga parasitária e as lesões detectadas nos órgãos alvo.

### 3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade leishmanicida do EAPV e de sua associação com antimoniato de meglumina livre ou lipossomal na carga parasitária e nas lesões no fígado e baço de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*.

#### 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do EAPV e de sua associação com antimoniato de meglumina livre sobre as células J774-A1;
- Avaliar a atividade leishmanicida do EAPV no fígado e baço de camundongos infectados com *L. infantum*;
- Avaliar o efeito da associação do EAPV com antimoniato de meglumina lipossomal na carga parasitária do fígado e baço de camundongos infectados com *L. infantum*;
- Avaliar a ativação de macrófagos do baço e fígado determinada pela atividade da enzima N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) após diferentes tratamentos;
- Analisar o perfil fenotípico de células do baço após administração das formulações propostas nos animais infectados com *L. infantum*;
- Avaliar o efeito das formulações propostas nas funções renal, hepática e cardíaca;
- Identificar as possíveis alterações histológicas nos tecidos hepático e esplênico induzidas pela administração das formulações propostas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. ANIMAIS**

Neste trabalho, foram utilizados aproximadamente 84 camundongos machos da linhagem BALB/c (n = 4 animais / grupo) com idade entre 6 a 8 semanas, obtidos no Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico com ração padrão e água *ad libitum*. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Nº do protocolo: 2011/39) da Universidade Federal de Ouro Preto.

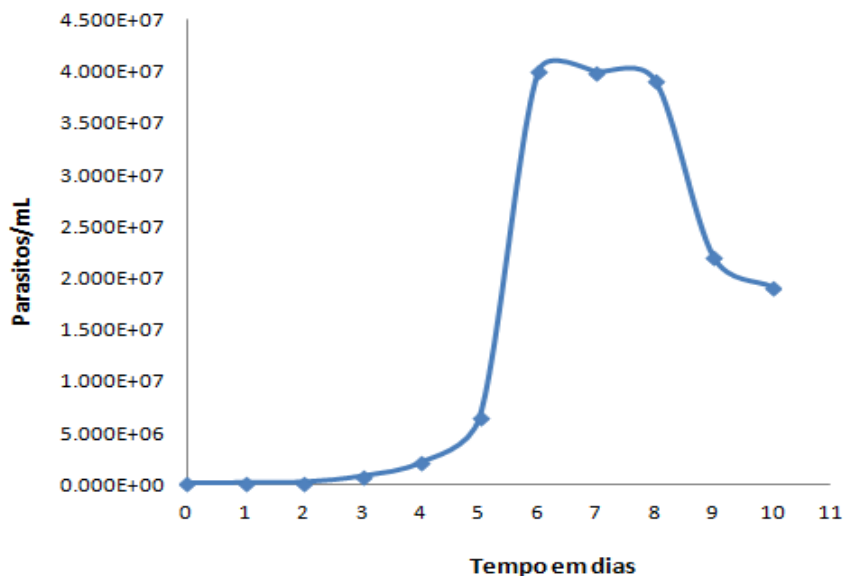
### **4.2. CEPA DE *LEISHMANIA INFANTUM***

Para a realização desse trabalho, utilizou-se uma cepa selvagem isolada de cão sintomático, caracterizada por PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) como *L.infantum* e denominada de C43. Esta cepa foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis do Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) - Cipharma - Universidade Federal de Ouro Preto.

### **4.3. CULTURA DE *LEISHMANIA* E CURVA DE CRESCIMENTO.**

Foram utilizadas para a infecção experimental formas promastigotas de *L. infantum* (cepa C43). Os parasitos foram cultivados em estufa BOD a 25°C em *Grace's Insect Medium* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de SFB (LGC, Cotia, SP, Brasil) (previamente inativado a 56°C/30 min), 1 mM L-glutamina (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA), 100 unidades/mL de penicilina G potássica (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA), pH = 6,5 (Grace's 10% SFB). Para a obtenção da curva de crescimento da cepa C43, iniciou-se nova cultura com  $1 \times 10^5$  parasitos/ml, mantidas as mesmas condições anteriores, e esta foi quantificada diariamente, em câmara de Neubauer após diluição em formalina 4% pelo período de 10 dias. A figura 4 mostra sucessivas contagens de uma cultura de parasitos que foi iniciada com  $1 \times 10^5$  parasitos/mL. É possível observar que o início da fase estacionária ocorreu no sexto dia de cultivo.

Figura 4- Curva de crescimento *in vitro* dos parasitos de *L. infantum* - cepa C43.



#### 4.4. CULTURA DE CÉLULAS

Macrófagos murinos J774-A1 (catalog nº. TIB-67) foram mantidos em garrafas plásticas de cultura (TPP, Suíça) em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Brasil) suplementado com 100 U/ mL de penicilina G (Sigma-Aldrich, Brasil), 1mM de L-glutamina (GIBCO BRL), 1mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, Brasil), 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich, Brasil) e 10% de soro fetal bovino inativado (SFB; LGC Biotecnologia, Brasil) – (RPMI 10% de SFB). As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. As células foram removidas das garrafas utilizando *cell scraper* e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer após diluição em azul de tripan.

#### 4.5. OBTENÇÃO DA PRÓPOLIS

A própolis, cedida pela Prof. Dr<sup>a</sup> Sandra Lima de Moura do Laboratório de Imunoparasitologia da UFOP, foi produzida em um apiário instalado no município de Jaguaraçu, região leste de Minas Gerais. No apiário, foram criados 3 enxames de *Apis mellifera* (africanizada). A própolis produzida pelos 3 enxames foi coletada mensalmente no período de setembro de 2005 a setembro de 2006. Após a coleta, a própolis bruta foi triturada, homogeneizada e acondicionada em temperatura de -18° C.

#### **4.6. PREPARO DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS**

Para o preparo do extrato aquoso de própolis, foram trituradas 200 g da amostra de própolis em 500 mL de água destilada. A solução formada foi mantida por um período de aproximadamente 60 minutos a uma temperatura de 70°C sobre agitação até a completa incorporação da própolis. O material foi filtrado em papel Whatman #1 para obtenção da primeira fração do extrato e resíduo. O resíduo recebeu o mesmo tratamento obtendo assim a segunda fração do extrato. As duas frações do extrato foram misturadas e posteriormente liofilizadas. A caracterização da amostra de própolis foi feita por Moura, (2009). As características descritas estão listadas no ANEXO 1.

#### **4.7. OBTENÇÃO DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA (AM)**

O antimoniato de meglumina liofilizado foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Frédéric Frézard do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais, onde foram realizados os processos de síntese do medicamento, como descrito por Demicheli *et al.* (2003). Neste procedimento, o AM foi sintetizado a partir de quantidades equimolares de N-metil-D-glucamina e de oxihidrato de antimônio pentavalente. O produto resultante continha aproximadamente 30% de antimônio por peso, determinado por espectroscopia de emissão de plasma (ICP-OES) com o auxílio de um espectrômetro de emissão de plasma PerKin-Elmer Optima 3000.

O AM liofilizado foi reidratado em água deionizada de forma a se obter uma solução com concentração de 300 mg de AM/mL (equivalente a 85 g/L de Sb). Em seguida, a solução foi aquecida a 40°C sobre pressão reduzida, com auxílio de um rotavapor, para remoção dos solventes na solução. O volume obtido foi reajustado para o volume inicial e a solução foi filtrada em membrana 0,22 µm.

#### **4.8. PREPARO DOS LIPOSSOMAS**

Os lipossomas, na forma liofilizada, foram fornecidos pelo Prof. Dr. Frédéric Frézard do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais. A preparação do liofilizado foi feita através do método descrito por Schettini *et al.* (2006) no qual pequenas vesículas unilamelares (SUVs) foram obtidas por ultrasonificação de uma suspensão de vesículas multilamelares em água deionizada, constituída de diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), colesterol (CHOL), dicetilfosfato (DCP) (razão molar de

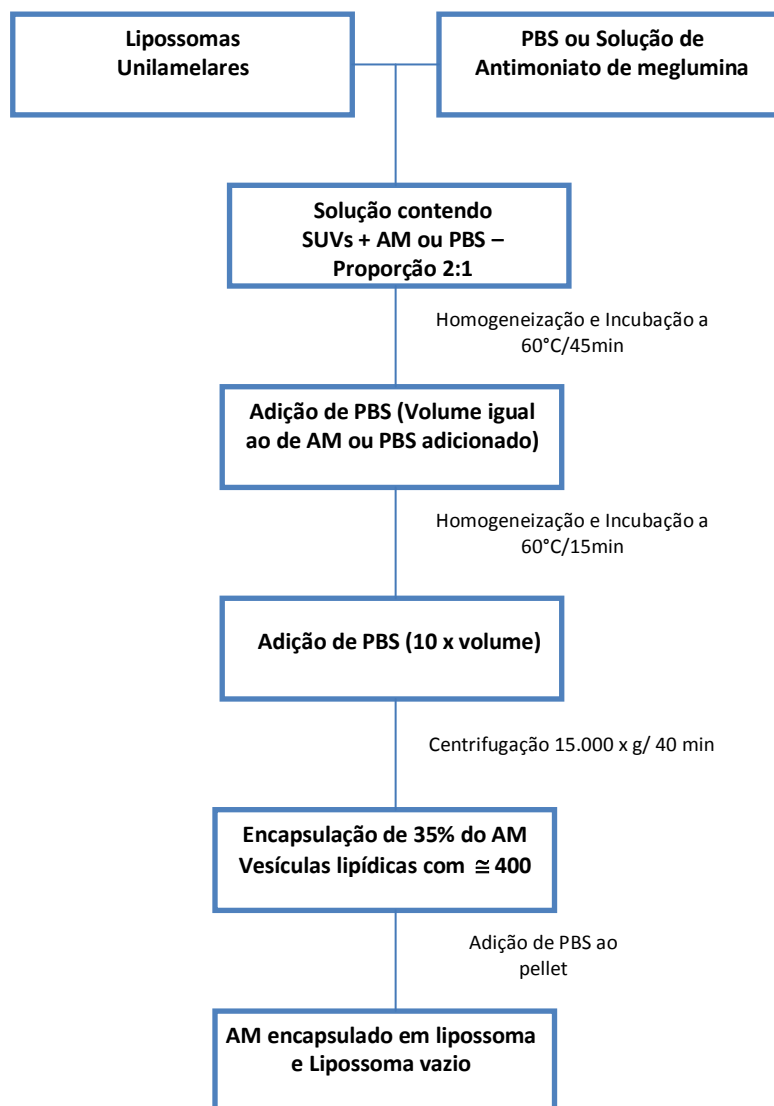
5:4:1) a uma concentração final de lipídeos de 55 g/l. A suspensão foi filtrada em membrana estéril 0,22 µm, e posteriormente foi misturada a uma solução de sacarose a uma razão de massa açúcar/lipídeo de 3:1 e a uma concentração final de açúcar de 0,3 M. A mistura resultante foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e em seguida liofilizada (Labconco freeze-dryer, 4.5 l).

#### **4.9. ENCAPSULAÇÃO DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA**

O processo de reidratação dos lipossomas liofilizados foi realizado segundo Schettini *et al.* (2006). A solução de antimoniato de meglumina (contendo 85 g de Sb/L) foi adicionada a um tubo contendo os lipossomas liofilizados, na proporção de 2:1 (Lipossoma: AM), para se obter o antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas. A mesma proporção foi utilizada para solução tampão salina fosfatada (PBS, pH 7,2), sendo adicionada a outro tubo contendo o liofilizado, obtendo-se assim o controle do tratamento, os lipossomas vazios. A mistura foi homogeneizada com auxílio de um vortex e incubada a 60°C em banho maria por 45 minutos. Após o tempo decorrido, o mesmo volume de PBS foi adicionado e a mistura foi vortexada e incubada a 60°C em banho maria por mais 15 minutos.

As amostras foram centrifugadas a 15.000 x g durante 40 minutos, utilizando uma ultra-centrífuga refrigerada (Beckman L7-65-rotor 55,2T) para que os lipossomas contendo a droga fossem separados da droga não encapsulada. Neste processo, consegue-se obter aproximadamente 35% de encapsulação do AM. O pellet foi então ressuspensionado em PBS, de forma a se obter uma concentração final de 14g de Sb / L. Dessa solução, foi administrado aproximadamente 30mg de Sb / Kg do peso do animal. Essa concentração foi baseada em estudos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa (MARCON, 2011). Ambos os tratamentos com AM encapsulado em lipossomas e lipossoma vazio foram administrados em um volume de 200 µL/animal.

Figura 5- Processo de encapsulação do antimoniato de meglumina.



#### 4.10. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE E ANTIMONIATO DE MEGLUMINA LIVRE.

Para avaliar o efeito do EAPV, antimoniato de meglumina livre e associação do EAPV com o antimoniato de meglumina livre sobre a viabilidade de células J774-A1, utilizou-se a técnica do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) (MOSMANN *et al.*, 1983; SIEUWERTS *et al.*, 1995). O ensaio baseia-se na capacidade que as células viáveis possuem de reduzir o anel tetrazólio presente no sal MTT, de coloração amarela, pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria, formando cristais de formazan, insolúveis de coloração azul (MOSMANN *et al.*, 1983).

A suspensão celular de células J774-1 na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL foi adicionada em microplacas estéreis de 96 poços (TPP, Suíça). As placas foram mantidas por duas horas em estufa umidificada a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  para adesão das células aos poços. Após este período, todos os poços foram lavados com 200  $\mu\text{L}$  de PBS estéril para retirar as células que não aderiram e em seguida foram adicionados 75  $\mu\text{L}$  de meio RPMI, 10% de SFB em todos os poços. A seguir, foram adicionadas aos poços concentrações crescentes das formulações testadas (EAPV, antimoniato de meglumina e EAPV associado ao antimoniato de meglumina), diluídas em meio RPMI, 10% de SFB, obtendo-se um volume final de 150  $\mu\text{L}$ . As concentrações avaliadas para todas as formulações foram de 3,9  $\mu\text{g/mL}$  a 1000  $\mu\text{g/mL}$ , onde a concentração no primeiro poço era de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , a do segundo poço de 500  $\mu\text{g/mL}$  a assim até a concentração de 3,9  $\mu\text{g/mL}$ . As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 h em estufa umidificada a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ . Como controle, as células foram incubadas na presença de meio de cultura, correspondendo a 100% de viabilidade.

Para eliminar a interferência ocasionada pela presença das formulações no momento da leitura das placas, após 24, 48 e 72 horas de incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado com auxílio de pipeta automática. Todos os poços foram então lavados duas vezes com 200  $\mu\text{L}$  de PBS estéril para remoção das formulações do meio. Em seguida foram adicionados a cada poço 150  $\mu\text{L}$  de meio de cultura e 20  $\mu\text{L}$  de solução de MTT (SIGMA) a 2,5  $\text{mg/mL}$  em PBS. As placas foram incubadas por mais 4 horas em estufa umidificada a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ . Os cristais azuis de formazan, resultado da redução do MTT pelas células viáveis, foram dissolvidos pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de SDS a 10% em HCl 10mM, seguido por um período de incubação de 16 horas, nas mesmas condições anteriores. A leitura da absorbância foi feita em leitor de microplaca (*Molecular Devices*) utilizando comprimento de onda de 570nm.

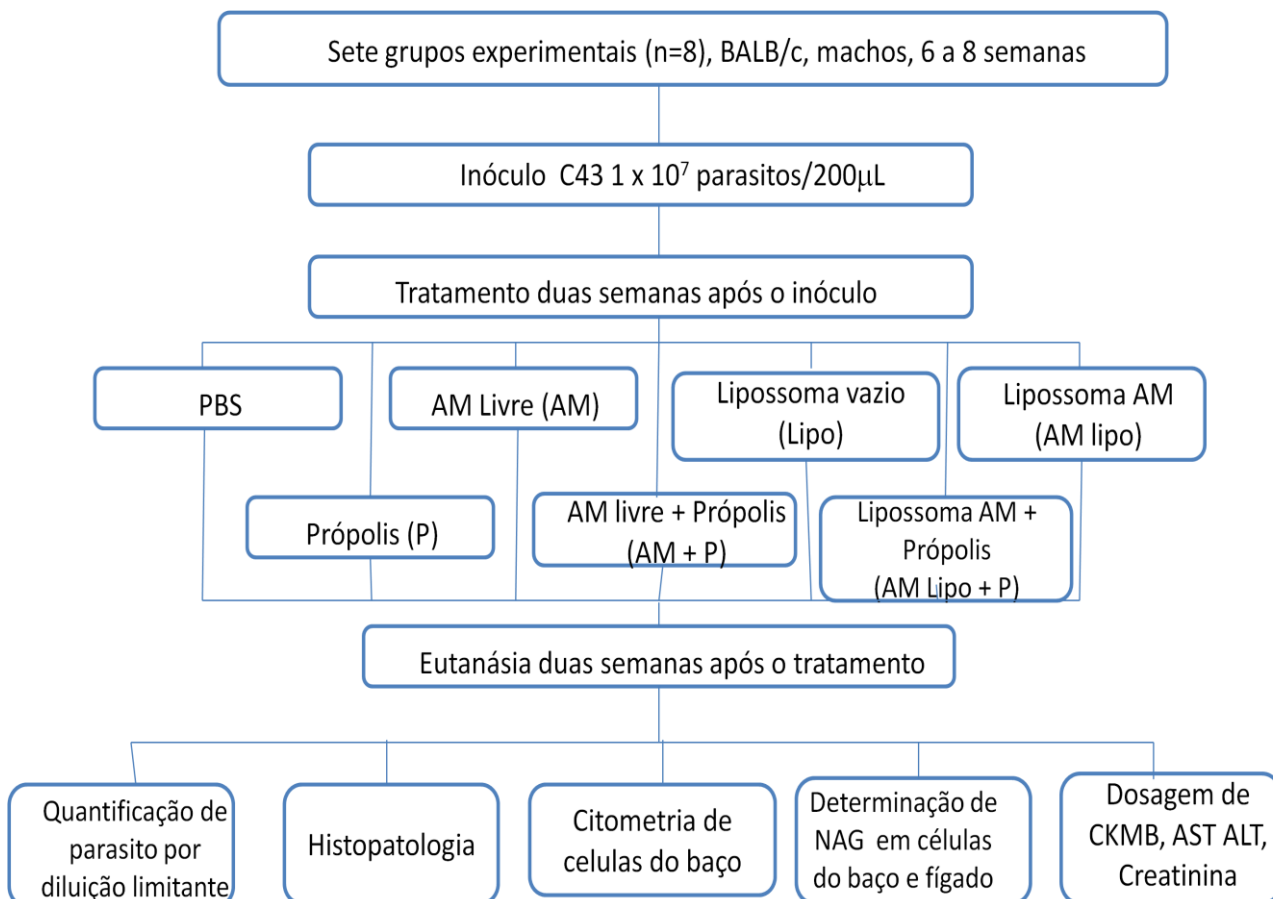
#### **4.11. INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *LEISHMANIA INFANTUM*.**

Para a infecção experimental, a cultura foi previamente repicada iniciando-se com  $1 \times 10^5$  parasitos/mL. No sexto dia de cultura, quando o parasito encontrava-se em início de fase estacionária, e pode-se obter um maior número de formas metacíclicas (infectantes), foi realizado o preparo do parasito para a inoculação experimental. A cultura foi centrifugada a  $1540 \times g$ , a  $4^\circ\text{C}$  por 10 minutos e a seguir lavada três vezes com solução salina tamponada (PBS estéril, pH=7,2). O pellet final foi ressuscitado em PBS estéril. A quantificação de



parasitos na amostra foi feita em câmara de Neubauer. Foram inoculados  $1 \times 10^7$  parasitos nas formas promastigotas em 200  $\mu\text{L}$ /dose, por via endovenosa na veia da cauda dos animais.

**Figura 6- Delineamento experimental**



#### 4.12. QUANTIFICAÇÃO DE PARASITOS

A manutenção dos animais deu-se no Setor de Experimentação em Isogênicos do CCA da UFOP, alojados 4 a 4 em gaiolas, mantidos em temperatura entre 21 e 25°C em ciclo de claro e escuro, com água e ração *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico (cloridrato de cetamina 10% -Syntec- a 24,0 mg/Kg e cloridrato de xilazina 2,3% - Sespo Indústria e Comércio/LTDA- a 12,0 mg/Kg) quatro semanas após a realização do inóculo e a carga parasitária no fígado e baço foi avaliada pelo método de diluição limitante (TITUS *et al.*, 1985) com modificações (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005). Após a eutanásia, os animais foram submergidos em álcool etílico 70% (V/V) por 5 min. Sobre condições assépticas, os animais, postos em decúbito dorsal, tiveram sua cavidade abdominal

aberta com auxílio de tesoura cirúrgica. Um fragmento do fígado e o baço foram coletados de cada animal. Os fragmentos do fígado e os baços assim obtidos tiveram suas massas determinadas e permaneceram em banho de gelo imersos em Meio de Lavagem constituído por DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 1% de SFB, L-glutamina 2 mM e penicilina G 100 U/mL, pH 7,2. A porção restante do fígado foi retirada para determinação do peso total do órgão. Os fragmentos de fígado e baços foram então macerados, individualmente, com o auxílio de um macerador de órgãos (Pyrex<sup>®</sup> 2 ml *ten broeck homogenizer with pour spout*) e o sobrenadante de maceração coletado em tubo cônico de 15 mL. O volume total de maceração do fragmento de fígado e um quinto do volume obtido pela maceração do baço foram submetidos à centrifugação 42 x g/ 1 min/ 4°C. Os materiais resultantes do processamento de baços e fragmentos de fígado foram centrifugados (1540 x g/ 10 min 4°C) e o precipitado assim formado foi ressuspensão em 500µl de Grace's 10% de SFB. Plaqueou-se o material assim obtido, em duplicata, em placas de 96 poços de fundo chato, estéreis, seguindo diluições sucessivas 1:5 (v:v) em meio Grace's 10% de SFB. A quantificação dos parasitos foi determinada em 7 e 14 dias, observando-se o crescimento dos parasitos ao longo da diluição (1:5 – v:v) através do microscópio óptico invertido. Considerou-se como 3 parasitos/mg de tecido, a quantificação no primeiro poço da diluição.

#### **4.13. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA LIVRE OU EM FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL CONVENCIONAL.**

Para avaliar a atividade leishmanicida do extrato aquoso de própolis verde associado ou não ao antimoniato de meglumina livre ou em formulação lipossomal, utilizou-se camundongos BALB/c, machos com idade entre 6 e 8 semanas, divididos em 7 grupos experimentais (n=8). Os animais foram inoculados com formas promastigotas de *L. infantum* conforme descrito no item 4.11. Duas semanas após o inóculo, tratou-se os animais com: (1) PBS; (2) antimônio pentavalente (SbV) – 30 mg/kg por via intraperitoneal ; (3) lipossomas vazios por via intraperitoneal; (4) lipossomas de Sb (V) – 30 mg/kg por via intraperitoneal; (5) extrato aquoso de própolis (EAPV) – 500 mg/kg por via oral (gavagem); (6) associação do EAPV – 500 mg/kg ao Sb (V) – 30 mg/kg e (7) associação da EAPV – 500 mg/kg ao lipossomas de Sb(V) – 30 mg/kg (Tabela 1). A concentração de 500 mg/Kg utilizada no tratamento com EAPV foi baseada em estudo feito por Moura *at al.* (2011). A eutanásia dos

animais foi feita por overdose de anestésico. A quantificação dos parasitos seguiu os procedimentos adotados no item 4.12.

**Tabela 1- Esquema dos diferentes tratamentos realizados.**

<b>Medicamento</b>	<b>Concentração</b>	<b>Via</b>	<b>Dose</b>
<b>Sb(V)</b>	30mg/Kg	Intraperitoneal	Dose única
<b>EAPV</b>	500 mg/Kg	Oral	1 vez ao dia durante 14 dias
<b>Sb(V) lipossomal</b>	30mg/Kg	Intraperitoneal	Dose única
<b>Lipossoma vazio</b>	-	Intraperitoneal	Dose única
<b>Sb(V) associado ao EAPV</b>	30mg/Kg para Sb(V)/ 500mg/Kg para o EAPV.	Intraperitoneal para Sb(V)/ oral para o EAPV.	Dose única para Sb(V) / 1 vez ao dia durante 14 dias para o EAPV.
<b>Sb(V) lipossomal associado ao EAPV.</b>	30mg/Kg para Lipossoma Sb(V)/ 500mg/Kg para o EAPV.	Intraperitoneal para Sb(V) lipossomal / oral para o EAPV.	Dose única para Sb(V) lipossomal / 1 vez ao dia durante 14 dias para o EAPV.

#### 4.14. AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE CÉLULAS DO BAÇO, POR CITOMETRIA DE FLUXO, APÓS ADMINISTRAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PROPOSTAS EM ANIMAIS INFECTADOS POR *L. INFANTUM*.

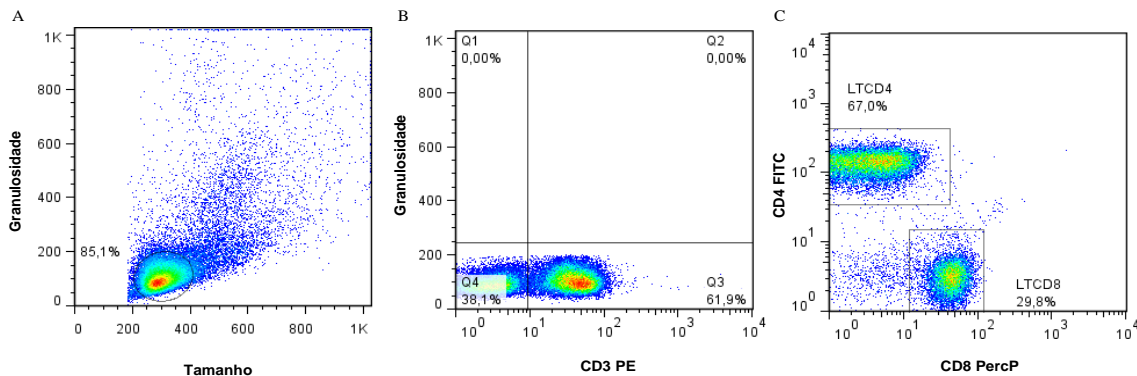
A citometria de fluxo foi utilizada para quantificar as subpopulações de linfócitos T-CD4<sup>+</sup> e T-CD8<sup>+</sup>, linfócitos B e macrófagos presentes no baço, bem como o perfil de ativação dos macrófagos pela expressão das moléculas de ativação MHC-II e CD86. O procedimento foi realizado utilizando-se os quatro quintos do volume de células do baço resultantes da maceração descrita no item 4.12. Os anticorpos padronizados foram utilizados para a marcação de 1 x 10<sup>6</sup> células, conforme descrito abaixo e na tabela 2.

Tabela 2- Relação dos anticorpos utilizados para análise do fenótipo de células do baço de camundongos BALB/c .

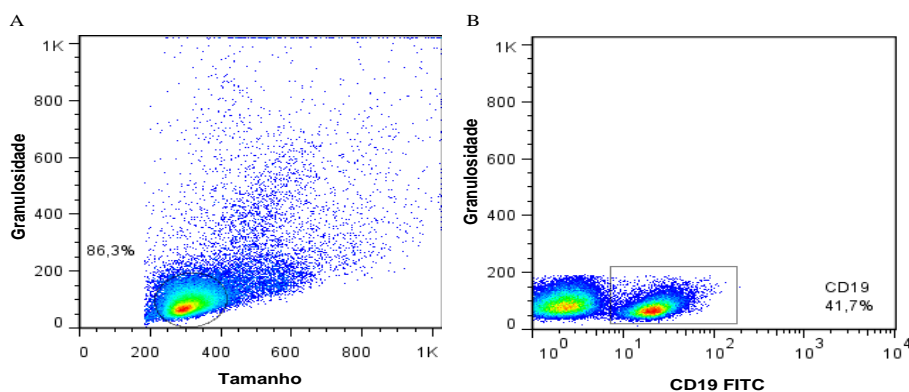
Anticorpo Anti	Diluição padronizada	Fluorocromo	Clone	Catálogo	Fabricante
CD3e	1:800	PE	145-2C11	100308	Bio Legend
CD4(L3T4)	1:300	FITC	RM4-5	11-0042-82	Bioscience
CD8 a (Ly-2)	1:3000	PerCP-Cy5.5	53-6.7	45-0081-82	Bioscience
CD19	1:100	FITC		RM-7701	Invitrogen
CD86 (B7-2)	1:400	PE	GL1	12-0862-82	Bioscience
F4/80	1:200	FITC	BM8	123107	Bio Legend
MHC II (I-A/I-E)	1:6000	PE-Cy 5	M5/114.15.2	15-5321-82	Bioscience

Para cada animal, preparou-se três tubos aos quais se adicionou 1 x 10<sup>6</sup> células do baço e 1,5µL de anticorpo anti receptor da porção Fc de IgG (produzido em nosso laboratório) a cada tubo no intuito de bloquear a ligação não específica dos anticorpos aos receptores CD16 e CD32. Após 10 minutos de incubação, 20 µL de cada um dos anticorpos contra os seguintes marcadores celulares CD3/ CD4/CD8 (tubo 1), CD19 (tubo 2) e (3) F4/80/ MHC II/ CD86 (tubo 3) foram adicionados e os tubos foram incubados por 30 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Posteriormente, procedeu-se a lavagem em PBS e centrifugação 210 x g / 4°C / 10 minutos. O sobrenadante da centrifugação foi cuidadosamente descartado e as células resultantes fixadas por adição de 200µL de solução fixadora - MFF (paraformaldeído 10 g/l, cacodilato de sódio 1%, cloreto de sódio 6,67 g/l em pH 7,2). As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ e para a análise dos dados obtidos, utilizou-se o programa FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

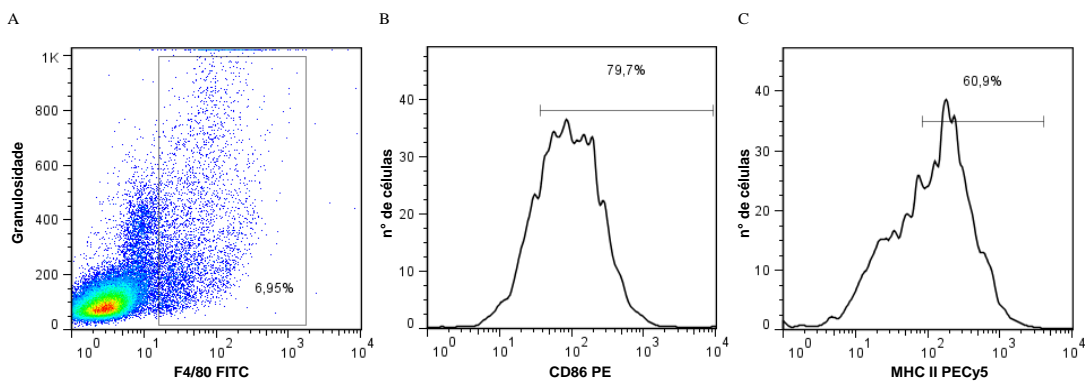
**Figura 7- Estratégia de análise das subpopulações de linfócitos T.** A - Gráfico “dot plot” do perfil de distribuição celular considerando tamanho (FSC) *versus* granulidade. B - Gráfico “dot plot” do perfil de distribuição celular considerando fluorescência 2 (CD3/PE) *versus* granulidade da população selecionada na janela do gráfico A. C - Gráfico “dot plot” do perfil de distribuição celular considerando a fluorescência 3 (CD8/PercP) *versus* fluorescência 1 (CD4/FITC) da população Q3 do gráfico B.



**Figura 8- Estratégia de análise de linfócitos B.** A - Gráfico “dot plot” do perfil de distribuição celular considerando tamanho (FSC) *versus* granulidade. B - Gráfico “dot plot” do perfil de distribuição celular considerando fluorescência 1 (CD19/FITC) *versus* granulidade da população selecionada na janela do gráfico A.



**Figura 9- Estratégia de análise da população de macrófagos.** A – Gráfico “dot plot” do perfil de distribuição celular considerando fluorescência 1 (F4/80/FITC) *versus* granulidade. B - Gráfico “histograma” da intensidade de fluorescência 2 (CD86/PE) da população selecionada na janela do gráfico A. C - Gráfico “histograma” da intensidade de fluorescência 3 (MHC II/PE Cy5) da população selecionada na janela do gráfico A.



#### **4.15. DOSAGEM DA ATIVIDADE DA N-ACETIL- $\beta$ -D-GLICOSAMINIDASE**

A N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) é uma enzima lisossomal produzida por macrófagos ativados. A dosagem do NAG é uma técnica utilizada para detectar acúmulo/ativação de macrófagos em uma variedade de tecidos humanos e animais. (LAMAITA *et al.*, 2012).

Após coleta dos órgãos (fígado e baço), um fragmento do fígado foi separado para a dosagem da NAG. Com relação ao baço, este foi macerado para a realização da quantificação de parasitos e citometria. Assim, parte do pellet obtido após processamento foi coletado para a dosagem da NAG. Tanto o fragmento do fígado, quanto o pellet do baço foram pesados. Em seguida, ao fragmento de fígado foram adicionados a 2,0 mL de tampão fosfato 80 mM e o mesmo foi processado com o auxílio de um macerador (Turraques). Em seguida, tanto o fígado quanto do baço, foram solubilizados em 2,0 mL de solução de NaCl a 0,9% p/v contendo 0,1% v/v de Triton X-100. Procedeu-se à centrifugação a 5000 x g durante 12 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para o ensaio enzimático.

Para o ensaio enzimático, foram adicionados 100  $\mu$ L do sobrenadante das amostras (diluído quando necessário) a uma placa de 96 poços de fundo chato. Às amostras foram adicionados 100  $\mu$ L do substrato (p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina) (Sigma) a 2,24 mM diluído em tampão citrato-fosfato pH 4,5 (200 mL de ácido cítrico a 0,1M; 310 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 0,1M). Sobrenadante e substrato foram incubados a 37°C durante 60 minutos. Para paralisar a reação foram adicionado 100  $\mu$ L de tampão glicina pH 10,6 (misturados volumes iguais de glicina a 0,8M; NaCl a 0,8M e NaOH a 0,8M) em cada poço. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de microplaca (Molecular Devices) a 405nm. Os resultados foram expressos como atividade de NAG em densidade óptica (OD)/mg tecido.

#### **4.16. ANÁLISES HISTOLÓGICAS**

Para as avaliações histopatológicas, fígado e baço foram coletados no momento da eutanásia e fixados em formol tamponado (10%), por no mínimo 48 horas. Esses órgãos foram submetidos ao processamento automatizado (LUPETEC<sup>®</sup> MODELO PT05). Após este procedimento, os órgãos foram incluídos em Paraplast<sup>®</sup> a 60°C e submetidos à microtomia em cortes de 4  $\mu$ m de espessura. A fim de se realizar a coloração dos cortes histológicos pela

hematoxilina & eosina (HE), as lâminas foram desparafinizadas em estufa à aproximadamente 60°C. Procedeu-se à coloração das lâminas pela imersão sequenciada das mesmas em: xilol, álcool etílico absoluto, álcool etílico 90°, álcool etílico 80°, álcool etílico 70°, água corrente, hematoxilina, água corrente, eosina, água corrente, álcool 70°, álcool 80°, álcool 90°, álcool absoluto e xilol. Ao fim da coloração as lâminas foram colocadas por 15 min em estufa à 58°C para secagem e fixação final. Os cortes corados, assim obtidos, foram fixados entre lâmina e lamínula para análise.

Baseado em testes de coloração anteriormente realizados, adotaram-se como período de imersão das lâminas (com cortes do fígado e baço) em cada um dos corantes hematoxilina/eosina os tempos de 1'10''/1'10'', 60/40 e 50''/50'' respectivamente.

As imagens digitais dos tecidos foram obtidas no Laboratório de Multiusuários NUPEB/UFOP com o auxílio do microscópio óptico de captura Leica® DM5000 através do software *Leica Application Suite* (versão 2.4.1) e a partir das imagens obtidas foi construída uma prancha representativa dos grupos avaliados.

#### **4.17. ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

Antes da eutanásia dos animais conforme descrito 4.12, retirou-se sangue por punção cardíaca. Após a retração do coágulo, o sangue foi processado em centrífuga para microtubo a 164 x g durante 15 min. Separou-se o soro e procedeu-se o congelamento a -80°C para posteriores análises bioquímicas.

Os reagentes utilizados foram gentilmente cedidos pela ***Bioclin – Quibasa***, através do programa “Bioclin nos Laboratórios Científicos”. Realizaram-se testes de função renal: creatinina; função hepática: aspartato cetoglutarato aminotransferase (ASP ou TGO) e alanina cetoglutarato aminotransferase (ALT ou TGP) e função cardíaca: aspartato cetoglutarato aminotransferase (AST ou TGO) e creatinoquinase isoenzima MB (CK-MB).

Os testes foram realizados em colaboração com o Professor Roney Luiz de Carvalho Nicolato, responsável técnico pelo Laboratório Piloto de Análises Clínicas – LAPAC/UFOP. As amostras foram processadas no analisador automático Metrolab 2300 – Wiener (Fully Automatic Random Access Clinical Analyzer) devidamente ajustado com os calibradores e controles específicos para os kits diagnósticos Bioclin-Quibasa (Controle Normal –

Biocontrol N K073 – Bioclin; Controle Patológico Biocontrol P K074 – Bioclin; Calibrador – Biocal K072 – Bioclin).

#### **4.18. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Realizou-se as análises estatísticas com o auxílio do programa GraphPad Prism 5. Todas as amostras foram inicialmente submetidas aos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostinho e Person e Shapiro-Wilk. As amostras que apresentaram distribuição normal foram analisadas por ANOVA *one way* seguidas por teste de Turke's. Quando as amostras não seguiram distribuição normal foram analisadas por ANOVA teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn's. Adotou-se como diferença estatística valores de P inferiores a 0,05.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

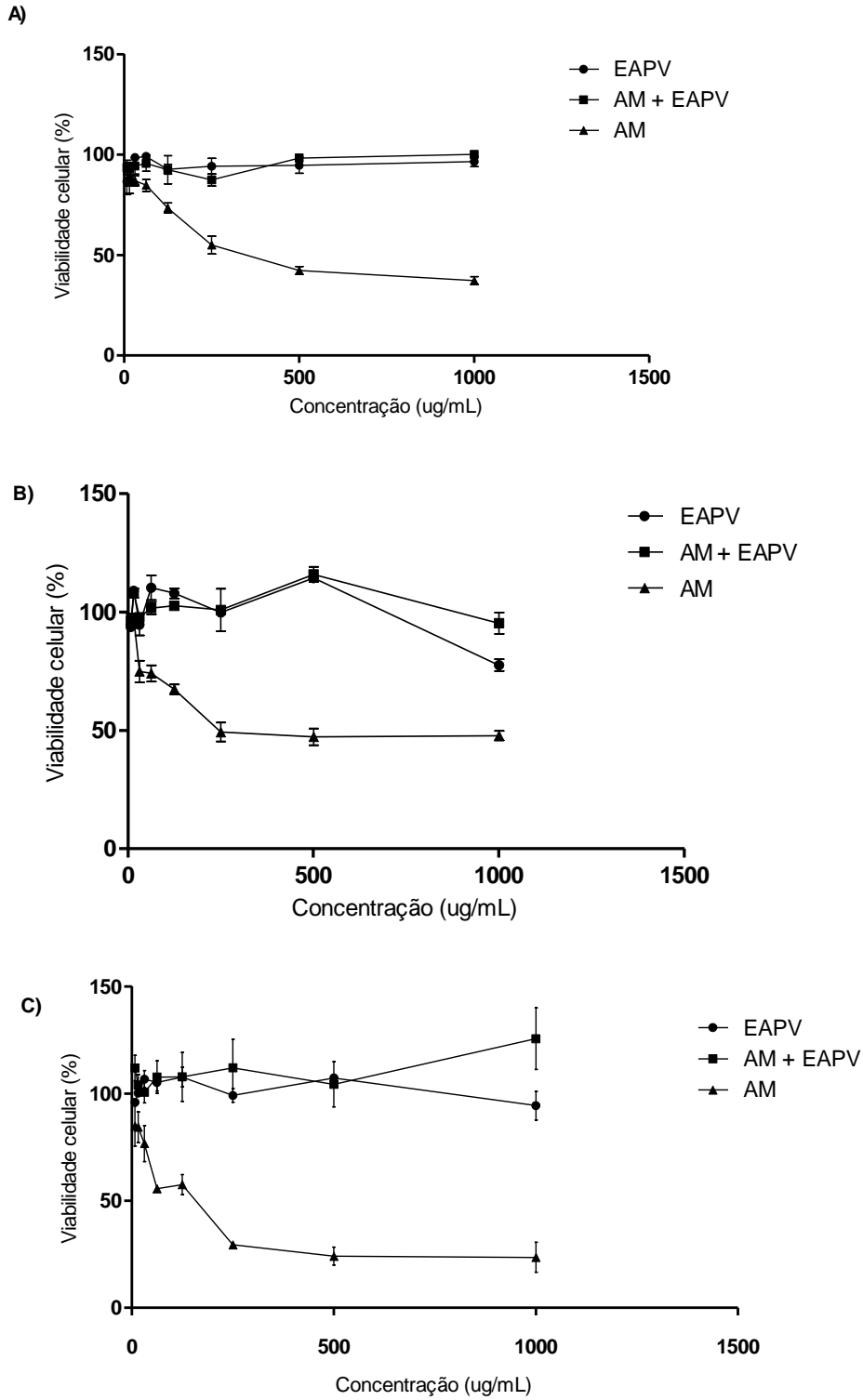
### 5.1. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS J774A-1 APÓS TRATAMENTO COM EAPV E SUA ASSOCIAÇÃO COM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA.

Com o objetivo de avaliar o efeito do extrato aquoso de própolis verde (EAPV) e de sua associação com o antimoniato de meglumina livre sobre a viabilidade de macrófagos J774-A1 foi realizado o ensaio de redução do MTT. Como demonstrado na figura 10, a adição de diferentes concentrações do EAPV aos macrófagos não ocasionou redução da viabilidade celular, independente do tempo de incubação. Por outro lado, a incubação de macrófagos J774-A1 com diferentes concentrações de antimoniato de meglumina livre (3,9 µg/mL a 1000 µg/mL) provocou a redução da viabilidade celular, sendo esta redução superior a 30% em concentrações de AM igual ou superior a 250 µg/mL com 24 horas, 125 µg/mL com 48 horas e 62,5 µg/mL após 72 horas de incubação.

De forma interessante, a incubação das células com diferentes concentrações de EAPV associada ao AM (composto capaz de promover redução de 30% da viabilidade celular) foi capaz de manter a viabilidade de macrófagos J774-A1 independentemente do tempo de incubação, conforme demonstrado na figura 10.

Trabalho desenvolvido por Ayres *et al.* (2007) demonstraram que o tratamento de macrófagos peritoniais com diferentes concentrações (25, 50 e 100 µg/mL) de um extrato etanólico de própolis vermelha não provocou toxicidade celular. Pontim e colaboradores (2008), ao realizarem um ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células VERO, não observaram toxicidade do extrato hidroalcoólico de própolis verde nas concentrações máximas testadas (até 750 µg/mL). Em outro estudo, amostras de extrato etanólico de própolis da Turquia foram testadas quanto ao grau de citotoxicidade em uma linhagem de célula humana. Concentrações de até 1000 µg/mL foram utilizadas e não se observou diminuição da viabilidade celular (DURAN *et al.*, 2011). Assim, dados da literatura mostram que tanto o extrato alcoólico quanto o hidroalcoólico de diferentes própolis (verde, vermelha e da Turquia) não tiveram efeito tóxico sobre diferentes populações celulares.

**Figura 10- Efeito de diferentes concentrações do extrato aquoso de própolis, antimoníato de meglumina livre e própolis associado ao antimoníato de meglumina sobre a viabilidade de células J774-A1.** A viabilidade celular foi determinada pelo teste de MTT após: (A) 24 horas de incubação; (B) 48 horas de incubação e (C) 72 horas de incubação das células J774-A1 com diferentes concentrações dos compostos testados. Resultados obtidos a partir de três experimentos independentes e apresentados como média  $\pm$  DP.



Segundo a ISO (2009), são consideradas citotóxicas concentrações de um composto que matam mais de 30% das células. Estudos prévios relatam o elevado grau de toxicidade dos antimoniais pentavalentes (RATH *et al.*, 2003; DEMICHELI *et al.*, 2005; FRÉZARD *et al.*, 2009; FRÉZARD *et al.*, 2010). Almeida (2012), ao determinar a porcentagem média de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c viáveis, após incubação com diferentes concentrações de Glucantime<sup>®</sup>, após 24 horas de tratamento, observou que concentrações iguais ou superiores a 110,8 mM eram consideradas tóxicas para as células. Como a associação de EAPV e AM não diminuiu a viabilidade de macrófagos J774-A1 em todas as concentrações utilizadas, esse dado sugere que o extrato aquoso de própolis verde foi capaz de reduzir *in vitro* o efeito tóxico do antimônio sobre as células J774-A1 ou aumentar a viabilidade das mesmas.

## **5.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM O ANTIMONIATO DE MEGLUMINA LIVRE OU EM FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL.**

Para um melhor entendimento dos resultados, os mesmos serão apresentados e discutidos em duas etapas:

**Etapa 1** - Avaliação da atividade leishmanicida do extrato aquoso de própolis verde.

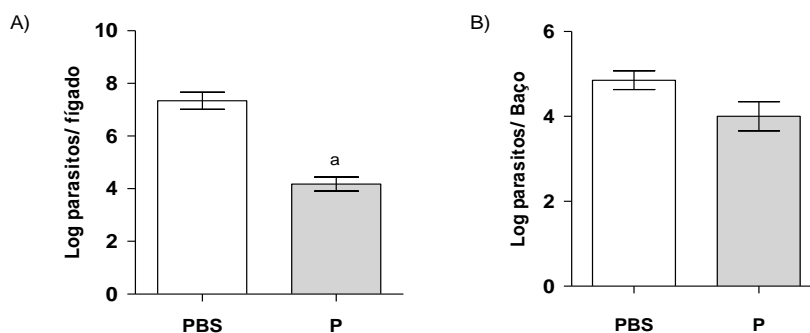
**Etapa 2** – Avaliação da atividade leishmanicida do extrato aquoso de própolis verde associado ou não ao antimoníato de meglumina livre ou lipossomal.

### **5.2.1 ETAPA 1 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE.**

Os antimoniais pentavalentes são drogas de primeira escolha no tratamento da leishmaniose em muitos países. Entretanto, devido aos efeitos indesejados dessas drogas, tem sido proposto estudos para o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento da leishmaniose. Neste sentido, tem-se investigado o uso da própolis, visto que está relacionada a muitas atividades biológicas, como antibacteriana, antifúngica, antiulcerativa, antiviral, antiprotozoária, anti-inflamatória, hepatoprotetora, entre outras. Assim, neste trabalho foi avaliado o efeito do EAPV sobre a carga parasitária no fígado e baço de camundongos infectados com *L. infantum*. Como demonstrado na figura 11, o tratamento oral com dose diária de 500 mg/Kg do extrato aquoso de própolis (P) durante 14 dias foi capaz de reduzir

significativamente (44%) a carga parasitária no fígado dos animais tratados quando comparado ao grupo controle (PBS). No entanto, no baço não se observou diferença na carga parasitária.

**Figura 11- Carga parasitária do fígado e baço de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos.** A carga parasitária do fígado (A) e baço (B) de camundongos BALB/c inoculados com  $1 \times 10^7$  promastigotas de *L. infantum* foi determinada pela técnica de diluição limitante após quatro semanas de infecção e duas semanas de tratamento. (PBS) tampão fosfato, (P) própolis. Os resultados estão representados como média  $\pm$  DP. A letra a indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação a PBS.



Pontin *et al.* (2008) ao avaliar a atividade leishmanicida de um extrato hidroalcolóico de própolis verde brasileira em camundongos infectados com *L. braziliensis*, mostraram uma maior redução no tamanho da lesão quando comparado ao tratamento com Glucantime. O tratamento oral com o extrato de própolis foi realizado utilizando uma dose de 1,5 mg/Kg/dia durante 3 meses. O Glucantime livre, utilizado com controle positivo, foi administrado intraperitonealmente na dose de 20 mg/Kg/dia durante o mesmo período. Nesse estudo, foi avaliada ainda a atividade leishmanicida *in vitro* contra formas promastigotas de *L. braziliensis*, observando que o tratamento com o extrato de própolis provocou a lise de 79,3% dos parasitos. Outros pesquisadores também avaliaram a atividade leishmanicida *in vitro* de extrato de própolis, obtendo resultados semelhantes (AYRES *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2007; OZBILGE *et al.*, 2010). Nilforoushadeh e colaboradores, (2008), utilizando um extrato hidroalcolóico de própolis, durante seis semanas, duas vezes ao dia, topicamente, para tratamento *in vivo* de camundongos BALB/c infectados com *L. major*, observaram uma redução mais efetiva no tamanho da lesão quando comparado com o tratamento com Glucantime<sup>®</sup>. No baço não foi observada redução da carga parasitária o que sugere que o extrato aquoso de própolis verde sofreu o efeito de primeira passagem pelo fígado,

diminuindo significativamente a biodisponibilidade do mesmo. O efeito de primeira passagem ocorre quando a biodisponibilidade de um fármaco é reduzida significativamente devido a grande capacidade metabólica do fígado para o agente em questão (BRUNTON *et al.*, 2010). Possivelmente um aumento da concentração do EAPV ou administração do EAPV em menor intervalo de tempo (duas ou três vezes ao dia) poderia solucionar esse problema.

Os mecanismos pelos quais o extrato de própolis exerce seu efeito leishmanicida *in vivo* não estão esclarecidos. Trabalhos sugerem que a atividade leishmanicida da própolis pode estar relacionada com a ativação de macrófagos (TATEFUJI *et al.*, 1996; SOLBACH & LASKAY, 2000; HAN *et al.*, 2002). A presença de derivados do ácido cafeoilquínico presentes na própolis brasileira parece ser o responsável por aumentar a mobilidade e propagação dos macrófagos (TATEFUJI *et al.*, 1996 ). Solbach & Laskay (2000) relataram que os constituintes da própolis podem aumentar a ativação de macrófagos, levando à produção de citocinas e intermediários reativos de nitrogênio envolvidos na morte de parasitas intracelulares. Além disso, a própolis brasileira estimula a produção de óxido nítrico por macrófagos, e o tratamento com a própolis brasileira aumenta a sensibilidade dos macrófagos aos estímulos, tais como o interferon- $\gamma$ , o que pode ser importante para a resposta imunológica (ORSIN *et al.*, 2000 ). Nesse trabalho, nos testes *in vivo* foram utilizadas diferentes concentrações de própolis, observando que nos camundongos tratados houve aumento na produção de óxido nítrico (NO) de maneira dose dependente. A produção de NO e peróxido de hidrogênio foi estimulada nos macrófagos quando os animais foram tratados com as concentrações de 250, 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  de própolis e inibida nas concentrações de 3000 e 6000  $\mu\text{g/mL}$ . Assim, existe um equilíbrio entre a geração e a destruição de agentes oxidantes.

### **5.2.2 ETAPA 2 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE ASSOCIADO AO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA LIVRE OU ENCAPSULADO EM LIPOSSOMA.**

Os resultados abaixo se referem à avaliação da atividade leishmanicida do extrato aquoso de própolis verde associado ao antimoniato de meglumina livre ou lipossomal e foram obtidos no mesmo experimento do item 5.2.1. Desta forma, os resultados referentes à inter-relação dos grupos (1)PBS e (2)P seguem como discutidos anteriormente.

Associações de fármacos têm sido testadas para o tratamento da LV objetivando-se uma terapia combinada capaz de aumentar a tolerabilidade e compatibilidade, aumentar a resposta imunológica e reduzir o período de tratamento, assegurando assim um melhor efeito terapêutico e toxicidade reduzida (JHA, 2006). Neste sentido, avaliou-se a atividade leishmanicida do EAPV associado ou não ao antimonio de meglumina livre ou lipossomal. Como demonstrado na figura 12, houve uma redução significativa da carga parasitária em ambos os órgãos (fígado e baço) nos animais tratados com antimonio de meglumina lipossomal (AM Lipo). Obteve-se no fígado e baço, uma redução da carga parasitária em relação ao controle (PBS) de aproximadamente 41% com o tratamento AM lipo. A administração de antimonio de meglumina livre na mesma concentração utilizada na formulação lipossomal (30 mg/kg) ou de lipossomas vazios não teve efeito sobre a carga parasitária nos órgãos avaliados. Estudos feitos em nosso grupo de pesquisa utilizando essa mesma formulação lipossomal de antimonio de meglumina (30 mg Sb(V)/Kg) para tratamento de camundongos infectados com a cepa M2682 de *L. infantum* mostraram também uma redução da carga parasitária, com casos de negatização no fígado e baço de alguns camundongos. Ainda nesse estudo, não foram observadas diferenças estatísticas nos animais tratados com lipossoma vazio ou AM livre em relação aos animais infectados não tratados (MARCON, 2011). No presente estudo, embora tenha se observado uma redução significativa na carga parasitária no fígado e baço após administração da formulação lipossomal de antimonio de meglumina, em nenhum caso obteve-se negatização da carga parasitária. Uma possível explicação seria a utilização de uma cepa selvagem, isolada de cão sintomático, que poderia ser mais resistente que a cepa M2682 utilizada por Marcon (2011). Esta cepa foi isolada de adulto humano em 1975 na Bahia e tem sido mantida em laboratório desde então, o que pode ter resultado numa diminuição de sua infectividade e virulência. Estudo feito por Ribeiro *et al.* (2008), ao avaliar uma formulação lipossomal de Sb (V) em cães, obteve uma redução significativa da carga parasitária quando comparada aos grupos tratados com Sb(V) livre ou salina. Uma possível explicação para a melhor eficácia da formulação lipossomal de Sb(V) é a tendência natural dos lipossomas de serem fagocitados por células do SFM, principalmente no fígado, baço e medula óssea, que são os principais órgãos parasitados na LV (FREZARD *et al.*, 2010). Além disso, os lipossomas possuem uma propriedade farmacocinética de liberação controlada do fármaco permitindo, desta forma, uma maior concentração do antimônio Sb(V) nesses órgãos por um período de tempo prolongado (BLACK *et al.*, 1977; RAO *et al.*, 1983). Valladares *et al.* (2001) mostraram que a

concentração plasmática de Sb(V) medida após administração de antimoniato de meglumina livre diminuiu mais rapidamente do que após a administração da droga encapsulada em lipossoma, sendo a concentração plasmática em fase terminal para a formulação lipossomal muito mais elevada do que a obtida após a administração da droga livre. Em outro estudo, Schettini *et al.* (2006) ao avaliarem a cinética de liberação e a farmacocinética de uma formulação lipossomal de antimoniato de meglumina em cães com LV, observaram que mesmo utilizando uma concentração de antimônio 23 vezes menor na formulação lipossomal, os níveis da droga foram 2 vezes, 63 vezes e 68 vezes maiores na medula óssea, fígado e baço, respectivamente, quando comparado com o fármaco livre. Além disso, foi observado uma persistência do antimônio nesses órgãos por pelo menos 4 dias quando se utilizou a formulação lipossomal. Esses achados justificam a baixa eficácia do AM livre administrado em dose única, após duas semanas de tratamento, visto que, no presente estudo o AM livre não foi capaz de reduzir a carga parasitária de forma significativa no fígado e no baço quando comparado aos animais não tratados.

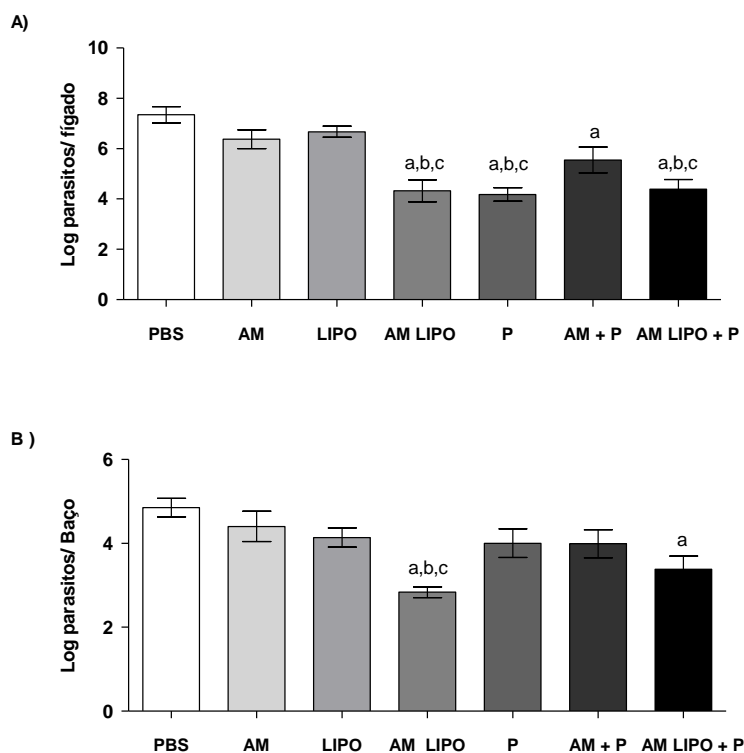
Com relação ao tratamento com lipossomas vazios, observou-se que os mesmos não interferiram na carga parasitária do fígado e baço dos camundongos infectados com *L. infantum*, corroborando com os dados de Ribeiro *et al.* (2008), os quais também não observaram alteração da carga parasitária no fígado e no baço de cães tratados com lipossomas vazios de mesma composição. Resultados semelhantes foram encontrados por Marcon (2011) que mostrou que utilização de lipossomas convencionais de carga neutra não teve efeito sobre a carga parasitária em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*.

Ao se avaliar a administração concomitante do EAPV e Sb(V) livre sobre a carga parasitária, observou-se uma redução de 24,4% no fígado, quando comparado com o controle (PBS), o que provavelmente se deve ao efeito do EAPV. Além disso, a administração concomitante de EAPV e Sb(V) lipossomal provocou redução da carga parasitária em nível semelhante (40%) ao observado com o tratamento com EAPV isolado (44%) ou da formulação de AM lipossomal (41%) no fígado, mostrando que, embora os dois tratamentos tenham provocado redução da carga parasitária, não houve um sinergismo pela associação (Figura 12).

Com relação ao baço, a administração do EAPV (500mg/Kg), via oral e sua associação com Sb(V) livre não foi capaz de reduzir significativamente a carga parasitária,

diferentemente do que foi observado no fígado, indicando mais uma vez que o EAPV pode ter sofrido o efeito de primeira passagem diminuindo, portanto, a sua biodisponibilidade.

**Figura 12- Carga parasitária do fígado e baço de camundongos infectados por *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos.** A carga parasitária do fígado (A) e baço (B) de camundongos BALB/c infectados com  $1 \times 10^7$  promastigotas de *L. infantum* foi determinada pela técnica de diluição limitante após quatro semanas de infecção e duas semanas de tratamento. (PBS) tampão fosfato, (AM) antimoniato de meglumina, (Lipo) lipossomas convencionais vazios, (AM Lipo) lipossomas convencionais de antimoniato de meglumina, (P) própolis, (AM+P) associação de própolis ao antimoniato de meglumina e (AM Lipo + P) associação da própolis aos lipossomas convencionais de antimoniato de meglumina. Carga parasitária nos diferentes órgãos dada por log parasitos/órgão. Os resultados estão representados como média  $\pm$  DP. As letras indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) em relação a: (a) PBS, (b) AM e (c) Lipo, (d) AM Lipo, (e) P, (f) AM+P e (g) AM Lipo+P.



Estudos anteriores também observaram uma atividade leishmanicida de forma órgão dependente com o tratamento com Sb(V). Nesses trabalhos, a administração de Sb(V) foi eficaz na redução da carga parasitária no fígado, mas não no baço (CARTER *et al.*, 1988; RIBEIRO *et al.*, 2008). Diferentes distribuições das drogas entre os órgãos e / ou níveis de ativação dos macrófagos infectados com *Leishmania* nos tecidos podem ser responsáveis por este efeito (RIBEIRO *et al.*, 2008). Além disso, a atividade leishmanicida do Sb(V) lipossomal quando administrado em associação com a própolis diminuiu em 30% a carga parasitária no baço quando comparado ao grupo controle. No entanto, essa redução foi inferior ao tratamento com o Sb(V) lipossomal sozinho (41%).

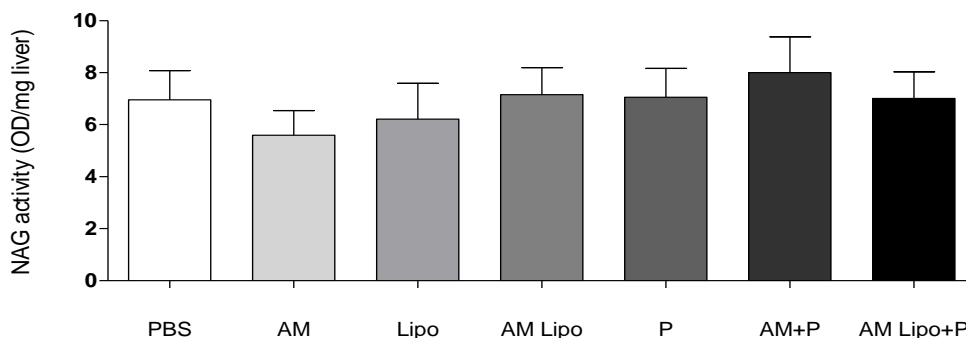


### **5.3. QUANTIFICAÇÃO DO ACÚMULO/ATIVÇÃO DE MACRÓFAGOS TECIDUAIS DETERMINADO PELA ATIVIDADE DA ENZIMA N-ACETIL- $\beta$ -D-GLICOSAMINIDASE (NAG) EM ANIMAIS INFECTADOS POR *LEISHMANIA INFANTUM* APÓS ADMINISTRAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PROPOSTAS.**

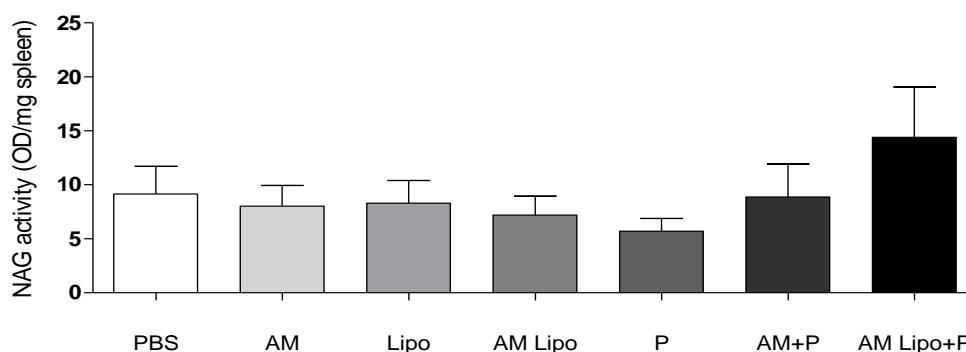
Como relatado acima, um possível mecanismo leishmanicida da própolis é através da ativação de macrófagos (TATEFUJI *et al.*, 1996; SOLBACH & LASKAY, 2000; HAN *et al.*, 2002). Além disso, a própolis pode afetar a migração de células para os tecidos infectados, como demonstrado por Moura *et al.* (2011). Desta forma, estes dois fatores podem interferir no perfil de macrófagos ativados presentes nos tecidos infectados. Assim, a presença de macrófagos ativados foi avaliada pela atividade de NAG, técnica utilizada para detectar ativação de macrófagos em uma variedade de tecidos humanos e animais (LAMAITA *et al.*, 2012). No entanto, como demonstrado na figura 13, a presença de macrófagos ativados no fígado e baço no tempo estudado não foi afetada após a realização dos diferentes tratamentos, o que pode indicar que o EAPV em estudo poderia apresentar outro mecanismo leishmanicida, que não pela ativação de macrófagos.

**Figura 13- Número de macrófagos ativados (atividade de NAG) no fígado (A) e baço (B) de camundongos infectados com *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos.** A atividade de NAG foi avaliada no fígado (A) e baço (B) de camundongos BALB/c infectados com  $1 \times 10^7$  promastigotas de *L. infantum* após quatro semanas de infecção e duas semanas de tratamento. (PBS) tampão fosfato, (AM) antimoníato de meglumina livre, (Lipo) lipossomas convencionais vazios, (AM Lipo) lipossomas convencionais de antimoníato de meglumina, (P) extrato aquoso de própolis, (AM+P) associação de extrato aquoso de própolis ao antimoníato de meglumina e (AM Lipo + P) associação de extrato aquoso de própolis aos lipossomas convencionais de antimoníato de meglumina. Os resultados estão representados como média  $\pm$  DP.

A)



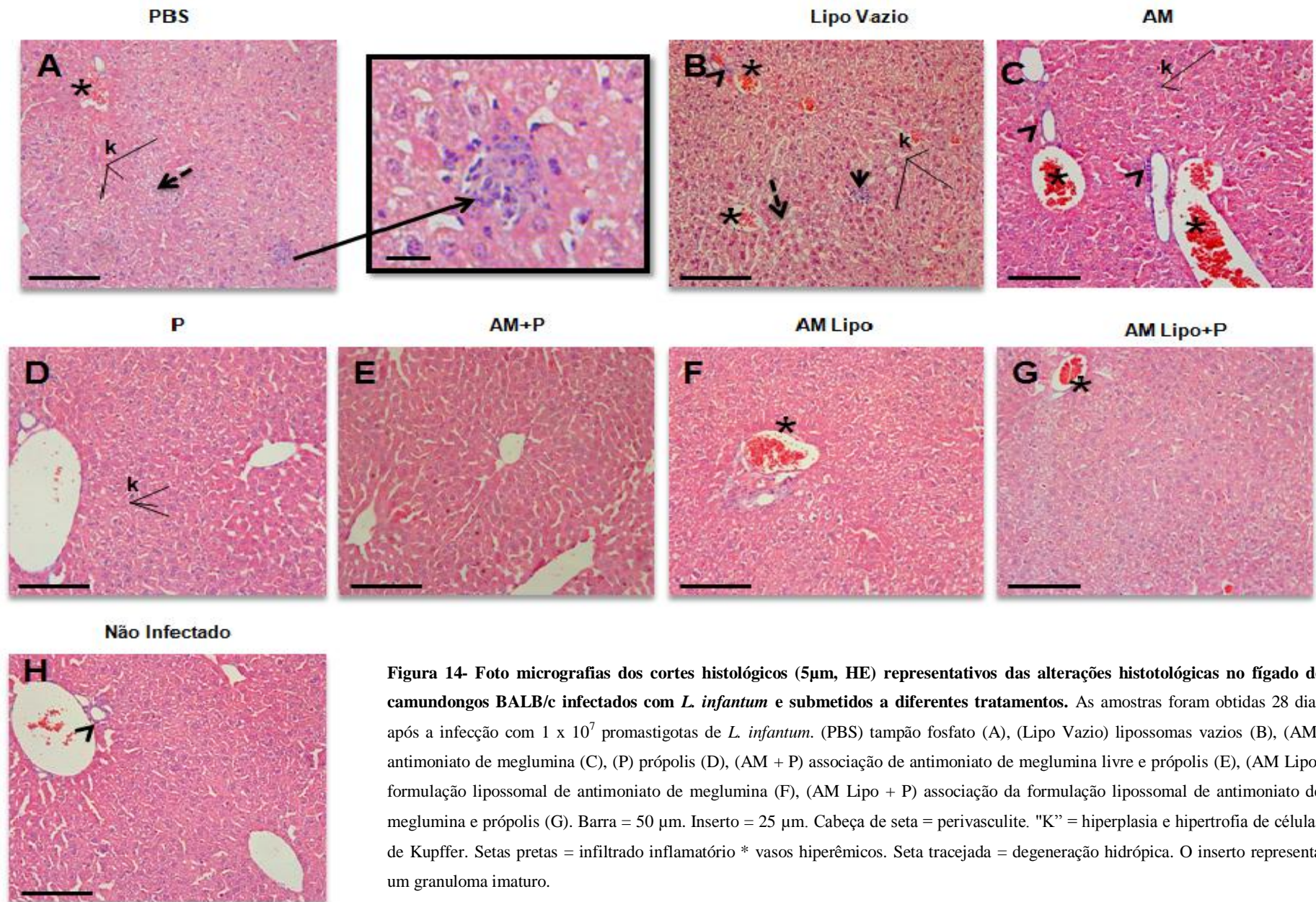
B)



#### 5.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO E BAÇO

A infecção experimental com *L. infantum* é caracterizada por respostas imunes específicas em órgãos distintos. O fígado é o local de uma infecção aguda e resistência à reinfecção, ao passo que o baço torna-se um local de persistência do parasita. Alterações hepáticas e esplênicas são frequentes durante o curso da leishmaniose visceral (GUTIERREZ *et al.*, 1984; MCEL RATH *et al.*, 1988; MURRAY, 2001). Dessa forma, as lesões do fígado e baço de camundongos infectados e submetidos a diferentes tratamentos foram avaliadas por meio de análises histopatológicas.

O fígado dos animais infectados não tratados e dos animais tratados com lipossomas vazios exibiu um padrão inflamatório granulomatoso típico, com exsudato composto por macrófagos e células epitelioides que se organizavam em forma de agregados circunscritos constituindo os chamados granulomas imaturos (4 semanas de infecção) (Figura 14 A, inserto). Nos espaços sinusoidais, houve um aumento difuso das células de Kupffer que exibiam aspecto hipertrofiado. Também se verificou uma hiperemia ativa na região centrolobular (Figura 14, A-B). Estes achados também foram observados nos animais tratados com AM livre (Figura 14 C). Resultados semelhantes foram observados por Marcon (2011), onde infecção por *L. infantum*, após cinco semanas de infecção, induziu no fígado dos animais não tratados e tratados com lipossomas vazios ou com AM livre um padrão inflamatório granulomatoso típico, com granulomas maduros constituídos por agregados mononucleares, com predomínio de macrófagos e células epitelióides e deposição de tecido conjuntivo. Além disso, houve um aumento no número das células de Kupffer no parênquima hepático e região perivascular. Carrión e colaboradores (2006), ao realizarem uma análise histopatológica do fígado de camundongos infectados com  $1 \times 10^6$  formas promastigotas de *L. infantum* observaram a presença de granulomas de tamanhos variados, discreta desorganização tecidual com infiltrado de células mononucleares e hipertrofia de células de Kupffer. Respostas imunes eficientes contra *L. infantum* no fígado dependem da formação de granulomas, processo dependente da produção de quimiocinas e subsequente recrutamento de monócitos, neutrófilos, células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, produção de citocinas e ativação de células infectadas (STANLEY *et al.*, 2006). McElrath *et al.* (1988) caracterizaram a dinâmica da formação de granulomas hepáticos em camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*. Estes pesquisadores observaram que o desenvolvimento dos granulomas se inicia com acúmulo focal de células de Kupffer, as quais perdem a associação com os sinusóides e passam a ser envolvidas por células recém-migradas da circulação como granulócitos e monócitos.



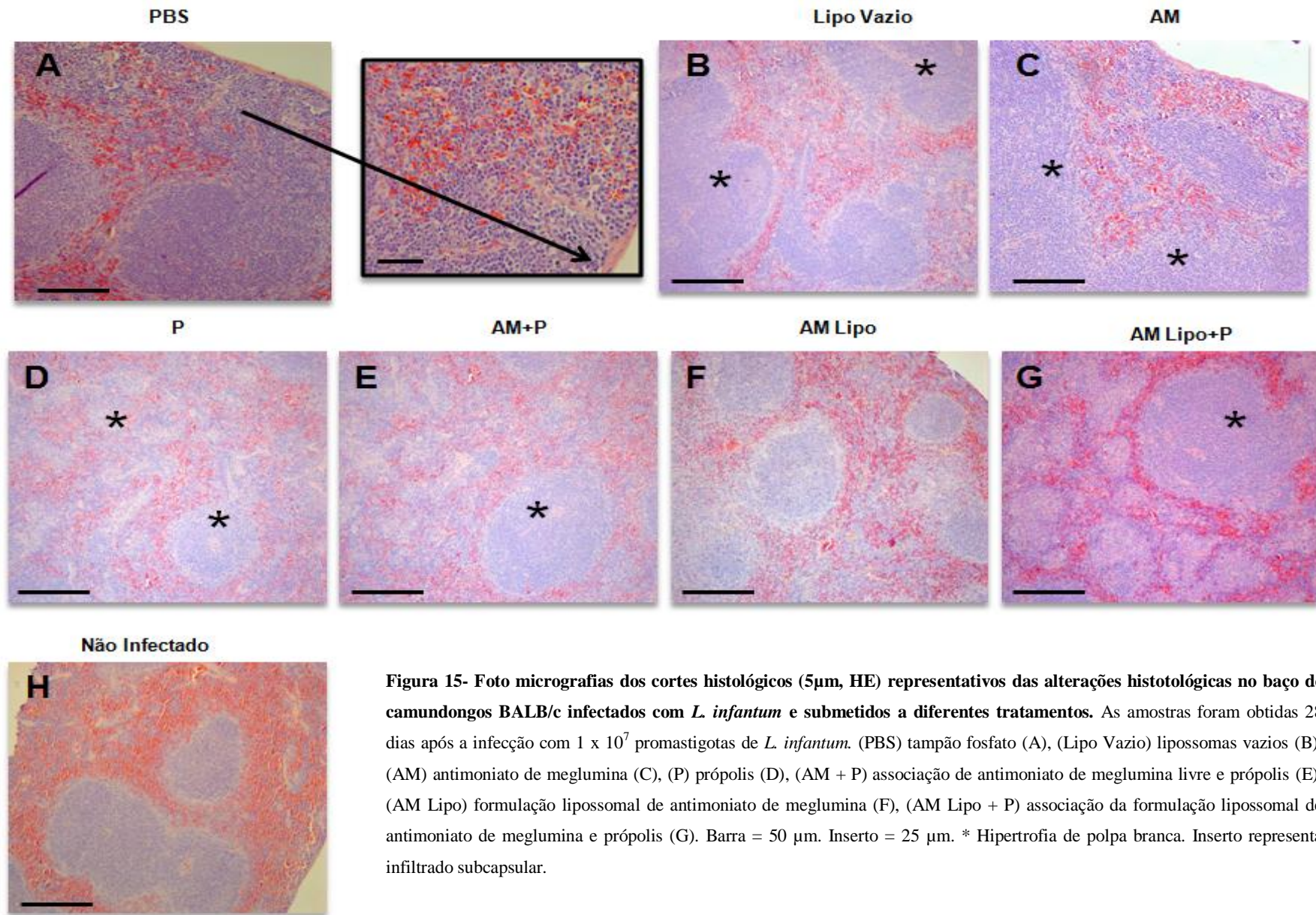
**Figura 14- Foto micrografias dos cortes histológicos (5μm, HE) representativas das alterações histológicas no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos.** As amostras foram obtidas 28 dias após a infecção com  $1 \times 10^7$  promastigotas de *L. infantum*. (PBS) tampão fosfato (A), (Lipo Vazio) lipossomas vazios (B), (AM) antimoniato de meglumina (C), (P) própolis (D), (AM + P) associação de antimoniato de meglumina livre e própolis (E), (AM Lipo) formulação lipossomal de antimoniato de meglumina (F), (AM Lipo + P) associação da formulação lipossomal de antimoniato de meglumina e própolis (G). Barra = 50 μm. Inseto = 25 μm. Cabeça de seta = perivascularite. "K" = hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer. Setas pretas = infiltrado inflamatório \* vasos hiperêmicos. Seta tracejada = degeneração hidrópica. O inserto representa um granuloma imaturo.

Além das reações granulomatosas, outras alterações hepáticas foram observadas em animais infectados não tratados e tratados com lipossoma vazio e AM livre, dentre elas, hiperemia, hiperplasia/hipertrofia das células de Kupffer e perivasculites. Alguns hepatócitos da região centrolobular apresentaram discreto a moderado grau de degeneração hidrópica, lesão reversível e comum ao fígado e que pode estar ou não associada ao processo infeccioso. Um padrão semelhante de lesões foi descrito por Duarte *et al.* (2011) e Marcon (2011), onde a resposta sintomática no fígado caracterizou-se por focos de infiltrados linfoplasmocitário e de macrófagos infectados nos espaços intralobulares, hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer e elevado infiltrado mononuclear composto por linfócitos, plasmócitos e macrófagos em torno do espaço porta. A hipertrofia e hiperplasia das células das Kupffer refletem o elevado parasitismo intracelular e o alto grau de ativação destas células o qual é decorrente do microambiente de citocinas produzidas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-2 (TAYLOR & MURRAY 1997). No presente trabalho o padrão do processo inflamatório foi semelhante aos descritos por Marcon (2011) e Duarte *et al.* (2011), entretanto a intensidade dos eventos inflamatórios foi menor, o que pode ser justificado pela virulência da cepa utilizada no tempo avaliado.

Animais que receberam tratamento com AM lipossomal ou AM lipossomal concomitante à própolis apresentaram processo inflamatório discreto com hiperemia (Figura 14, F-G). Nenhum granuloma foi observado. Os animais que receberam o tratamento com própolis ou com própolis associado ao AM apresentaram proliferação de células de Kupffer com hipertrofia sem acúmulo focal. Não foram observadas alterações vasculares e/ou granulomas (Figura 14, D-E). Sabe-se que a primeira evidência de formação de granulomas ocorre em torno do oitavo dia após a infecção (MCEL RATH *et al.*, 1988), dessa maneira, pode-se dizer que o tratamento com AM lipossomal, própolis e AM lipossomal concomitante à própolis realizado na segunda semana de infecção foi capaz de reduzir a infecção o que ocasionou a diminuição do número de granulomas, e impediu a formação de novos granulomas que poderiam surgir a partir de macrófagos parasitados. Esses achados confirmam os resultados de quantificação da carga parasitária no fígado que mostraram uma redução significativa nos animais tratados com própolis, AM lipossomal e AM lipossomal associado à própolis.

O baço é um órgão linfoide altamente organizado que consiste em regiões de polpa vermelha que são separadas de regiões de polpa branca por uma zona marginal (STANLEY *et*

*al.*, 2006). O baço parece ser um local importante na fase aguda experimental de infecção por *L. donovani* para a produção de uma resposta imune que é em última instância responsável pela resolução da doença no fígado. No entanto, em contraste com o fígado, o baço torna-se um órgão cronicamente infectado. A persistência do parasita no baço é acompanhada por uma falha de formação de granulomas, esplenomegalia, ruptura da microarquitetura do tecido linfóide, incluindo a interrupção de folículos de células B e da zona marginal (SMELT *et al.*, 1997; ENGWERDA *et al.*, 2002). No presente estudo observou-se uma alteração estrutural no baço dos animais tratados com PBS, lipossomas vazios ou AM livre. A análise desses órgãos mostrou um aumento da relação polpa branca/polpa vermelha com hipertrofia da polpa branca. Observou-se também discreto infiltrado subcapsular de linfócitos e predominância de macrófagos nos cordões medulares (Figura 15, A,B,C). Estes resultados demonstram a não efetividade dessas formulações no baço para o controle da infecção, o que corrobora com os resultados de quantificação que demonstraram que tais formulações não reduziram a carga parasitária no baço. Estas alterações estão de acordo com o que é descrito na literatura (WILSON *et al.*, 2005; CARRIÓN *et al.*, 2006; STANLEY *et al.*, 2007; NIETO *et al.*, 2011). Carrión e colaboradores (2006) após realizarem uma análise histológica do baço de camundongos infectados com  $1 \times 10^6$  promastigotas de *L. infantum*, cinquenta e seis dias após a infecção observaram uma ruptura da arquitetura esplênica com hipertrofia e hiperplasia de células do SFM, acompanhada por depleção linfóide na polpa branca do baço.



**Figura 15-** Foto micrografias dos cortes histológicos (5µm, HE) representativas das alterações histológicas no baço de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos. As amostras foram obtidas 28 dias após a infecção com  $1 \times 10^7$  promastigotas de *L. infantum*. (PBS) tampão fosfato (A), (Lipo Vazio) lipossomas vazios (B), (AM) antimoniato de meglumina (C), (P) própolis (D), (AM + P) associação de antimoniato de meglumina livre e própolis (E), (AM Lipo) formulação lipossomal de antimoniato de meglumina (F), (AM Lipo + P) associação da formulação lipossomal de antimoniato de meglumina e própolis (G). Barra = 50 µm. Inserto = 25 µm. \* Hipertrofia de polpa branca. Inserto representa infiltrado subcapsular.

Nos animais infectados e tratados com própolis ou com própolis associado ao AM livre, observou-se também um aumento da relação polpa branca versus polpa vermelha, no entanto, essa alteração foi menos acentuada quando comparada aos grupos anteriores (Figura 15 – D, E). Embora esses tratamentos não tenham sido capazes de diminuir a carga parasitária no baço (Figura 12), a análise histopatológica demonstrou uma ação da própolis neste órgão, uma vez que alterações esplênicas menos intensas foram observadas no baço dos animais tratados com própolis. Isso demonstra que, embora os componentes do EAPV não tenham atingido o baço em concentrações suficientes para diminuir a carga parasitária, um possível efeito protetor e/ou ativador neste órgão pode ser observado. Sabe-se que o excesso de TNF- $\alpha$  no ambiente linfóide esplênico é responsável em grande parte pela perda da arquitetura e função imunológica do baço na infecção por *L. infantum*, já que níveis elevados de TNF- $\alpha$  induzem a produção de IL-10, que contribui de forma significativa para o estabelecimento da infecção. Neste sentido, o possível efeito protetor do EAPV no baço pode ser através de uma ação imunomodulatória. Vários autores descreveram essa ação imunomodulatória da própolis (BRATTER *et al.*, 1999; MISSIMA *et al.*, 2009; ORSATTI *et al.*, 2010). Missima e colaboradores (2010) em estudo com camundongos C57BL / 6 tratados com extrato hidroalcolico de própolis verde brasileira (200 mg / kg) durante 14 dias mostraram uma inibição da IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-10 por células do baço, o que sugere a sua atividade imunomodulatória. Os animais infectados e tratados com a AM lipossomal e AM lipossomal concomitante à própolis apresentaram um aumento discreto da polpa branca (Figura 15, F-G). O AM lipossomal associado ao EAPV e o AM lipossomal isoladamente foram as únicas formulações capazes de reduzir a carga parasitária no baço (Figura 12b), o que favoreceu um menor dano a este órgão.

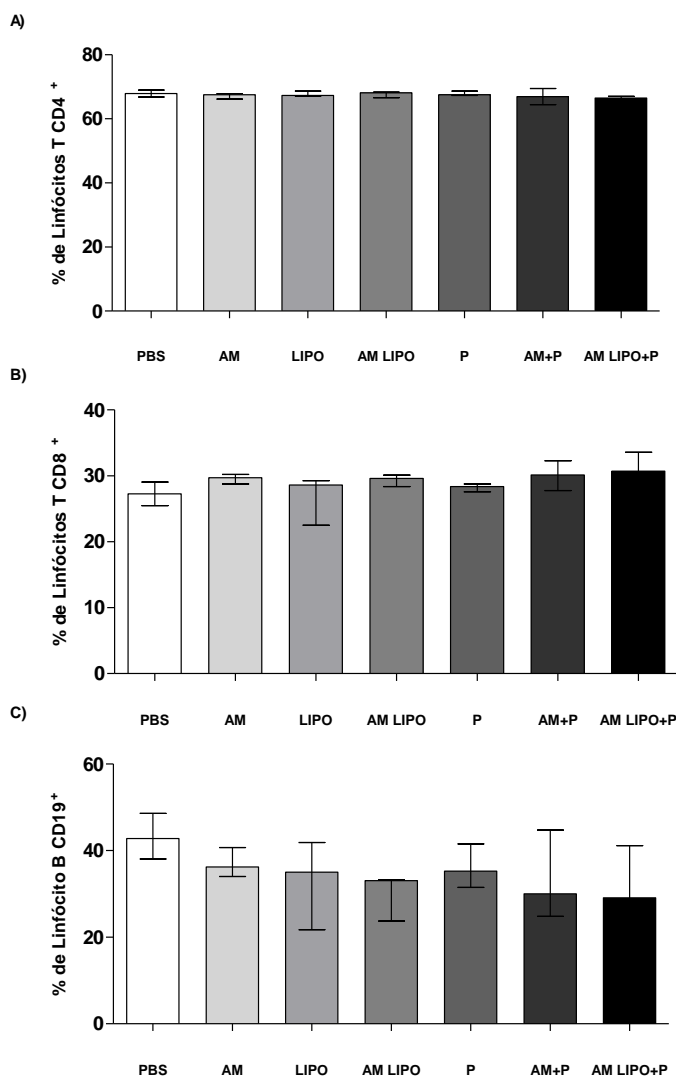
##### **5.5. DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE CÉLULAS DO BAÇO APÓS ADMINISTRAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PROPOSTAS EM CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM *LEISHMANIA INFANTUM*.**

A fim de avaliar o perfil de resposta imune adaptativa em células do baço de camundongos infectados com *L. infantum* e tratados conforme descrito anteriormente, realizou-se avaliação do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> bem como de linfócitos B no contexto *ex vivo*. A análise dos dados não demonstrou diferenças estatísticas no percentual de linfócitos T e B independente dos tratamentos utilizados (Figura 16). Durante a fase inicial da LV, a estrutura do baço é mantida e as respostas imunológicas são geradas. Respostas de



células T são prontamente detectadas e títulos de anticorpos começam a aumentar à medida que se desenvolvem rapidamente nos centros germinativos. Embora estas respostas possam controlar o crescimento do parasita no fígado de camundongos infectados dentro de 21-28 dias, são ineficazes para a eliminação de amastigotas no baço. A persistência do parasita no baço está associada à esplenomegalia grave e uma variedade de alterações no microambiente esplênico bem como um aumento concomitante na taxa de apoptose de células T, o que diminuiu a capacidade de resposta no baço a antígenos de *Leishmania sp* (STANLEY *et al.*, 2007). Como demonstrado na figura 16, não houve diferenças estatísticas entre os grupos no percentual de linfócitos T e B, o que demonstra que os diferentes tratamentos utilizados não foram suficientes para alterar a resposta imune adquirida em células esplênicas de camundongos infectados com *L. infantum*. Embora o tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossoma e sua associação com a própolis foram capazes de reduzir a carga parasitária (Figura 12), essa redução não foi suficiente para alterar a resposta imune adaptativa no baço. Provavelmente, a persistência do parasito no baço, mesmo após o tratamento, foi suficiente para causar as alterações patológicas neste órgão, o que impediu a formação de uma resposta imune adaptativa eficiente (NIETO *et al.*, 2011).

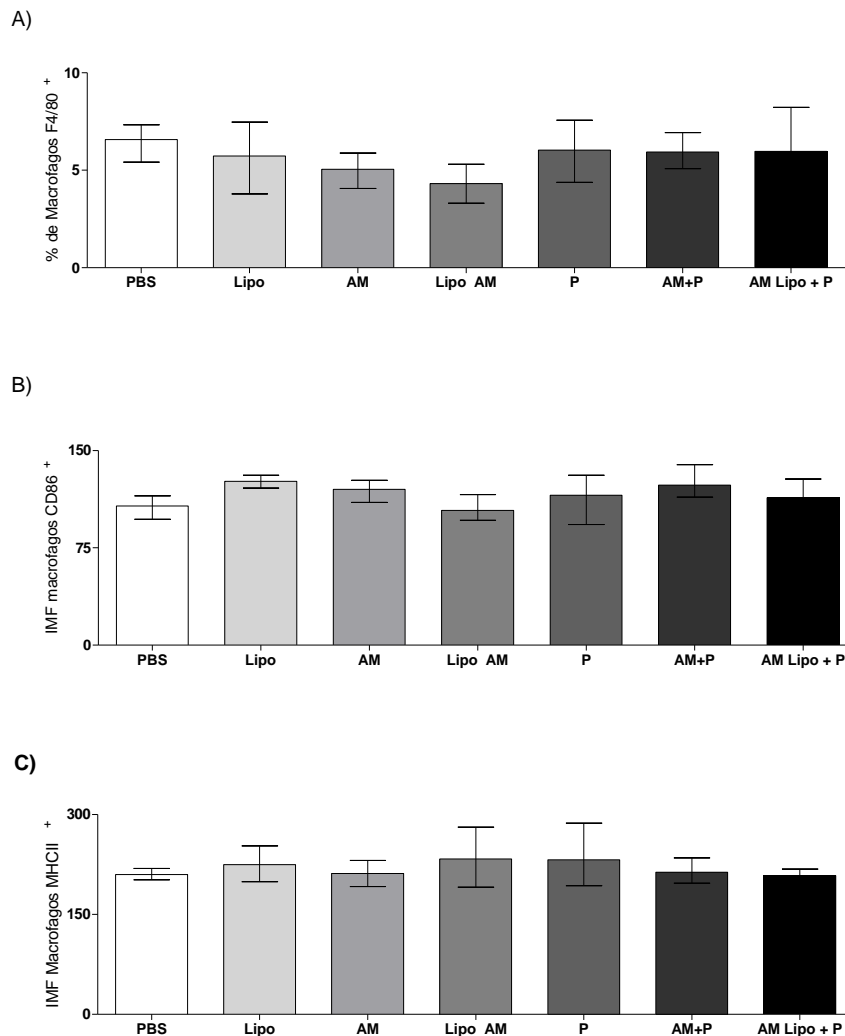
**Figura 16- Perfil da resposta imune adaptativa no contexto *ex vivo* de células do baço de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos.** (PBS) tampão fosfato, (AM) antimoniato de meglumina, (Lipo) lipossomas convencionais vazios, (AM Lipo) lipossomas convencionais de antimoniato de meglumina, (P) própolis, (AM+P) associação de própolis ao antimoniato de meglumina e (AM lipo + P) associação da própolis aos lipossomas convencionais de antimoniato de meglumina. A – percentual de linfócitos TCD4<sup>+</sup>. B – percentual de linfócitos TCD8<sup>+</sup>. C – percentual de linfócitos B CD19<sup>+</sup>. Os resultados estão representados em A e C como média ± SD e em B como mediana ± diferença interquartil.



De maneira similar, a fim de se avaliar o perfil de resposta imune inata em esplenócitos de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* e tratados conforme descrito anteriormente, foi realizada avaliação do percentual de macrófagos F4/80<sup>+</sup> bem como o seu perfil de ativação celular através da expressão dos marcadores fenotípicos CD86 e MHC II no contexto *ex vivo*. A análise dos dados não apresentou diferença estatística no percentual de macrófagos assim como no grau de ativação celular (Figura 17), confirmando os dados encontrados anteriormente, onde não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos no acúmulo de macrófagos ativados no baço e fígado determinados pela atividade de NAG.

Trabalhos anteriores demonstram que macrófagos infectados perdem a capacidade de ativar os mecanismos leishmanicidas após exposição às citocinas e ligantes de células T e NK (ENGWERDA *et al.*, 2000; NIETO *et al.*, 2011). Stanley e colaboradores (2006), observaram que macrófagos infectados com *L. infantum* não produziam IL-12 e também tinham uma capacidade reduzida em gerar Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e NO, que são importantes moléculas microbicidas para matar agentes patogênicos intracelulares.

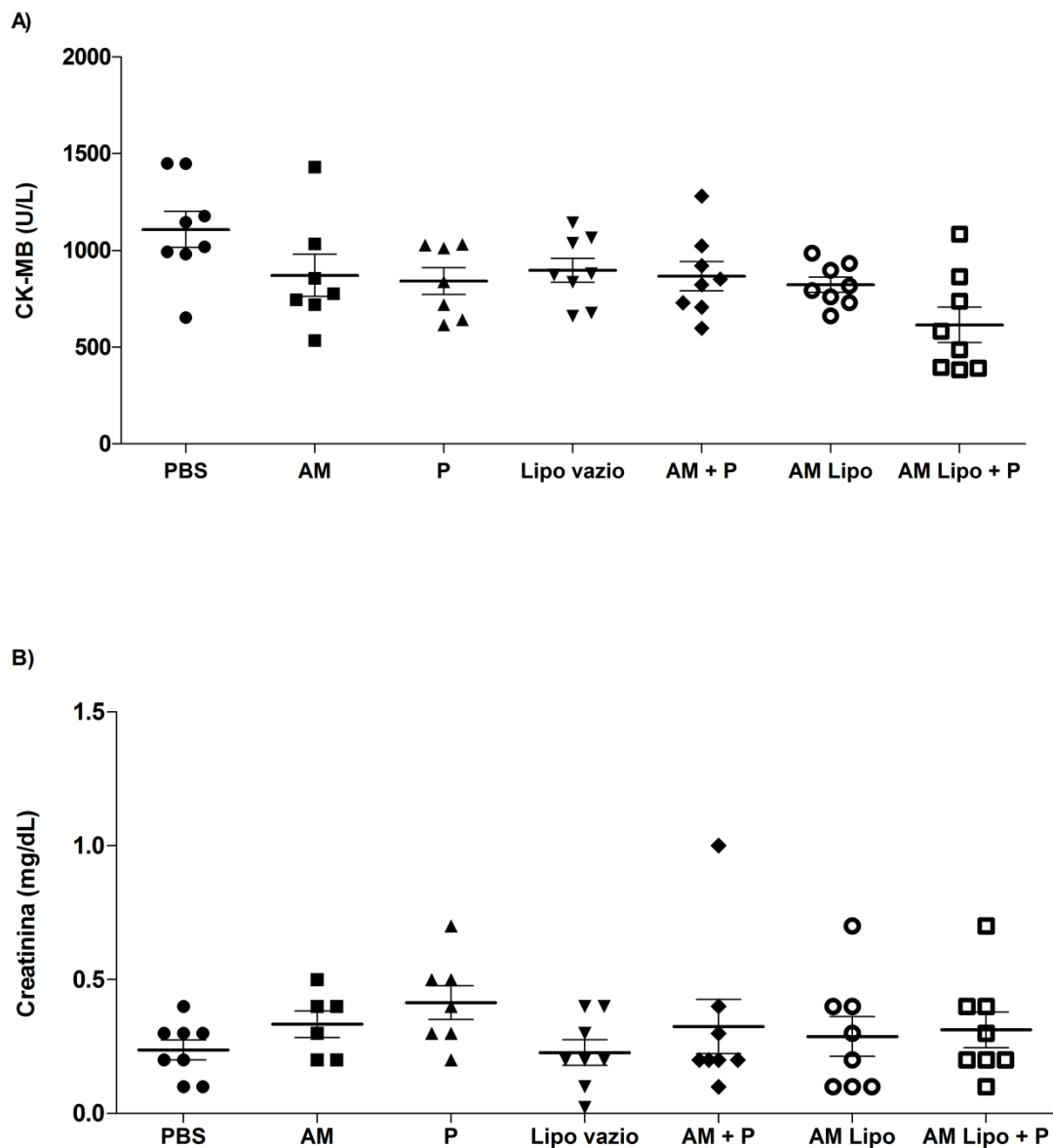
**Figura 17- Perfil da resposta imune inata no contexto *ex vivo* de células do baço de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos.** (PBS) tampão fosfato, (AM) antimoniato de meglumina, (Lipo) lipossomas convencionais vazios, (AM + L) lipossomas convencionais de antimoniato de meglumina, (P) própolis, (AM+P) associação de própolis ao antimoniato de meglumina e (AM + P+L) associação da própolis aos lipossomas convencionais de antimoniato de meglumina. A – percentual de macrófagos F4/80+. B – intensidade média de fluorescência de macrófagos F4/80+ CD86+. C – intensidade média de fluorescência de macrófagos F4/80+ MHC II+. Os resultados estão representados em A e C como média  $\pm$  SD e em B como mediana  $\pm$  diferença interquartil.

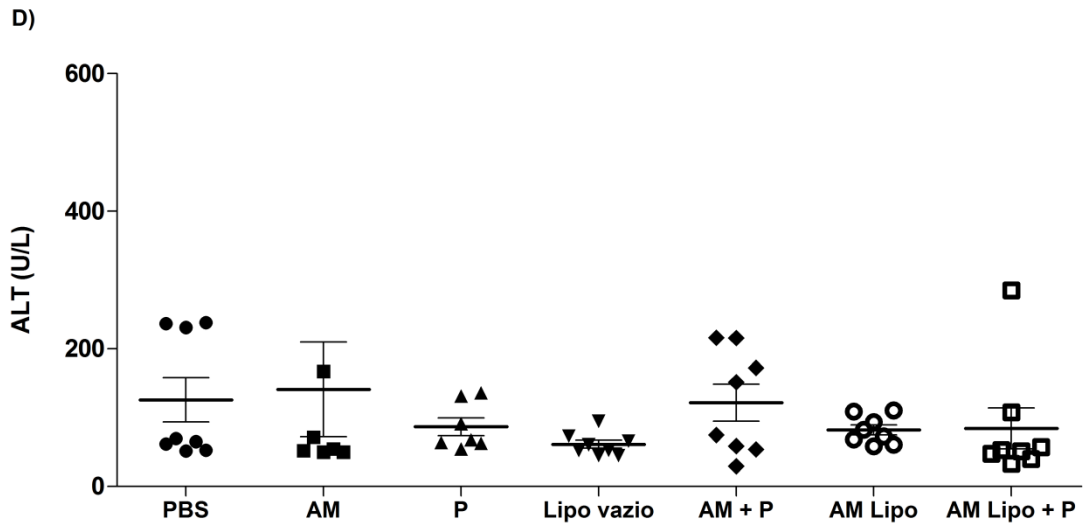
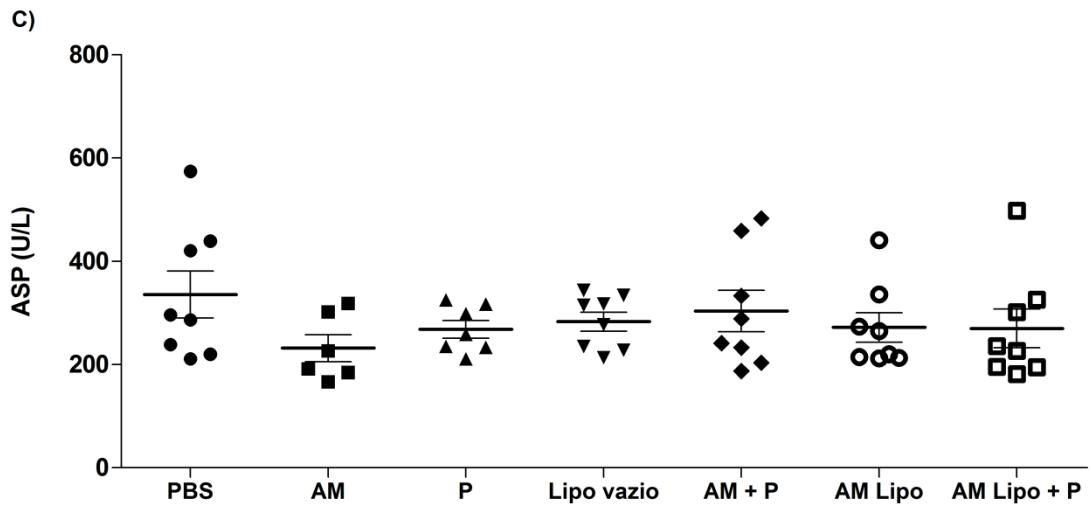


## **5.6. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE HEPÁTICA, RENAL E CARDÍACA APÓS TRATAMENTO COM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA LIVRE OU ENCAPSULADO EM LIPOSSOMA, ASSOCIADOS AO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE.**

A fim de avaliar a possível toxicidade das formulações em estudo, marcadores bioquímicos hepáticos (aspartato aminotransferase (TGO/ ASP) e alanina aminotransferase (TGP/ALT), cardíaco (creatinina quinase MB (CK MB)) e renal (creatinina) foram avaliados em soro de sangue coletado de camundongos infectados com *L. infantum* e tratados conforme descrito anteriormente. A análise dos dados não demonstrou diferenças estatísticas entre os grupos para nenhum dos marcadores bioquímicos analisados (Figura 18), indicando que não houve alterações significativas das funções renais, hepáticas e cardíacas com os tratamentos utilizados. Resultados semelhantes foram descritos por Ribeiro *et al.*(2008) que ao avaliar funções renais e hepáticas de cães tratados com uma formulação lipossomal de Sb(V), não detectou alterações significativas. No entanto, alterações hepáticas, distúrbios cardiológicos e disfunções renais são efeitos colaterais relatados após o tratamento com Sb(V) livre (RATH *et al.*,2003; DEMICHELI *et al.*,2005). Sabe-se que após administração do antimoniato de meglumina, este é rapidamente absorvido e, praticamente, 90% do antimônio é excretado nas primeiras 48 horas pelos rins, sendo necessária a administração do Sb(V) em regime contínuo para se garantir um nível adequado de antimônio nos tecidos (LIMONGI, 1973; RATH *et al.*, 2003) . Nesse sentido, uma justificativa para os resultados encontrados no presente estudo foi a descontinuidade do tratamento com Sb(V) o que permitiu a recuperação dos tecidos uma vez que utilizou-se dose única de antimoniato de meglumina (30 mg Sb(V)/Kg) e o soro analisado foi coletado 14 dias após o tratamento. Com relação ao extrato de própolis, vários estudos demonstram que sua administração em humanos ou roedores não parece causar efeitos colaterais (KANEEDA E NISHINA, 1994; SFORCIN *et al.*, 2002; JASPRICA *et al.*, 2007). Mani *et al.* (2006) após tratar ratos com diferentes concentrações de própolis (1, 3 e 6 mg/Kg/dia), diferentes extratos (aquoso ou etanólico) e diferentes tempos de administração, não observou alterações significativas nas atividades AST e LDH. Cuesta *et al.* (2005) não observaram qualquer mortalidade ou modificação da taxa de crescimento dos camundongos, após a ingestão diária de própolis na dieta durante 6 semanas.

**Figura 18- Perfil sérico de marcadores bioquímicos de camundongos BALB/C infectados com *L. infantum* e submetidos a diferentes tratamentos.** Soro de camundongos BALB/c infectados com  $1 \times 10^7$  promastigotas de *L. infantum* foi coletado após quatro semanas de infecção e duas semanas de tratamento para análise dos marcadores bioquímicos. (PBS) tampão fosfato, (AM) antimoniato de meglumina, (Lipo) lipossomas convencionais vazios, (AM Lipo) lipossomas convencionais de antimoniato de meglumina, (P) própolis, (AM+P) associação de própolis ao antimoniato de meglumina e (AM Lipo + P) associação da própolis aos lipossomas convencionais de antimoniato de meglumina. A – Concentração de CK MB; B – Concentração de creatinina; C – Concentração de TGO/ASP e D - Concentração de TGP/ALT. Os resultados estão representados como mediana  $\pm$  diferença interquartil.





## 6 – RESUMO DOS RESULTADOS.

- O EAPV não alterou a viabilidade de células J774-A1 nas diferentes concentrações testadas após 24, 48 e 72 horas de incubação;
- O antimoniato de meglumina foi tóxico para células J774-A1 em concentrações acima de 250 µg/mL em 24 horas de incubação. Seu efeito tóxico para células J774-A1 aumentou com o tempo de incubação com a droga sendo que em 72 horas, concentrações iguais ou superiores a 62,5 µg/mL foram consideradas tóxicas;
- O EAPV reduziu o efeito tóxico do antimoniato de meglumina sobre células J774-A1 e/ou aumentou a atividade destas células, uma vez que a incubação conjunta dos dois não se mostrou tóxica em nenhuma das concentrações testadas;
- A formulação lipossomal de AM na concentração de 30 mg/Kg foi capaz de reduzir a carga parasitária no baço e fígado dos animais em experimentação;
- O tratamento com o EAPV na concentração de 500 mg/Kg/dose foi capaz de reduzir a carga parasitária no fígado, mas não no baço;
- O tratamento concomitante do EAPV e AM lipossomal foi capaz de reduzir a carga parasitária no fígado e baço;
- A presença de macrófagos ativados no fígado e baço, determinada pela atividade de NAG, foi semelhante em todos os grupos em estudo;
- Análises histopatológicas do fígado e baço demonstraram que o tratamento com EAPV, AM lipossomal ou com a associação do EAPV ao AM lipossomal reduziram os impactos causados pelo processo inflamatório, favorecendo a restauração do padrão histológico hepático e uma menor alteração da arquitetura esplênica.
- A análise do perfil das células do baço não mostrou diferenças entre os grupos avaliados na porcentagem de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), linfócitos B (CD 19<sup>+</sup>) e macrófagos (F4/80<sup>+</sup>), bem como a presença de macrófagos ativados (F4/80<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> e F4/80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup>);
- Os tratamentos usados não foram tóxicos para o fígado, rins e coração.

## 7. CONCLUSÃO

A partir da observação dos dados pode-se constatar o potencial do EAPV na redução da carga parasitária no fígado e na redução dos impactos causados pelo processo inflamatório, favorecendo a restauração do padrão histológico hepático e uma menor alteração da arquitetura esplênica em camundongos infectados com *L. infantum* sem apresentar toxicidade. Este efeito também foi observado após o tratamento com uma formulação lipossomal de AM que também reduziu a carga parasitária no baço. Contudo, a associação do EAPV e AM lipossomal não se mostrou mais vantajosa que os tratamentos isolados.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ABREU, P.M., MARTINS, E.S., KAYSER, O., BINSEIL, K.U., SIEMS, K., SEEMANN, A., BREVET, J. Antimicrobial, antitumor and antileishmanial screening of medicinal plants from Guinea-Bissau. **Phytomedicine**, v.6, p. 187-195, 1999.

ALMEIDA, G. G. Complexo anfifílico de antimônio: atividade leishmanicida *in vitro* e eficácia de uma formulação tópica em modelo murino de leishmaniose cutânea. [manuscrito] / Gregório Guilherme Almeida. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia, 2012. .

ALVING, C.R., STECK, E.A., CHAPMAN, W.L., JR, WAITS, V.B., HENDRICKS, L.D., SWARTZ, G.M., JR, HANSON, W.L.. Therapy of leishmaniasis: superior efficacies of liposome-encapsulated drugs. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 75(6), p. 2959–2963, 1978.

AWASTHI, A., MATHUR, R. K. & SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J Med Res.**, v.119, p. 238-258, 2004.

AYRES,D.C., MARCUCCI, M.C., GIORGIO, S. Effects of brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102(2), p. 215-20, 2007.

BADARÓ, R., NASCIMENTO, C., CARVALHO, J.S., BADARÓ, F., RUSSO, D., HO, J.L., REED, S.G., JOHNSON, W.D., JONES, T.C. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reverses. Neutropenia and reduces secondary infections in visceral leishmaniasis. **J. Infect Dis**, v.170, p. 413, 1994.

BALASEGRAM, M., RITMEIJER, K., LIMA, M. A., BURZA, S., GENOVESE, G.O., MILANI, B., GASPANI, S., POTET, J., CHAPPUIS, F. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 17(4), p.493–510, 2012.

BANKOVA, V.S., DE CASTRO, S.L., MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in search on chemistry and plant origins. **Apidologie**, v. 31(1), p. 3-15, 2000.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **J Evid Based Complementary Altern Med**, v. 2(1), p.29–32, 2005.

BATISTA, C. M., CARVALHO, C. M. B., MAGALHAES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm**, São Paulo, v. 43(2), 2007.

BLACK, C.D., WATSON, G.J., WARD, R.J. The use of Pentostam liposomes in the chemotherapy of experimental leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 71(6), p.550–552, 1977.

BRATTER, C., TREGEL, M., LIEBENTHAL, C., VOLK, H.D. Prophylaktische wirkungen von propolis zur immunstimulation: eine klinische pilotstudie. **Forsch Komplementmed**, v. 6, p.256–260, 1999.

BRUNTON, L.L., LAZO, J.S., PARKER, K.L. Farmcotécnica e farmacodinâmica: a dinâmica da absorção, ação e eliminação dos fármacos. Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. Porto Alegre: **AMGH**, 2010. p.1-36

CAMPOS, R. O.; PAULINO, N.; SILVA, C. H.; SCREMIN, A.; CALIXTO, J. B. Anti-hyperalgesic effect of an ethanolic extract of propolis on mice and rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 50 (10), 1187–1193, 1998.

CARRION, J., NIETO, A., IBORRA, S., INIESTA, V., SOTO, M., FOLGUEIRA, C., ABANADES, D.R., REQUENA, J.M., ALONSO, C. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasite Immunol.**, v. 28, p. 173-183, 2006.

CARTER, K. C., BAILLIE, A. J., ALEXANDER, J., DOLAN, T. F. The therapeutic effect of sodium stibogluconate in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani* is organ-dependent. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.40, p. 370-373, 1988.

CARVALHO, P.B., FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease - Review. **Fitoterapia**, v. 72, p. 599-618, 2001.

CHANG, W. C., CHEN, C.H., LEE, M.F., CHANG, T., YU, Y.M. Chlorogenic acid attenuates adhesion molecules upregulation in IL-1 $\beta$ -treated endothelial cells. **Eur J Nutr.**, v. 49(5), p. 267-275, 2009.

CHAPPUIS, F., SUNDAR, S., HAILU, A., GHALIB, H., RIJAL, S., PEELING, R. W., ALVAR, J., BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol.**,v. 5(11), p. 873-82, 2007.

CHATTOPADHYAY, A., JAFURULLA, M.D. A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 416, p. 7–12, 2011.

CUESTA, A., RODRÍGUEZ, A., ESTEBAN, M.A., MESEGUER, J. In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 18, p. 71–80, 2005.

CUNNINGHAM, M. L., FAIRLAMB, A. H. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. **Eur. J. Biochem.** v. 230, p. 460-468, 1995.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* contra *Leishmania chagasi*: não se esqueça da lei de prioridade. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** , Rio de Janeiro, v 101(1), 2006.

DE CASTRO, S. L. Propolis: Biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. **Ann Rev Biomed Sci.** v. 3, p. 49-83, 2001.

DEMICHELI, C., OCHOA, R., LULA, I.S., GOZZO, F.C., EBERLIN, M., & FRÉZARD, F. Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumine antimonate. **Appl Organomet Chem.** v. 17, p. 226–231, 2003.

DEMICHELI, C., ROCHA, O. G. F., FRÉZARD, F. Lipossomas: Propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. XY( 00), 1-x, 2004.

DEMICHELI, C., FRÉZARD, F., MANGRUM, J. B., & FARRELL, N. P. Interaction of trivalent antimony with a CCHC zinc finger domain: potential relevance to the mechanism of action of antimonial drugs. **Chem. Commun.** v. 39, p. 4828-4830, 2008.

DENTON. H., MCGREGOR, J.C., COOMBS, G.H. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **Biochem J**, v.381(Pt 2), p.405-12, 2004.

DUARTE, M. I. S. Leishmanise visceral. In: Brasileiro Filho, Geraldo. Bogliolo, Patologia. 8.ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, p. 1406-1415, 2011.

DURAN, N., MUZ, M., CULHA, G., DURAN, G., OZER, B. GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. **Parasitol Res.** v. 108, p. 95–105, 2011.

ENGWERDA, C.R., KAYE, P.M.. Organ-respostas imunitárias específicas associadas com a doença infecciosa. **Immunol Today**, v.21, p. 73-78, 2000.

ENGWERDA, C.R., ATO, M., COTTERELL, S.E., MYNOTT, T.L., TSCHANNERL, A., GORAK-STOLINSKA, P.M., KAYE, P.M. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. **Am J Pathol**, v.161, p. 429–437, 2002.

FERREIRA, C. S., MARTINS, P. S., DEMICHELI, C., BROCHU, C., OUELLETTE, M., & FRÉZARD, F. Thiol-induced reduction of antimony (V) into antimony (III): a comparative study with trypanothione, cysteinylglycine, cysteine and glutathione. **BioMetals**, v.16, p. 441-443, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION . Approval letter. FDA . Acessado em [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/97/050740a\\_081797-1.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/97/050740a_081797-1.pdf) Available

FRÉZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 181-9, 1999.

FRÉZARD, F., DEMICHELI, C., FERREIRA, C.S., COSTA, M.A. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45(3), p.913-6, 2001.

FRÉZARD. F., SCHETTINI D.A., ROCHA, O.G.F., DEMICHELI, C. Lipossomas: Physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. **Quím Nova**, v.28, p. 511-518, 2005.

FRÉZARD, F., DEMICHELI, C., RIBEIRO, R.R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14 (7), p. 2317-36, 2009.

FRÉZARD, F., DEMICHELI, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. **Expert Opin. Drug Deliv**, v.7 (12), p.1343-58, 2010.

FREITAS, S.F., SHINOHARA, L., SFORCIN, J.M., GUIMARÃES, S. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine**, v.13, p. 170-175, 2006.

GOMEZ-CARAVACA, A. M., GÓMEZ-ROMERO, M., ARRÁEZ-ROMÁN, D., SEGURA-CARRETERO, A., FERNANDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **J Pharm Biomed Anal**, v. 41, p.1220–1234, 2006.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol**, São Paulo, v. 7, p. 3, 2004.

GUTIERREZ, Y., MAKSEM, J.A., REINER, N.E. Pathologic changes in murine leishmaniasis (*Leishmania donovani*) with special reference to the dynamics of granuloma formation in the liver. **Am J Pathol**, v. 114, p. 222-230, 1984.

HALDAR, A. K., SEM, P., ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Mol Biol Int**, v. 2011, p. 23, 2011.

HAN, S., SUNG, K.H., YIM, D., LEE S., CHO, K., LEE, CK., HA, N.J., KIM, K. Activation of murine macrophage cell line RAW 264.7 by Korean propolis. **Arch Pharm Res.**, v. 25, p. 895-902, 2002.

HAN, E.H., KIM, J.Y., KIM, H.G., CHUN, H.K., CHUNG, Y.C., JEONG, H.G. Inhibitory effect of 3-caffeoyl-4-dicaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* against phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in macrophages. **Chem Biol Interact**, v. 183, n.3, p. 397-404, 2009.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, v.354, p.1191-1199, 1999.

HU, H.R. HEPBURN, Y. LI, M. CHEN, S.E. RADLOFF, S. DAYA. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **J. Ethnopharmacol**, v. 100, p. 276–283, 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. **ISO 2009**, p. 9 -28, ISO 2009.

IVANOVSKA, N., STEFANOVA, Z., VALEVA, V., NEYCHEV, H. Immunomodulatory action of propolis: VII. A comparative study on cinnamic and caffeic acid lysine derivatives. **Biol Immun**, v. 46, p. 115-7,1993.

JASPRICA, I., MORNAR, A., DEBELJAK, Z., SMOLCIC-BUBALO, A., MEDIC-SARIC, M., MAYER, L., ROMIC, Z., BUCAN, K., BALOG, T., SOBOCANEC, S., SVERKO, V. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 548–554, 2007.

JHA, T. K. Drug unresponsiveness & combination therapy for kalazar. **Indian J Med Res**, v.123, p. 389-398, 2006

KANEEDA, J., NISHINA, T. Safety of propolis. Acute toxicity. **Honeybee Science**, v.15, p. 29–33, 1994.

KAYE, P., SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, p. 604-615, 2011.

KRAKAUER, T. The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 24, n.1, p. 113-119, 2002.

KRAUTH-SIEGEL, R. L. & COMINI, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, p. 1236-1248, 2008.

KUMAZAWA, S., YONEDA, M., SHIBATA, I., KANAEDA, J., HAMASAKA, T., NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chem Pharm Bull**, v. 51 (6), p. 740-742, 2004.

LAMAITA, R.M., PONTES, A., BELO, A.V., CAETANO, J.P., ANDRADE, S.P., CÂNDIDO, E.B., TRAIMAN, P., CARNEIRO, M.M., SILVA-FILHO, A.L. Inflammatory response patterns in ICSI patients: a comparative study between chronic anovulating and normally ovulating women. **Reproductive Sciences**, v.19(7), p. 704-11, 2012.

LÉGARÉ, D., RICHARD, D., MUKHOPADHYAY, R., STIERHOF, Y.D., ROSEN, B.P., HAIMEUR, A., PAPADOPOULOU, B., OUELLETTE, M. The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. **J Biol Chem**, v. 276(28), p. 26301-7, 2001.

LEON, O. & ROTH, M. Zinc fingers: DNA binding and protein-protein interactions. **Biol Res**. v. 33, p. 21-30, 2000.

LIMONGI, J. P. CORBETT, C. E. Em Farmacodinâmica ed.; Livraria Editora Artes Médicas: São Paulo, cap. 61, 1973.

LOTTI, C., FERNANDEZ, M. C., PICCINELLI, A. L., CUESTA-RUBIO, O., HERNANDEZ, I. M., RASTRELLI, L. Chemical constituents of red Mexican própolis. **J Agric Food Chem.**, v.58, p. 2209-2213, 2010.

LUSTOSA, S.R. Padronização de extrato de própolis e avaliação da atividade antimicrobiana. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife/PE. 2007.

MACHADO G. M. C., LEON L. L., DE CASTRO S. L. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102(1), p. 73-77, 2007.

MANI, F., DAMASCENO, H.C.R., NOVELLI, E.L.B., MARTINS, E.A.M., SFORCIN, J.M. Propolis: effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables **J Ethnopharmacol**, v.105, p. 95–98, 2006.

MARCON, L.D., Efeito do tratamento lipossomal com antimoniato de meglumina em camundongos infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*: Análise das vias de administração e da resposta ao fármaco em modelo de desnutrição. 2011. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG.

Marcucci, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Quím Nova**, v.19, p. 529-535, 1996.

MARCUCCI, M.C., BANKOVA, V. Chemical composition, plant origin and biological activity of brazilian propolis. **Curr Top Phytochemistry**, v. 2, p. 115-123, 1999.

MARCUCCI M. C. Process to typing natural products. Requested patent. Brazilian National Institute for Intellectual Property, INPI n. PI 0105471-6, 2000.

MARQUES-DA-SILVA, E.A., COELHO, E.A., GOMES, D.C., VILELA, M.C., MASIOLI, C.Z., TAVARES, C.A., FERNANDES, A.P., AFONSO, L.C., REZENDE, S.A. Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. **Parasitol Res**, v.98, p.67-74, 2005.

MAURICIO, I. L., STOTHARD, J. R. & MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol.**, v. 16, p. 188-189, 2000.

MCELDRATH, M.J., MURRAY, H.W., COHN, Z.A. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. **J Exp Med**, v.167, p. 1927–1937, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de vigilância epidemiológica. 7. ed. – Brasília, v. 816 p. 31 - 63, 2009. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/df/gve\\_7ed\\_web\\_atual.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/df/gve_7ed_web_atual.pdf) acessado em 12 de janeiro de 2013.

MISSIMA, F., PAGLIARONE, A.C., ORSATTI, C.L. ARAÚJO JR, J.P, SFORCIN, J.M. Propolis effect on Th1/Th2 cytokines' expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress. **Phytother Res**, v.24, p. 1501–1507, 2010.

MISSIMA, F., DA SILVA FILHO, A. A., NUNES, G. A., BUENO, P. C. P., SOUSA, J. P. B., BASTOS, J. K., SFORCIN, J. M. Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **J Pharm Pharmacol**, v. 59(3), p. 463-468, 2007.

MISSIMA, F., PAGLIARONE, A.C., ORSATTI, C.L., SFORCIN, J.M. The effect of propolis on pro-inflammatory cytokines produced by melanoma-bearing mice submitted to chronic stress. **JAAS**, v.1, p. 11–15, 2009.

MIYATAKA, M. NISHIKI, H. MATSUMOTO, T. FUJIMOTO, M. MATSUKA, T. Satoh Evaluation of propolis I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physic-chemical methods. **Biol Pharm Bull**, v. 20, p. 496–501, 1997.

MOUGNEAU, E., BIHL, F., GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunol Rev**, v.240(1), p.286-96, 2011.

MOURA, S.A.L., FERREIRA, M.A.N.D., ANDRADE, S.P., REIS, M.L.C., NOVIELLO, M.L., CARA, D.C. Brazilian Green Propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, Article ID 182703, 7 pages, 2011.

MOURA, S.A.L. Estudo dos efeitos do extrato de própolis em um modelo murino de angiogênese inflamatória. 2009. Tese (doutorado em patologia) – Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Meth.** v. 65, p. 55-63, 1983.

MUKHOPADHYAY, R., DEY, S., XU, N., GAGE, D., LIGHTBODY, J., OUELLETTE, M., ROSEN, B.P. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.93(19), p.10383-7, 1996.

MURRAY, H.W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **Int J Exp Pathol**, v. 82, p. 249–267, 2001.

NAGAOKA, T., BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., MIDORIKAWA, K., MATSUSHIGE, K., KADOTA, S. Caffeic Acid Phenethyl Ester (cape) analogues: Potent nitric oxide inhibitors from the netherlands propolis. **Biol Pharm Bull**, v. 26(4), p. 487-91, 2003.

NIETO, A., DOMÍNGUEZ-BERNAL, G., ORDEN, J.A., DE LA FUENTE, R. MADRID-ELENA, N., CARRIÓN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Vet Res**, v. 42, p. 39, 2011.

NILFOROUSHZADEH, M.A., SHIRANI-BIDABADI, L., ZOLFAGHARI-BAGHBADERANI, A., SABERI, S., SIADAT, A.H., MAHMOUDI, M. Comparison of *Thymus vulgaris* (Thyme), *Achillea millefolium* (Yarrow) and propolis hydroalcoholic extracts versus systemic glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **J Vector Borne Dis**, v. 45, p. 301–306, 2008.

ORSATTI, C.L., MISSIMA, F., PAGLIARONE, A.C., SFORCIN, J.M. Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. **J Ethnopharmacol**, v.129, p. 314–318, 2010a.

ORSATTI, C.L., MISSIMA, F., PAGLIARONE, A.C., BACHIEGA, T.F., BÚFALO, M.C., ARAÚJO JR., J.P., SFORCIN, J.M. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. **Phytother Res**, v. 24, p. 1141–1146, 2010b.

ORSIN R. O., FUNARI S. R. C., SOARES A. M. V. C., CALVI S. A., OLIVEIRA S. L., SFORCIN J. M., BANKOVA V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **J. Venom Anim Toxins**, v. 6, p. 205– 219, 2000.

ORŠOLIĆ, N., BENKOVIĆ, V., LISIČIĆ, D., DIKIĆ, D., ERHARDT, J., KNEŽEVIĆ, A.H. Protective effects of propolis and related polyphenolic/flavonoid compounds against toxicity induced by irinotecan. **Med Oncol**. v.27(4), p. 1346-58, 2010 .

OZBILGE, H., KAYA, E.G., ALBYRK, S., SILICI, S. Anti- leishmanial activities of ethanolic extract of Kayseri propolis. **Afr J Microbiol Res**, v. 4 (7), p. 556-560, 2010.

PARK, Y. K., ALENCAR, S.M., SCAMPARINI, A.R.P., AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32(6), p. 997-1003, 2002a.

PARK, Y.K., IKEGAKI, M., ALENCAR, S.M. Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**. v. 58, p. 3-7, 2002b.

PAULINO, N., TEIXEIRA, C., MARTINS, R., SCREMIN, A., DIRSCH, V.M., VOLLMAR, A.M., ABREU, S.R., DE CASTRO, S.L., MARCUCCI, M.C. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. **Planta Medica**, v. 72, p. 899–906, 2006.

PEREIRA, A. D. S., SEIXAS, F. R. M. S. E NETO, F. R. D. A. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quim Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

PONTIN, K., SILVA FILHO, A. A., SANTOS, F.F., SILVA, M.L.A., CUNHA, W.R., NANAYAKKARA, N.P.D., BASTOS, J.K., ALBUQUERQUE, S. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitol Res.**, v. 103, p. 487– 492, 2008.

RAO, L.S., HARDY, J.G., WILSON, C.G. Tissue distribution and fate of free and liposome-encapsulated [<sup>125</sup>Sb] sodium stibogluconate by gamma scintigraphy. **Int J Pharm.**, p. 17, p. 283-90, 1983.

RATH, S., TRIVELIN L.A., IMBRUNITO, T.R., TOMZELA, D.M., JESÚZ, M.N., MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim Nova**, v. 26(4), 2003.

RIBEIRO, R.R., MOURA, E.P., PIMENTEL, V.M., SAMPAIO, W.M., SILVA, S.M., SCHETTINI, D.A., ALVES, C.F., MELO, F.A., TAFURI, W.L., DEMICHELI, C., MELO, M.N., FRÉZARD, F., MICHALICK, M.S. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52(7), p.2564-72, 2008.



ROCHA, L.G., ALMEIDA, J.R.G.S., MACEDO, R.O., BARBOSA-FILHO, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine** v. 12, p. 314-535, 2005.

SCHETTINI, D.A., RIBEIRO, R.R., DEMICHELI, C., ROCHA, O.G., MELO, M.N., MICHALICK, M.S., FRÉZARD, F. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. **Int J Pharm**, v.315(1-2), p.140-7, 2006.

SERENO D., CAVALEYRA M., ZEMZOUMI K., MAQUAIRE S., OUAISSI A., LEMESRE J. L. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 3097–3102, 1998.

SERENO, D., HOLZMULLER, P., MANGOT, I., CUNY, G., OUAISSI, A., LEMESRE, J.L. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45(7), p.2064-9, 2001.

SFORCIN, J. M., KANENO, R., FUNARI, S. R. C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 8, p. 19–29, 2002a.

SFORCIN, J.M., NOVELLI, E.L.B., FUNARI, S.R.C. Seasonal effect of Brazilian propolis on seric biochemical variables. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 8, p. 244–254, 2002b.

SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **J Ethnopharmacol**, v. 113, p. 1-14, 2007.

SIEUWERTS, A.M., KLIJIN, J.G.M., PETERS, H.A., FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity to cell culture *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC50- values and cell survival. **Eur Journ Clin Chem Clin Biochem**, v. 33, p. 813-823, 1995.

SMELT, S.C., ENGWERDA, C.R., MCCROSSEN, M., KAYE, P.M. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. **J Immunol**, v. 158, p. 3813–3821, 1997.

SOLBACH, W., LASKAY, T. A resposta do hospedeiro a *Leishmania* infecção. **Adv Immunol.**, v.74, p. 275-317, 2000.

SONG, Y.S., PARK E.H., JUNG K.J., JIN C. Inhibition of angiogenesis by propolis. **Arch Pharm Res**. v. 25(4), p. 500-4, 2002.

SOUSA, J. P. B., FURTADO, N. A. J. C., JORGE, R., SOARES, A. E. E., BASTOS, J. K. Perfis físicoquímico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Rev Bras Farmacogn**, v.17, p.85-93, 2007.

STANLEY, A. C., ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, p.138–147, 2007.

STORM, G., CROMMELIN, D.J.A. Liposomes: Quo vadis? **PSTT**, v.1, p.10-31, 1998.

STARZYK, J., SCHELLER, S., SZAFLARKI, J., MOSKWA, M., STOJKO, A. Biological properties and clinical application of propolis. II. Studies on the antiprotozoan activity of ethanol extract of propolis. **Arzneimittelforschung**, v. 27, p. 1198– 1199, 1997.

SUN, H., YAN, S.C., CHENG, W.S. Interaction of antimony tartrate with the tripeptide glutathione implication for its mode of action. **Eur J Biochem**, v.267(17), p.5450-7, 2000.

SUNDAR, S., MONDAL, D., RIJAL, S., BHATTACHARYA, S., GHALIB, H., KROEGER, A., BOELAERT, M., DESJEUX, P., RICHTER-AIRIJOKI, H., HARMS, G. Implementation research to support the initiative on the elimination of kalazar from Bangladesh, India and Nepal--the challenges for diagnosis and treatment. **Trop Med Int Health**, v.13(1), p.2-5, 2008

SUNDAR, S., CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opin. Pharmacother**, v.14(1), p. 53-63, 2013.

TATEFUJI, T., IZUMI, N., OHTA, T., ARAI, S., IKETA, M., KURIMOTO, M. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biol Pharm Bull**, v. 19, p. 966-970, 1996.

TAYLOR, A. P., MURRAY H. W. Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferon- $\gamma$ : effect of interleukin-12 in experimental visceral leishmaniasis in interferon- $\gamma$  gene disrupted mice. **J Exp Med**, v. 185, p. 1231-1239, 1997.

TITUS, R.G., MARCHAND, M., BOON, T., LOUIS, J.A. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol**, v.7, p.545-555, 1985.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. **Nature Rev Drug Disc**, v. 4, p. 145-160, 2005.

VALLADARES, J.E., RIERA, C., GONZÁLEZ-ENSENYATE, P., DÍEZ-CASCÓN, A., RAMOS, G., SOLANO-GALLEGO, L., GÁLLEGO, M., PORTÚS, M., ARBOIX, M., ALBEROLA, J. Long term improvement in the treatment of canine leishmaniasis using an antimony liposomal formulation. **Veterinary Parasitology**, v. 97, p. 15–21, 2001.

WILSON, M.E., JERONIMO, S.M., PEARSON, R.D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microb Pathog**, v. 38, p. 147-160, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Disponible em:<[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf)>

WYLLIE, S., CUNNINGHAM, M. L., FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 39925- 39993, 2004.

## ANEXO

### ANEXO I

#### CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE PRÓPOLIS.

**Tabela 3- Características organolépticas das amostras de própolis coletadas no Município de Jaguaráçu – Extraído de Moura, 2009.**

MÊS/ANO	COR	AROMA	ASPECTO
Setembro/2005	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Outubro/2005	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Novembro/2005	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Dezembro/2005	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Janeiro/2006	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Fevereiro/2006	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Março/2006	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Abril/2006	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Maio/2006	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Junho/2006	Verde na face externa e amarelada ou marrom na face interna	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Julho/2006	Verde na face externa e amarelada ou marrom na face interna	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Agosto/2006	Verde na face externa e amarelada ou marrom na face interna	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)

**Tabela 4- Dados cromatográficos e espectrométricos dos constituintes presentes no extrato aquoso da própolis verde de Minas Gerais (Sul do Brasil) obtidos por HPLC/ESI/MS (high pressure liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectroscopy) - Extraído de Moura, 2009.**

Picos	Tempo de Retenção (min)	Quantidade Relativa (%)	UV (nm)	*[M+H] <sup>+</sup> m/z	**[M-H] <sup>-</sup> m/z	Identificação Proposta
1	14,4	1,2	ND	355,2	353,4	3-O-(E)-ácido cafeoilquinico
2	17,6	4,4	300sh, 330	355,2	353,1	5-O-(E)-ácido cafeoilquinico
3	20,9	2,6	300sh, 330	355,2	353,1	4-O-(E)-ácido cafeoilquinico
4	27,1	13,8	300sh, 330	521,4	519,2	Ácido dihidrocafeoilquinico
5	29,0	15,8	300sh, 330	517,3	515,2	ácido3,4-di-O-cafeoilquinico
6	31,5	8,0	300sh, 330	517,3	515,2	ácido3,5-di-O-(E)-cafeoilquinico
7	32,5	27,2	330	ND	515,2	ácido4,5-di-O-(E)-cafeoilquinico
8	41,3	2,0	315	ND	231,2	ácido4-hidroxi-3-prenil-cinâmico (drupanin)
9	47,0	5,0	315	ND	299,5	ácido4-hidroxi-3,5-diprenil-cinâmico (artepilina C)

\* massas protonadas/ \*\* massas desprotonadas

