



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SUELEN SANTOS DA SILVA

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADORA DA
PRÓPOLIS BRASILEIRA**

Londrina
2012

SUELEN SANTOS DA SILVA

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA E IMUNODULADORA DA
PRÓPOLIS BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ivete Conchon Costa.

Co-Orientador: Prof. Dr. Wander Rogerio Pavanelli.

Londrina
2012

**Catlogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586a Silva, Suelen Santos da.
Atividade leishmanicida e imunoduladora da própolis brasileira / Suelen Santos da
Silva. – Londrina, 2012.
60 f. : il.

Orientador: Ivete Conchon Costa.
Coorientador: Wander Rogério Pavanelli.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia
Experimental, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Patologia experimental – Teses. 2. Leishmaniose – Teses. 3. Doenças parasitárias –
Teses. 4. Própolis – Uso terapêutico – Teses. 5. Camundongo como animal de laboratório –
Teses. I. Costa, Ivete Conchon. II. Pavanelli, Wander Rogério. III. Universidade Estadual
de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia
Experimental. IV. Título.

CDU 616-092

SUELEN SANTOS DA SILVA

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADORA DA
PRÓPOLIS BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de pós graduação em Patologia Experimental, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Ivete Conchon Costa
Universidade Estadual de Londrina- UEL

Prof. Dr. José Mauricio Sforcin
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita
Filho- Unesp

Prof^ª. Dr^ª. Maria Angélica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina- UEL

Londrina, 20 de Abril de 2012.

AGRADECIMENTOS

Realizar um agradecimento pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção deste trabalho.

Sou eternamente grata ao meu Deus, por todo seu cuidado, carinho e por sempre colocar pessoas especiais em minha vida.

A minha orientadora, Dra. Ivete Conchon Costa, que aceitou o desafio de orientar a sua primeira aluna de mestrado e mesmo com as dificuldades que passamos me motivou e ajudou a melhorar o trabalho. Por me introduzir na vida acadêmica e científica, proporcionando meu crescimento pessoal e profissional.

Ao professor Dr. Wander Rogério Pavanelli que como co-orientador auxiliou na escrita do artigo, nas discussões e nas cobranças, contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional.

A professora Dra. Marla Karine Amarante que, como membro da banca de qualificação, contribuiu com importantes e enriquecedoras sugestões para a melhora do trabalho.

A professora Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe e ao Dr. José Maurício Sforcin, pela parceria nos estudos com a própolis na leishmaniose e por aceitarem participar da banca de defesa de dissertação.

Ao professor Dr. Luiz Antônio Custódio que sempre esteve disposto a tirar dúvidas, contribuir nos experimentos e a divertir.

Agradeço a meus pais e familiares, por todo incentivo a meus estudos, por todo amor e compreensão, por sempre me apoiarem de todas as formas possíveis e principalmente, por entenderem minha ausência. Aos meus sobrinhos, Gabriel, Isadora e Beatriz crianças que eu amo e que fazem minha vida mais feliz.

Agradeço de forma especial, ao meu amor e companheiro Kenji William Ruiz Miyazawa por todo carinho, ajuda, dedicação, respeito e amor. Por nunca poupar esforços em me ajudar. Por ter me ajudado na realização deste trabalho, ajudando nos experimentos, nas correções, ou por simplesmente me fazer companhia nos finais de semana e nos dias em que precisei ficar até mais tarde para fazer experimentos. Te amo muito, e posso afirmar que sem você eu não conseguiria.

Aos alunos de iniciação científica: Natalia, Allan, Graciele e Fernanda, que além de me ajudarem na realização deste trabalho, tornaram esta etapa menos árdua e mais divertida.

Agradeço à Milena Menegazzo Miranda, pela amizade e parceria durante o desenvolvimento deste trabalho, onde sempre se mostrou interessada em ajudar, aprender e a auxiliar nas discussões sobre resultados e experimentos. Agradeço também a sua mãe, Maria Alice Menegazzo pelo auxílio na tradução do artigo para o inglês.

Gostaria de agradecer em especial à aluna do doutorado Ana Carla Zarpelon, que me ajudou nas análises estatísticas e por dedicar parte do seu tempo livre para ler, estudar e discutir todos os possíveis detalhes das minhas análises.

A professora Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade que me auxiliou na padronização, processamento e análise das amostras observadas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Patologia Experimental pelos ensinamentos.

A professora Dra. Regina Mitsuka Breganó, chefe do Departamento de Patologia Experimental, que além de dividir o espaço físico do laboratório auxiliou no desenvolvimento dos experimentos emprestando materiais e equipamentos pessoais.

Ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental pelo incentivo à pesquisa e apoio institucional. À Capes, Fundação Araucária, e à PROPPG-UEL, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste estudo.

SILVA, SUELEN SANTOS. **Atividade Leishmanicida e Imunomoduladora da Própolis Brasileira**. 2012. 60p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana é considerada uma doença polimórfica que afeta a pele e mucosas e podem se manifestar clinicamente por formas cutânea localizada, cutânea difusa ou mucocutâneas. A aparência clínica e evolução da doença, são dependentes das espécies de *Leishmania* e da resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro. Isto pode ser demonstrado por estudos que descrevem os mecanismos da resposta imune e relataram que camundongos de linhagens diferentes podem ou não apresentar a doença após a infecção experimental. Estudos com *L. major* em camundongos indicam que linhagens geneticamente resistentes desenvolvem uma resposta dominada por fenótipo CD4 + (Th1), caracterizadas pela secreção de IFN- γ e TNF- α enquanto que em linhagens susceptíveis a resposta dominante era fenótipo (Th2), caracterizada por secreção de citocinas IL -4, IL-5 e IL-13. Os antimoniais pentavalentes são as drogas de primeira escolha no tratamento desta doença, no entanto, apresentam alta toxicidade, tratamento prolongado e nem sempre eficaz. Estudos têm demonstrado que a própolis, material resinoso produzido por abelhas, tem atividade imunomoduladora e antiparasitária. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de própolis na leishmaniose experimental *in vitro* e *in vivo*. A amostra de própolis utilizada pode interferir na proliferação e morfologia de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* tratados em concentrações de própolis variando de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Macrófagos peritoneais de BALB/c tratados com 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ própolis teve um maior número de amastigotas internalizados. Além disso, o pré-tratamento reduziu em 82% e 94,4%, o número de formas promastigotas recuperados a partir de células infectadas e pré-tratadas com 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Os animais pré-tratados *in vivo* com 10mg/kg de própolis e infectados com *L. (V.) braziliensis*, não apresentaram diferença na produção de IL-12, no entanto apresentaram um aumento da produção de TNF- α . Os nossos resultados mostraram que o extrato de própolis coletada em Botucatu/SP reduz a proliferação de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e apresenta ação imunomoduladora estimulando a produção de TNF- α por macrófagos.

Palavras chave: Leishmaniose Tegumentar Americana. Própolis. *Leishmania (V) braziliensis*.

SILVA, SUELEN SANTOS. **Leishmanicidal and immunomodulating activity of brazilian propolis**. 2012. 60p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina

ABSTRACT

The Cutaneous leishmaniasis is considered a polymorphic disease that affects the skin and mucous and may manifest clinically by forms: localized cutaneous, diffuse cutaneous or mucocutaneous. The clinical appearance and evolution of the disease are dependent upon the species of *Leishmania* and the immune response developed by the host. This can be demonstrated by studies describing the mechanisms of immune response and found that mice of different strains may or may not have the disease after experimental infection. Studies with *L. major* indicate that in mice genetically resistant, developed a response dominated by phenotype CD4 + (Th1), characterized by the secretion of IFN- γ while in susceptible mice the dominant response was phenotype (Th2) characterized by secretion of cytokines IL-4, IL-5 and IL-13. The pentavalent antimonials are the drugs of first choice in the treatment of this disease, which have high toxicity, prolonged treatment and not always effective. Studies have shown that propolis, the resinous material produced by bees, has immunomodulatory and antiparasitic activity. This study aimed to evaluate the effect of hydroalcoholic extract of propolis in experimental leishmaniasis *in vitro* and *in vivo*. The propolis sample used can interfere with proliferation and morphology of promastigotes form *L. (V.) braziliensis* treated with propolis in concentrations ranging from 5 to 100 $\mu\text{g/mL}$. Peritoneal macrophages from BALB/c treated with 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$ propolis had the highest number of amastigotes internalized. Furthermore, the pretreatment reduced by 82% and 94.4% the number of promastigotes recovered from infected cells and pretreated with 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$ respectively. Animals pretreated *in vivo* with 10mg/kg of propolis and infected with *L. (V.) braziliensis*, not present difference in IL-12 production, but can observe an increased of TNF- α production. Our results showed that the extract of green propolis collected in Botucatu/SP reduces the proliferation of *L. (V.) braziliensis* promastigotes and presented immunomodulatory action, increasing the production of TNF- α by macrophages.

Keywords: American tegumentar Leishmaniasis. Propolis. *Leishmania (V.) braziliensis*.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|---|
| BALB/c | Linhagem de Camundongos isogênicos |
| Células Th1 | Células T helper tipo 1 |
| Células Th2 | Células T helper tipo 2 |
| C57BL/6 | Linhagem de Camundongos isogênicos |
| CO ₂ | Gás carbônico |
| CR | Receptor de Complemento |
| Gp63 | Glicoproteína de 63 Kda expressa na superfície de promastigotas e amastigotas |
| GPI | Glicosilfosfatidilinositol |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| IL | Interleucina |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-8 | Interleucina 8 |
| INF- γ | Interferon gama |
| L. | Leishmania |
| LMC | Leishmaniose Mucocutânea |
| LPG | Lipofosfoglicano |
| LT | Leishmaniose Tegumentar |
| LTA | Leishmaniose Tegumentar Americana |
| LV | Leishmaniose Visceral |
| L.(V.) braziliensis | Leishmania (Viannia) braziliensis |
| MAC | Complexo de ataque à membrana |
| MTT | “3-[4,5-dimethylthiazol-2]-2,5-diphenyltetrazolium bromide” |
| NK | Célula Natural Killer |
| NO | Óxido nítrico |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PAMPs | Padrões moleculares associados à patógenos |
| PBMC | Células mononucleares de sangue periférico |
| TRLs | Receptores tipo toll |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa |
| WHO | Organização Mundial da Saúde |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 | Agente Etiológico e Ciclo Biológico | 10 |
| 1.2 | As Leishmanioses | 11 |
| 1.2.1 | Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana | 12 |
| 1.3 | Interação Parasito-Hospedeiro e Resposta Imune na LTA | 14 |
| 1.4 | Tratamento | 18 |
| 1.5 | Caracterização das Atividades da Própolis | 20 |
| | | |
| 2 | OBJETIVOS | 24 |
| 2.1 | Objetivo Geral | 24 |
| 2.2 | Objetivos Específicos | 24 |
| | | |
| 3 | REFERÊNCIAS | 25 |
| | | |
| 4 | PRODUÇÃO CIENTÍFICA | 34 |
| | Leishmanicidal and Immunomodulating Activity of Brazilian Green Propolis | 37 |
| | Abstract | 37 |
| | References | 52 |
| | | |
| | APÊNDICE- Aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal | 57 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agente Etiológico e Ciclo Biológico

Os agentes etiológicos das Leishmanioses são protozoários da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, que por muito tempo tiveram a sua identificação e classificação taxonômica baseadas nos aspectos clínicos apresentados pela doença. Com o tempo foram levados também em consideração parâmetros epidemiológicos, biológicos e distribuição geográfica, sendo necessária a criação de subespécies e subgêneros (MICHALICK, 2005).

Segundo Lainson e Shaw (1987) as principais espécies de *Leishmania* causadoras de Leishmaniose nas Américas (Novo Mundo) são classificadas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. O subgênero *Viannia* compreende nove espécies, dentre estas as encontradas parasitando o homem no Brasil: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) linderbegi*. Já o subgênero *Leishmania* compreende onze espécies, sendo que destas, as encontradas parasitando o homem no Brasil são: *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LAINSON, SHAW, 1987; BADARÓ *et al.*, 1986; MICHALICK, 2005).

Vale ressaltar que as espécies responsáveis pela forma cutânea (LC) e mucocutânea (LMC) são: *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. shawii*, *L. naiffi* enquanto que a espécie *L. chagasi* é responsável pela forma visceral (LAINSON, SHAW, 1987).

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam em seu ciclo de vida duas formas principais: as formas promastigota apresentam corpo alongado, medindo entre 10 a 20 µm e flagelo livre, é encontrada no trato digestivo do mosquito vetor, e a forma amastigota presente nas células fagocíticas do hospedeiro é ovóide, medindo 1,5-3,3 X 3,0-6,5 µm, não há flagelo livre (MICHALICK, 2005).

Em relação aos constituintes da membrana, os parasitos são revestidos por um denso glicocalix, constituído em grande parte por moléculas ligadas por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Essas moléculas

apresentam proteínas como a protease de superfície gp63 e proteofosfoglicanos (PPGs). O constituinte mais abundante é um fosfoglicano que se encontra ligado em GPI denominado lipofosfoglicano (LPG) (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

Em relação aos vetores, estes são insetos dípteros pertencentes a família Psychodidae, hematófagos classificados no gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados. No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e, *L. migonei* (BRASIL, 2007; AZEVEDO *et al.*, 1990). Os flebotomíneos ao se alimentarem do sangue de mamífero infectado, ingerem macrófagos contendo formas amastigotas. Durante a digestão do sangue, estas formas iniciam sua diferenciação para a forma promastigota procíclica, onde prendem-se ao epitélio intestinal do inseto, sofrem metaciclogênese, convertendo-se nas formas promastigotas metacíclicas, que são formas incapazes de se dividirem, porém infectantes. Estas formas migram para o aparelho bucal do inseto, e no momento do repasto sanguíneo o inseto inocula estas formas no hospedeiro mamífero (DESCOTEAUX, TURCO, 1999).

As formas infectantes ao serem internalizadas pelo macrófago diferenciam-se em amastigotas, formas capazes de se desenvolver e se multiplicar no vacúolo parasitóforo completando assim o ciclo de vida do parasita (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

1.2 As Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que acometem o homem, a doença pode apresentar diferentes formas clínicas, sendo duas as principais: leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar onde o aspecto clínico e a evolução da doença é dependente da espécie de *Leishmania* envolvida e da resposta imunológica do hospedeiro (GONTIJO; CARVALHO, 2003; WHO, 2011).

Considerada um importante problema de saúde pública no mundo, pois possui incidência anual de dois milhões de casos das diferentes formas clínicas, sendo 1,5 milhões de casos de Leishmaniose Tegumentar (LT) e 0,5 milhão de casos de Leishmaniose Visceral (LV) com aproximadamente 59 mil óbitos ao ano,

sendo a segunda doença parasitária com maiores taxas de morbidade e mortalidade (ALVAR *et al.*, 2006).

Dos casos notificados de LT, 90% da forma cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria; 90% da forma mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru, assim como, 90% dos casos de LV ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010). No Brasil, nos períodos de 1988 a 2009, a LTA apresentou média anual de 26.021 casos registrados com coeficiente de detecção médio de 14,1 casos por 100.000 habitantes. Ao longo desse período, observou-se uma tendência no crescimento da endemia, registrando os coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e 1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100.000 habitantes, respectivamente. No ano de 2010 foram registrados 21.981 casos de LTA no Brasil sendo que destes 228 casos eram do Paraná (SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2012).

Assim, estas são doenças consideradas negligenciadas e incluídas na relação de doenças prioritárias pela OMS, pois constitui um problema de saúde pública devido à alta incidência, ampla distribuição geográfica e presença de sequelas desfigurantes, destrutivas e incapacitantes para o homem (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

1.2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é considerada uma enfermidade polimórfica, que atinge a pele e as mucosas, agrupadas em diferentes formas clínicas. Assim, os parasitas ao invadir os macrófagos da pele, e células de Langerhans, principais células apresentadoras de antígeno localizadas no epitélio mucoso e camada epitelial, formam na maioria das vezes uma lesão limitada e única, porém, dependendo da espécie do protozoário e da resposta imune do paciente a doença pode apresentar um amplo espectro de severidade e uma série de formas clínicas. São elas: cutânea aguda ou localizada; mucocutânea; cutânea difusa e recidiva (GARNIER; CROFT, 2002).

A forma cutânea é caracterizada pela formação de úlceras únicas ou múltiplas na derme, resultando em úlceras leishmanióticas típicas, ou então,

evoluindo para formas vegetantes verrugosas. Na forma ulcerativa, o parasita está confinado à pele e a lesão pode apresentar variações de tamanho, formato e tempo de evolução. Essas lesões são caracterizadas pelo desenvolvimento de nódulos, geralmente no local da picada, que evoluem para lesões ulcerativas sem dor, cobertas por uma crosta aderente de exsudato seco. No caso das alterações epidermais, estas são decorrentes da resposta imunológica à infecção resultando em hiperplasia e engrossamento epidermal (GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

A forma cutânea difusa caracteriza-se pela formação de lesões difusas não ulceradas por toda a pele, envolvendo amplas áreas da pele, particularmente extremidades, onde numerosas erupções papulares ou nodulares não ulceradas podem ser observadas. Desta forma, esse tipo de lesão pode ser caracterizada por um curso crônico e progressivo durante toda a vida do paciente (ASHFORD, 2000).

Por outro lado, a forma cutâneo mucosa é considerada a forma mais agressiva podendo apresentar lesões destrutivas secundárias de curso crônico, envolvendo mucosas e cartilagens como: nariz, faringe, boca e laringe (BARRAL *et al.*, 1991; MODABBER, 1993). Estima-se que 3 a 5% dos casos de Leishmaniose Cutânea (LC) desenvolvam lesão mucosa, visto que a forma clássica de Leishmaniose Mucosa (LM) é secundária a lesão cutânea, por consequência de má resolução da doença ou até mesmo de terapia inadequada. Desta forma, acredita-se que a lesão mucosa é metastática e ocorra por disseminação hematogênica ou linfática com surgimento geralmente após a cura clínica da LC, com início insidioso e pouca sintomatologia. O agente etiológico causador da LM, em nosso país é a *L. (V.) braziliensis*, entretanto já foram citados casos na literatura atribuídos a *L. (L.) amazonenses* e *L. (V.) guyanensis* (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1998).

A maioria dos pacientes com LM apresentam cicatrizes que indicam que foram acometidos por LC anteriormente. Entretanto, existem casos em que o paciente apresenta concomitantemente lesões cutânea e mucosa. Todavia, pode-se observar ainda, alguns indivíduos com LM que não apresentam cicatriz sugestiva de LC. Supõe-se nestes casos que a lesão inicial tenha sido transitória (BRASIL, 2007).

Clinicamente, a LM se expressa por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores e em alguns casos, a lesão mucosa ocorre por extensão de lesão cutânea adjacente (chamada também por lesão contígua) e há também aqueles em que a lesão se inicia na semimucosa exposta, como o lábio

ou nariz. Geralmente a lesão é indolor e se inicia no septo nasal anterior, cartilaginoso, próxima ao introito nasal. Nesta forma clínica é possível haver perfuração ou até destruição do septo cartilaginoso, em lesões da mucosa nasal ou ainda, perfuração do palato mole quando a lesão se localiza na mucosa oral. Nas lesões crônicas e avançadas pode haver mutilações com perda parcial ou total do nariz, lábios, pálpebras, causando deformidades e consequente estigma social (PEARSON; SOUZA, 1996; BRASIL, 2007).

O acometimento de outras mucosas, que não as vias aéreas superiores, e o comprometimento ósseo são raras, ambos os casos geralmente ocorre por contiguidade com lesões cutâneas (MARSDEN, 1986).

1.3 Interação Parasito-Hospedeiro e Resposta Imune na LTA

Sabe-se que a interação parasito-hospedeiro é complexa. A resposta imunológica do hospedeiro é dependente da espécie de *Leishmania* envolvida e tem papel fundamental na defesa contra estes parasitas, além de constituir o principal impedimento para o estabelecimento da doença. No entanto, os protozoários do gênero *Leishmania* possuem mecanismos que lhes permitem escapar do sistema imune, facilitando o desenvolvimento dos processos infecciosos (MACHADO *et al.*, 2004).

Em linhas gerais, o estabelecimento da doença é marcado por várias etapas que passam desde o momento da infecção, até a manifestação clínica dos sintomas. Inicialmente, quando inoculadas na derme do hospedeiro, as formas promastigotas metacíclicas sofrem interação, neste microambiente, com proteínas do soro, saliva e fluidos digestivos do inseto. Posteriormente, as formas promastigotas interagem com o sistema complemento e receptores das células hospedeiras com finalidade de favorecer a fagocitose, de maneira que os mecanismos microbicidas não sejam ativados (GENARO; REIS, 2005).

Os parasitos do gênero *Leishmania*, em suas diferentes formas evolutivas, expressam em sua superfície uma variedade de moléculas importantes na relação parasito/hospedeiro, o que pode determinar a virulência, infecciosidade, sobrevivência e patogênese. Dentre elas as mais citadas são: lipofosfoglicano (LPG),

gp63 e carboidratos como fucose e manose (MOUGNEAU *et al.*, 1995). Destas moléculas, a LPG está presente na superfície celular de formas promastigotas de todas as espécies de *Leishmania* e possui ação importante na virulência do parasito assim como na sobrevivência deste parasita no hospedeiro vertebrado e invertebrado (MCCONVILLE, 1992). De igual forma, a metaloproteinase gp63 e manose presente nas lipofosfoglicanas da superfície de formas amastigotas e promastigotas também são determinantes na virulência do parasita (MCGWIRE *et al.*, 2002).

O mosquito vetor além da transmissão auxilia no estabelecimento das formas infectantes no hospedeiro. Isto porque, a saliva do inseto possui substâncias com atividade enzimática, devido à presença de hialuronidase, ação vasodilatadora, fatores de antiagregação plaquetária, e fatores estimulatórios da produção de prostaglandina, substâncias que atuam como fatores de virulência, opondo-se à resposta primária do hospedeiro e proporcionando sobrevida do parasita no hospedeiro mamífero (ALMEIDA *et al.*, 2003; CHARLAB *et al.*, 1999).

Uma vez na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, os parasitas de *Leishmania* spp. passam a interagir com a resposta imune do hospedeiro deixando-se captar pelas células com capacidade fagocitária. Esta interação ocorre entre receptores de membrana do macrófago com componentes da membrana do protozoário. Assim, os promastigotas metacíclicos ligam-se a algumas moléculas como os receptores do complemento (CR1 e 3) e a receptores tipo Toll (TLRs) 2 e 4 (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

TLRs são proteínas transmembrana que conferem especificidade à imunidade celular inata pelo reconhecimento de padrões específicos expressos por patógenos. Após o reconhecimento de antígenos específicos do agente patogênico (PAMPs), TLRs por meio de moléculas sinalizadoras (como por exemplo, MyD88) sinalizam a transcrição e síntese de citocinas pró-inflamatórias que iniciam a resposta imune adaptativa (ODA; KITANO, 2006; JANSSENS; BEYAERT, 2003).

Na leishmaniose, os estudos sugerem que estes protozoários podem modular ou interferir no reconhecimento de padrões mediados pelos receptores e podem utilizá-los como um mecanismo de escape da resposta imune do hospedeiro suprimindo as vias que desencadeiam respostas inflamatórias (de VEER *et al.*, 2003; NETEA *et al.*, 2004).

Em relação ao sistema complemento, as formas promastigotas metacíclicas são resistentes à lise por este sistema, devida em parte, a modificações estruturais no LPG. Após a ativação do complemento, frações como C_3 e C_{3b} não se ligam diretamente à membrana do parasito, devido a estrutura do LPG que dificulta a inserção do complexo C_{5b-9} ou a formação de C_5 convertase, o que impede ligação do complexo de ataque à membrana (MAC) e conseqüentemente a lise do protozoário. A gp63 também é capaz de prevenir a ação do complemento, através da clivagem de C_{3b} em C_{3bi} . Outros estudos têm relatado que as formas promastigotas podem interagir com outras proteínas do soro para ativar o complemento, facilitando a adesão à membrana do macrófago e, portanto, facilitando a fagocitose e aumentando a sobrevivência de amastigotas no interior dos macrófagos (HANDMAN, BULLEN, 2002; SPATH *et al.*, 2003; MICHALICK, 2005).

Durante o processo de endocitose do parasito, a célula hospedeira aumenta intensamente a sua atividade respiratória liberando neste processo óxido nítrico (NO), assim como outras espécies reativas de oxigênio (O^- , OH^- , H^+ e H_2O_2), produtos estes, conhecidos por serem altamente lesivos para membranas celulares dos patógenos. O LPG é capaz de proteger o protozoário contra a ação destes radicais. Além disso, esta molécula retarda a fusão do vacúolo que contém o parasito com o vacúolo lisossomal, permitindo que a forma promastigota transforme-se em amastigota. Quando os vacúolos se fundem, a gp63 atua degradando as enzimas lisossomais presente no vacúolo parasitóforo, permitindo que esta forma seja capaz de desenvolver e multiplicar-se no meio ácido encontrado no vacúolo digestivo (MICHALICK, 2005; MACHADO *et al.*, 2004).

O estabelecimento do parasita no hospedeiro tem como consequência a resposta imune, que corrobora para a forma de apresentação da doença. Esta interação complexa pode ser em partes explicada por estudos que identificam os fatores responsáveis pelos fenótipos de resistência e susceptibilidade à infecção por parasitas do gênero *Leishmania*. Os principais estudos envolvem os mecanismos de resposta imune nas leishmanioses e são realizados, normalmente, em modelos murinos (LAUNOIS *et al.*, 1997).

Camundongos geneticamente susceptíveis a infecção por *L. major*, como por exemplo BALB/c são capazes de desenvolver lesões cutâneas no sítio de inoculação. Já os camundongos resistentes a infecção por *L. major* como por exemplo: C57BL/6 parecem curar-se rapidamente, graças a uma forte resposta

imune celular, e mostram-se resistentes a novas reinfecções. Sabe-se que a resistência é conferida por células Th1, enquanto que a susceptibilidade é conferida por células Th2 (LOCKSLEY *et al.*, 1987; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

O tipo de resposta observada nesse modelo está associado à produção de IL-4 em camundongos susceptíveis e de IFN- γ em camundongos resistentes, em infecções com *L. major* (HEINZEL *et al.*, 1989).

Em humanos, a resposta imune à infecção por *Leishmania* não é tão bem caracterizada como a resposta em camundongos, em virtude de sua complexidade e o envolvimento de citocinas, de moléculas co-estimulatórias, assim como da saliva do flebotomíneo, dificultando o entendimento de como ocorre a resposta imunológica por parte do hospedeiro. No entanto, os estudos sugerem que em todas as formas clínicas da LTA, a resposta imune é dependente de células T e, de maneira geral, se aceita que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania* está relacionada com o nível de expansão de células Th1 e Th2 (PIRMEZ *et al.*, 1993; BACELLAR *et al.*, 2002).

Experimentos *in vitro* com células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de indivíduos com LC e LM estimuladas com antígeno de *Leishmania* produzem grande quantidade de IFN- γ , IL-2 e TNF- α , e pouco IL-10. Como habitualmente o sistema imune não consegue destruir completamente as Leishmânias, essa forte resposta Th1 termina por levar a ocorrência de uma reação inflamatória muito intensa que conseqüentemente leva a um dano tecidual, resultando no aparecimento de úlceras na pele e na mucosa. Tem participação importante nesse dano tecidual a produção acentuada de TNF- α e produção de óxido nítrico (NO) (PIRMEZ *et al.*, 1993; LESSA *et al.*, 2001).

Isto confirma o fato de que na maioria dos casos, pacientes com a forma cutânea localizada desenvolvem uma resposta do tipo Th1 no nível das lesões. Já nas lesões mucocutâneas, que constituem uma forma crônica associada à destruição de mucosas, a resposta caracteriza-se por uma mistura de polarização de resposta do tipo Th1 e Th2, enquanto que em pacientes com a forma difusa exibem uma resposta quase exclusivamente do tipo Th2 (CÁCERES-DITTMAR *et al.*, 1993; PIRMEZ *et al.*, 1993).

Assim, a resposta imune celular é variável conforme o quadro clínico, estando presente nos pacientes acometidos pela forma cutânea, exacerbada nos casos de lesões mucosas e usualmente suprimida nos casos de leishmaniose

difusa. Já a resposta imune humoral normalmente está presente em todos os tipos de manifestações clínicas. Sendo que os níveis de anticorpos observados na forma difusa são elevados, já nas formas cutânea e cutâneo-mucosa os níveis são baixos ou discretamente aumentados quando há acometimento de mucosas (GENARO; REIS, 2005).

1.4 Tratamento

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento das Leishmanioses têm sido desde 1912 até hoje os antimoniais pentavalentes (Sb5+). Naquela época a sua forma era trivalente (antimônio trivalente – Sb3+), o chamado tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio), resultando em sucesso, visto que 90% dos casos evoluíam para o óbito por não haver nenhum tipo de tratamento era utilizado (BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).

No entanto, esta formulação apresentava toxicidade e difícil administração. Em 1937, Smith introduziu a utilização do estibogluconato de sódio (Pentostan®, um medicamento derivado do ácido estibônico, em que o antimônio se apresentava na forma pentavalente, Sb5+). Esta nova formulação, trouxe redução de alguns efeitos colaterais e da toxicidade em relação tártaro emético (SUNDAR; OLLIARO, 2007).

Atualmente no Brasil, o fármaco utilizado é o antimoniatto de N-metil-glucamina, um antimonial pentavalente (Glucantime®). O mecanismo de ação destes compostos é a inibição das enzimas da via glicolítica e da β -oxidação em amastigotas, mas sendo um metal pesado, acredita-se que interfira em outras vias metabólicas da *Leishmania*, bem como com algumas vias do hospedeiro (HERERWALDT, 1999; DAVISON, 1998).

O tratamento das leishmanioses é difícil devido à instalação intramacrofágica da forma infectiva. Tal localização do parasita é importante para a susceptibilidade quimioterápica, que é também influenciada pela presença de transportadores mediadores do influxo e do efluxo de drogas para as células (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Além das dificuldades de administração, os antimoniais pentavalentes apresentam importantes efeitos colaterais que incluem mialgia,

artralgia, aumento sérico das enzimas hepáticas, pancreatite, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias, pancitopenia, insuficiência renal reversível e cardiotoxicidade. Existem relatos de a cura clínica não ser acompanhada de cura parasitológica, pois têm sido observados parasitos na cicatriz de indivíduos após tratamento (LUCIMI *et al.*, 1990).

Outros fármacos como anfotericina B, pentamidina, miltefosine e a paramomicina têm sido usados como alternativas nos casos de resistência aos antimoniais, mas não possuem um índice terapêutico tão favorável e também apresentam importantes reações adversas (BRAY *et al.*, 2003; BERMAN, 2006).

A diversidade de espécies de *Leishmania* no Brasil configura quadros clínicos variados, com respostas terapêuticas diversas. Além disso, a desnutrição e infecção paralela com doenças como a malária, pneumonia e AIDS aumentam as taxas de mortalidade dessa enfermidade (PAREDES *et al.*, 2003).

Muito se tem feito no intuito de desenvolver uma vacina efetiva para a doença, onde diversos antígenos têm sido identificados e caracterizados como potencialmente eficazes, porém até o momento nenhuma vacina totalmente efetiva foi produzida (COLER; REED, 2005).

Apesar das estratégias e esforços para a utilização de inseticidas, proteção individual, eliminação de animais domésticos infectados, detecção e o tratamento precoce de casos da doença em humanos, ainda encontra-se dificuldades no controle do doença (SUNDAR; OLLIARO, 2007).

A diversidade biológica dos parasitos; à existência de muitas espécies de vetores e de mamíferos que podem atuar como fontes de infecção os fatores sócio-econômicos das populações afetadas; às diferentes formas clínicas da doença, incluindo aquelas formas graves e resistentes à quimioterapia; a toxicidade para o hospedeiro e, ainda, à inexistência de uma vacina eficaz estão entre os problemas mais citados no controle desta enfermidade (DESJEUX.; ALVAR, 2003; SUNDAR; OLLIARO, 2007).

Desta forma, o tratamento da LTA representa um grande desafio. A recidiva, a falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos e a resistência ao tratamento são fatores que motivam a busca de uma droga alternativa, considerando que o tratamento é de grande valia para o controle da doença devido às dificuldades de prevenção atual e à complexidade da epidemiologia da doença (FALQUETO; SESSA, 2005).

1.5 Caracterização das Atividades da Própolis

A própolis é um produto natural, elaborada por abelhas, através da coleta de flores, pólen, brotos e exsudatos de plantas que acrescido de secreções salivares, ceras e produto resultante da digestão do pólen dão origem a própolis. Esta substância resinosa é usada nas colmeias como agente esterilizante, em vedação das paredes, proteção, além de ajudar na termorregulação (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002).

Os diferentes extratos de própolis possuem coloração e consistência variada dependente da espécie de planta visitada, espécie de abelha, época de coleta e substância utilizada para sua extração (WATSON *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2003). Assim, a composição química da própolis é dependente da biodiversidade de cada região visitada pelas abelhas e geralmente podem ser identificados compostos biologicamente ativos como os flavonóides. Geralmente, em sua contituição são encontrados 50-60% de resinas e bálsamos aromáticos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais e 5% de grãos de pólen. Podem estar presentes ainda, micro-elementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês, magnésio, silício, titânio, bromo, zinco e vitaminas B1, B2, B6, C e E (GHISALBERTI, 1979).

A classificação da própolis é realizada de acordo com o perfil químico obtido pelas técnicas de espectrofotometria de absorção na região UV-visível, Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), além das atividades antimicrobianas e antioxidantes. Assim, em um estudo para a classificação de extratos de própolis produzidas no Brasil, alguns autores verificaram diferenças qualitativas e quantitativas na composição química e atividades biológicas das própolis testadas de acordo com a região coletada. Neste estudo, a própolis brasileira foi classificada em 12 tipos principais, sendo que os tipos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana foram os originários da região sul, região nordeste e região sudeste (DAUGSCH *et al.*, 2008).

No Brasil, o tipo de própolis mais comercializado é conhecido como "própolis verde", derivado de ápices de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae, planta conhecida popularmente por alecrim), contendo predominantemente prenilados fenilpropanóides (por exemplo, Artepillin C), ácidos clorogênico, benzóico e

triterpenóides, sendo geralmente obtidas nas regiões sul e sudeste (SALATINO *et al.*, 2005).

Muitos autores têm relatado em estudos *in vitro* a atividade da própolis frente diferentes microorganismos, como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Thyphimurium*, *Candida albicans*, *Trypanosoma cruzi* e *Giardia duodenalis* (HIGASHI; CASTRO, 1994; MARCUCCI *et al.*, 2001; MIORIN *et al.*, 2003; UZEL *et al.*, 2005; DANTAS *et al.*, 2006; FREITAS *et al.* 2006).

As principais atividades biológicas citadas na literatura incluem atividades antibacteriana (SFORCIN *et al.*, 2000), antiviral (VYNOGRAD *et al.*, 2000), anti-inflamatória (KHAYYAL *et al.*, 2003) e imunomodulatória (SFORCIN *et al.* 2002; SÁ-NUNES *et al.*, 2003).

Estudos tem evidenciado a ação da própolis na resposta imune. A imunomodulação exercida pela própolis pode estar associada tanto com a estimulação quanto com a supressão de determinados eventos da resposta imune. De forma geral, os estudos apontam a ação da própolis sobre macrófagos peritoneais murinos, aumentando sua atividade microbicida, ação sobre a atividade lítica das células natural killer em células tumorais, e ação sobre a produção de anticorpos. Já os efeitos inibitórios da própolis sobre a proliferação de linfócitos podem estar associados à sua propriedade anti-inflamatória (SFORCIN, 2007).

A ação da própolis sobre os macrófagos resulta em aumento da capacidade fagocítica (ORSI *et al.*, 2000), estimulação da secreção de citocinas, tais como TNF- α , além de melhorar a ação microbicida (DIMOV *et al.*, 1992; IVANOVSKA *et al.*, 1995 ; ORSI *et al.*, 2000; KHAYYAL *et al.*, 2003).

SCHELLER e colaboradores (1988) verificaram que a própolis estimula a formação de anticorpos por células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com hemácias de carneiro. Para verificar o efeito deste apiterápico sobre a ativação de células natural killer (NK) contra células tumorais, pesquisadores verificaram que a administração de própolis em ratos, durante três dias, induziu o aumento na atividade lítica de células NK, quando comparada com o do grupo controle (SFORCIN *et al.*, 2002). O tratamento com própolis durante três dias também induziu aumento na produção de anticorpos em ratos imunizados com albumina sérica bovina (SFORCIN *et al.*, 2005). Estes achados reforçam a afirmação previa de SCHELLER e colaboradores (1988), os quais sugeriram que este apiterápico atua sobre o sistema imune em curto prazo, após sua administração, e

que a atividade imunoestimulante da própolis pode estar associada com a ativação de macrófagos e aumento de sua capacidade fagocítica.

Os efeitos leishmanicida da própolis podem ser evidenciados em estudos recentes que demonstraram que amostras de quatro tipos de própolis brasileira foram efetivas em reduzir a proliferação de amastigotas, resultados estes obtidos em infecções *in vitro* de macrófagos infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (AYRES *et al.* 2007). De igual forma, OZBILGE e colaboradores (2010) verificaram que a própolis da Turquia possui efeito leishmanicida sob formas promastigotas de *Leishmania tropica*. Estes dados corroboram com outros trabalhos que demonstram a ação da própolis em formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*, assim como na infecção experimental com camundongos (MACHADO; LEON; CASTRO, 2007; PONTIN *et al.*, 2008).

Alguns estudos tem relatado a capacidade da própolis induzir *in vivo* a produção de TNF- α , IL-6 e IL-8, sendo estas citocinas importantes em infecções intracelulares como a leishmaniose (DING *et al.*, 1988; DRAPIER *et al.*, 1988).

Orsi *et al.*(2000) verificou em seu trabalho que a produção de NO é inibida em macrófagos pré-tratados com própolis verde enquanto que a produção de H₂O₂ foi estimulada pelo tratamento.

Paralelamente, alguns estudos tem relatado também a ação de extratos de própolis na cicatrização de lesões subcutâneas induzidas em modelos animais evidenciando a reparação tecidual, neo-formação vascular, seguida de rápida regeneração do tecido. Assim, foi demonstrado que o uso da própolis em feridas diminuiu o tempo de cicatrização, acelerou o processo de regeneração tissular além de oferecer recuperação dos tecidos lesionados por sua ação antimicrobiana e anti-inflamatória (PERUCHI *et al.*, 2001; BERNARDO *et al.*, 1990).

Torna-se válido ressaltar que, a análise dos resultados descritos nos estudos que abordam a influência da própolis sobre o sistema imunológico ou infecções muitas vezes são avaliados por diferentes períodos, diferentes métodos além de serem realizados com diferentes amostras de própolis. Assim, devem ser levadas em consideração perguntas específicas e hipóteses elaboradas em cada trabalho, assim como a interpretação dos resultados devem ser em função do modelo proposto e das diversidades química apresentada por cada amostra de própolis (FISCHER *et al.*, 2008).

Neste contexto, o presente trabalho apresenta resultados referentes à ação leishmanicida da própolis coletada em Botucatu/SP. Utilizou-se um modelo de pré-tratamento *in vivo* e após a coleta das células a infecção foi realizada *in vitro* com formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Desta forma, pode-se verificar a ação imunomoduladora e leishmanicida desta amostra de própolis brasileira.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do extrato de própolis brasileira na Leishmaniose experimental.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a atividade da própolis brasileira sobre formas promastigotas de *L. braziliensis in vitro* por meio de curva de crescimento e microscopia eletrônica de varredura;

Verificar a porcentagem de macrófagos, residentes de BALB/c, infectados com *L.(V.) braziliensis* frente ao pré-tratamento com própolis brasileira;

Verificar a média de amastigotas por macrófagos residentes de BALB/c, infectados com *L.(V.) braziliensis* frente ao pré-tratamento com própolis brasileira;

Avaliar a ação do pré-tratamento com a própolis brasileira na produção de IL-12 e TNF- α em infecções com *L.(V.) braziliensis* em protocolos *in vivo*.

3 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. C., V. VILHENA, A. BARRAL, AND M. BARRAL-NETTO. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98:861-870. 2003.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, London, v. 22, p. 552-557, 2006.

AMARANTE, M. K., WATANABE, M. A. E., CONCHON-COSTA, I., FIORI, L. L., ODA, J. M. M., BÚFALO, M. C., SFORCIN, J. M. The effect of propolis on CCL5 and IFN-g expression by peripheral blood mononuclear cells from leishmaniasis patients. Royal Pharmaceutical Society, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 64, pp. 154–160 . 2011.

ASHFORD, R.W..The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*. 30, 1269–1281. 2000.

AWASTHI, A., R. K. MATHUR, B. SAHA. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal of Medical Research*. 119:238-258. 2004.

AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 2, 215-220. 2007.

AZEVEDO, A. C. R. et al. Natural infections of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) by *Leishmania* of the *Braziliensis* Complex in Baturite, Ceara State, Northeast Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 85, p. 251-257, 1990.

BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; JESUS, A. R.; DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J.; CARVALHO, E. M.. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity*. 70 (12):6734-40, 2002.

BADARÓ, R., JONES, T. C., LORENÇO, R., CERF, B. J., SAMPAIO, D., CARVALHO, E. M., ROCHA, H., TEIXEIRA, R., JOHNSON jr., W. D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *The Journal of Infectious Diseases* 154: 639-649. 1986.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; JESUS, A. R.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-

NETTO, M.; CARVALHO, E. M.. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. ***The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene***. 44(5):536-46. 1991.

BERMAN, J. D.; Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. ***The Indian Journal of Medical Research***. 123, 289. 2006.

BERNARDO, C.L.E, SOUZA, I.A.F., COLAVITTI, C., GARCIA C. Própolis: cicatrizante e antibiótico natural. ***Revista Brasileira de Enfermagem***. ;43(1/4):101-6. 1990.

BEZERRA, R. J. S., LEON, L., GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. ***Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas***. vol. 40, n. 2, abr./jun., 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007.

BRAY, P. G.; BARRTE, M. P.; WARD, S. A.; KONING, H. P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. ***Trends in Parasitology***. 19, 232. 2003.

CÁCERES-DITTMAR G, TAPIA FJ, SÁNCHEZ MA, YAMAMURA M, UYEMURA K, MODLIN RL, BLOOM BR, CONVIT J. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. ***Clinical and Experimental Immunology***. 91: 500-505, 1993.

CHARLAB, R., J. G. VALENZUELA, E. D. ROWTON, AND J. M. RIBEIRO. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***. 96:15155–15160. 1999

CHEN, C. N.; WU, C. L.; SHY, H. S.; LIN, J.K.; Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. ***Journal of Natural Products***. 66, 503. 2003

COLER, R.N.; REED, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. ***Trends in Parasitology***. v.21,n.5,p.244-249,2005.

CUNHA, L. C., ALVES, L. D. S., SANTANA, L. C. L. R., NUNES, G. B. L., NETO, P. J. R. A própolis no combate a tripanossomatídeos de importância médica: uma

perspectiva terapêutica para doença de chagas e leishmaniose. **Revista de Patologia Tropical**. Vol. 40 (2): 105-124. abr.-jun. 2011.

DANTAS, A.P.; SALOMÃO, K.; BARBOSA H.S.; DE CASTRO S.L. The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** n.101, 207-211. 2006.

DAUGSCH, A., MORAES, C.S., FORT, P., PARK, Y.K. Brazilian Red Propolis – Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence-based complementary and Alternative Medicine** 5: 435–441, 2008.

DAVISON, R. N. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. **Drugs**, 56, 1009. 1998.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in leishmania infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1455, p. 341–352, 1999.

DESJEUX, P.; ALVAR, J.. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 2003, 97, 4.

DE VEER, M. J., CURTIS, J. M., BALDWIN, T. M., DIDONATO, J. A., SEXTON, A., MCCONVILLE, M. J., HANDMAN, E., SCHOFIELD, L. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major* possible role for lipophosphoglycan and toll-like receptor 2 signaling. **European Journal of Immunology**. 33: 2822-31. 2003.

DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivate. **Vaccine**. v.10, n.12, p.817-823, 1992.

DING, A.H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent. **Journal of Immunology**. v.141, p.2407-2412, 1988.

DRAPIER, J.C.; WIETZERBIN, J.B. Interferon-gama and tumor necrosis factor induce the L-arginine dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **European Journal of Immunology**. v.18, p.1587-1592, 1988.

FALQUETO, A.; SESSA, P.A. Leishmaniose tegumentar americana. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*. (3a Ed). São Paulo: **Atheneu**, p.1543-1557, 2005.

FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T. IMUNOMODULAÇÃO PELA PRÓPOLIS. *Arquivos do Instituto Biológico*. São Paulo, v.75, n.2, p.247-253, abr./jun., 2008.

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

GARNIER, T.; CROFT, S. L. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Current Opinion in Investigational Drugs*, v. 3, n. 4. 2002.

GENARO, O.; REIS, A. B. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D.P. et al. Parasitologia Humana. São Paulo: **Atheneu**, p. 47-66. 2005.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: A review. *Bee World* 60 (2): 59-84. 1979.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R.. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36(1):71-80, jan-fev. 2003.

GONZÁLEZ, U. et al. Interventions for OldWorld cutaneous leishmaniasis. Geneva: **JohnWiley & Sons**, Ltd. 2008.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. Interaction of Leishmania with the host macrophages. *Trends in Parasitology*. 18, 332-334. 2002.

HEINZEL FP, SADICK MD, HOLADAY , BJ, COFFMAN RL, LOCKSLEY RM. Reciprocal expression of IFN- γ or IL-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expression of distinct helper T cell subsets. *The Journal of Experimental Medicine* 169: 59-72. 1989.

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

HIGASHI, K.O.; DE CASTRO, S.L. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. *Journal of Ethnopharmacology*. n 43, 149-155. 1994.

IVANOVSKA, N.D.; DIMOV, V.B.; PAVLOVA, S.; BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivate. *Journal of Ethnopharmacology*, v.47, p.135-143. 1995.

JANSSENS, S., AND R. BEYAERT. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clinical Microbiology and Infection*. Rev. 16:637-646. 2003.

KHAYYAL, M.T.; EL-GHAZALY, M.A.; EL-KHATIB, A.S.; HATEM, A.M.; VRIES, P.J.F.; EL-SHAFEI, S.; KHATTAB, M.M. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. ***Fundamental & Clinical Pharmacology***, v.17, p.93-102. 2003.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. : Evolution, classification and geographical distribution. In: The leishmaniasis in biology and medicine. Ed. PETERSW, LILLICK-KENDRICK R. vol. 1, cap.7, pp1-120. ***Academic Press***, London, England. 1987.

LAUNOIS, P., MAILLARD, I., PINGEL, S., SWIHART, K. G., XENARIOS, I., ACHAORBEA, H., DIGGELMANN, H., LOCKSLEY, R. M., MACDONALD, H. R. AND LOUIS, J. A. IL-4 rapidly produced Vb4Va8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to Leishmania major in BALB/c mice. ***Immunity***. 6, 541-549. 1997.

LESSA HA, MACHADO P, LIMA F, CRUZ AA, BACELLAR, O.; GUERREIRO, J. CARVALHO, E. M. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. ***The American Journal Tropical Medicine and Hygiene***. 65:87-9. 2001.

LOCKSLEY, R.M., HEINZEL, F.P., SADICK, M.D., HOLADAY, B.S., GARDNER, K.D. JR. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. ***Annales de l'Institut Pasteur Immunology***. 138: 744-749. 1987.

LUCIMI, A.; ROBLEDO, S. B.; GAMA, V.; SARAVIA, N. G.; ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***. 1998, 42. 1990.

MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; CASTRO, S. L. Activity of Brazilian and Bulgarian própolis against different species of *Leishmania*, ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***. 102 (1), p. 73-77. 2007.

MACHADO, P. R. L.; ARAUJO, M. I. A. S.; CARVALHO, S. CARVALHO, E. M. Mecanismo de resposta Imune às infecções. ***Anais Brasileiro de Dermatologia***. Rio de Janeiro, 79(6):647-664, nov/dez. 2004.

MARCUCCI, M.C. FERRERES, F.; GARCIA-VIGUEIRA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. ***Journal of Ethnopharmacology***. n. 74, 105-112. 2001.

MARSDEN, P. Mucosal leishmaniasis ("Espundia" Escomel, 1911). ***Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene***, 80:859-875. 1986.

MCCONVILLE, L. M. J.; TURCO, J. S.; FERGUSON, A. J. M.; SACKS, D. L. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **The EMBO Journal** vol. 11 no. 10 pp.3593 – 3600. 1992.

MCGWIRE, B. S. O'CONNELL, W. A.; CHANG, K. P.; ENGMAN, D. M. Extracellular Release of the Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* Surface Metalloprotease, gp63, Is Independent of GPI Phospholipolysis. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**. Vol. 277, Edição N ° 11, de 15 de março, pp 8802-8809. 2002.

MICHALICK, M. S. M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D.P. *et al.* Parasitologia Humana. São Paulo: **Atheneu**,. p. 41-46. 2005.

MIORIN, P.L.; LEVY JUNIOR, N.C.; CUSTODIO, A.R.; BRETZ, W.A.; MARCUCCI, M.C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**. n.95, 913-920. 2003.

MODABBER, F.. Leishmaniasis. In: Tropical Diseases Research Progress 1991-1992. **World Health Organization**. Geneve, 77-87. 1993.

MOUGNEAU, E.; ALTARE, F.; WAKIL, A. E.; ZHENG, S.; COPPOLA, T. WANG, Z. E.; WADMAN, N. R.; LOKSLEY, R. M., GLAICHENHAUS, N. Expression cloning of a protective *Leishmanis* antigen. **Science** 268, 563-566. 1995.

NETEA, M.G, VAN DER, G. C., VAN D.M.J.W., KULLBERG B.J.. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. **Journal of Leukocyte Biology**. 75: 749-755. 2004

ODA, K.;KITANO, H.. A comprehensive map of the Toll-like receptor signaling network. **Molecular Systems Biology**. 2:2006.0015. 2006.

OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M.; SOUZA, C. S.; FERNANDES, O.; PIRMEZ, C. Leishmaniasis Recidiva Cutis. In New World cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**. 37 (11):846-9. 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Control of the Leishmaniasis. WHO **Technical Reports Series**. p.1 -201. 2010.

ORSI, 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. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 6, n. 2, p. 205-219. 2000.

OZBILGE, H.; KAYA, E. G.; ALBAYRAK, S.; SILICI, S. Anti-leishmanial activities of ethanolic extract of Kayseri propolis. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 4 (7), pp. 556-560, 4 April. 2010.

PAREDES, R., J. MUNOZ, I. DIAZ, P. DOMINGO, M. GURGUI, B. CLOTET. Leishmaniasis in HIV infection. *Journal of Postgraduate Medicine*. 49:39-49. 2003.

PEARSON, R.D.; SOUZA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 22:1-13. 1996.

PEREIRA, A. DOS S.; SEIXAS, F. R. M. S.; DE AQUINO NETO, F. R. PRÓPOLIS: 100 ANOS DE PESQUISA E SUAS PERSPECTIVAS FUTURAS. *Química Nova*, 25, 321. 2002.

PERUCHI, C.M.S., SILVA, E.B., ANDRADE, R.A., FRANCO, S.L., RAMATHO, L.T.O. Efecto del propóleo en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en el dorso de ratones: estudio histológico. *Revista de la Facultad de Odontología*.19(2):23-34. 2001.

PIRMEZ C, YAMAMURA M, UYEMURA K, PAES-OLIVEIRA M, CONCEIÇÃO-SILVA F, MODLIN RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *The Journal of Clinical Investigation*. 91: 1390-1395. 1993.

PONTIN K, SILVA-FILHO AA, SANTOS FF, SILVA MLA, CUNHA WRA, NANAYAKKARA D, BASTOS JK, ALBUQUERQUE S. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitology Research*. 103: 487-492. 2008.

RODRIGUES, A. M.; HUEB, M.; SANTOS, T.A.R.R.; FONTES, C. J. F. Fatores Associados ao Insucesso do Tratamento da Leishmaniose Cutânea com Antimoniato de Meglumina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v.39,n.2. 2006.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-based complementary and Alternative Medicine*. 2:33-38. 2005.

SÁ-NUNES, A.; FACCIOLI, L.H.; SFORCIN, J.M. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. *Journal of Ethnopharmacology*. n. 87, 93-97. 2003.

SCHELLER, S., GADZA, G., PIETZ, G., GABRYS, J., SZUMLAS, J., ECKERT, L., SHANI, J. The ability of ethanol extract of propolis to stimulate plaque formation in

immunized mouse spleen cells. *Pharmacological Research Communications*, v. 20, p. 323-8. 1988.

SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. n. 113, 1-14. 2007.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES, J.R.A.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. n. 73, 243–249. 2000.

SFORCIN, J.M.; KANENO, R.; FUNARI, S.R.C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins* n. 8, 19–29. 2002.

SFORCIN, J.M.; ORSI, R.O.; BANKOVA, V. Effect of propolis some isolated compounds and its source plant on antibody production. *Journal of Ethnopharmacology*. v.98, n.3, p.301-305, 2005.

SINAN. Ministério da saúde. Portal da saúde. **Aspectos epidemiológicos da leishmaniose Tegumentar Americana.** disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31927. Acessado em 10/11/11.

SPATH, G. F.; GARRAWAY, L. A.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania* major infections in mammalian host. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 100, 9536-9541. 2003.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L.; Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 3, 733. 2007.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ONCAG, O.; COGULU, D.; GENÇAY, O.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, n 160, 189-195. 2005.

VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I.; SOSNOWSKI, Z. A comparative multicentre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine*, n. 7, 1–6. 2000.

WATSON, D.G.; PEYFOON, E.; ZHENG, L.; LU, D.; SEIDEL, V.; JOHNSTON, B.; PARKINSON, J. A.; FEARNLEY, J. Application of principal components analysis to

H-1-NMR data obtained from propolis samples of different geographical origin. *Phytochemical Analysis* 17:323–331. 2006.

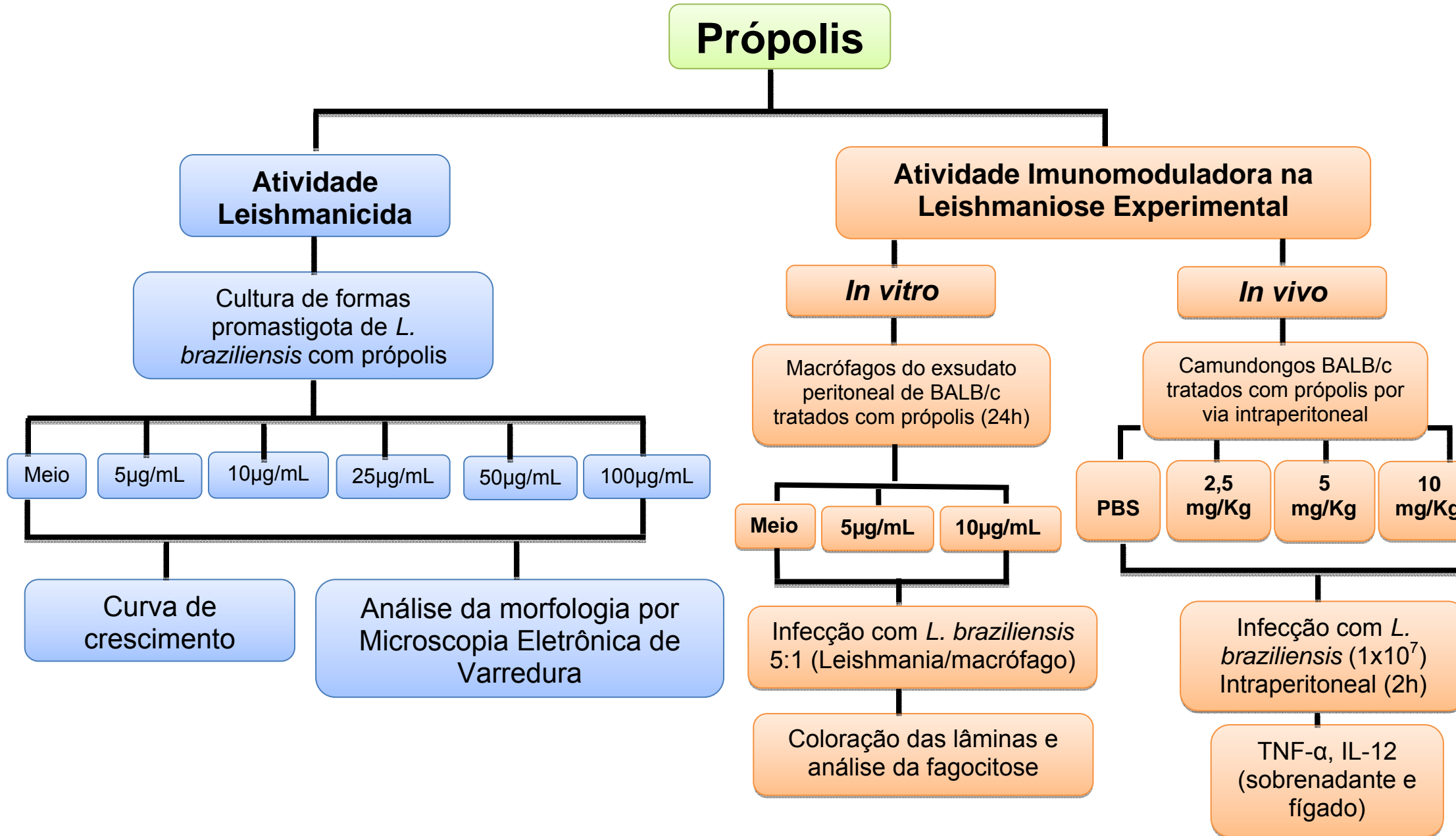
WHO. World Health Organization. Extraído de <http://www.who.int/topics/leishmaniasis>. Em 10/12/2011.

4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Leishmanicidal and immunomodulating activity of Brazilian propolis

Artigo a ser submetido à revista: *Journal of Ethnopharmacology*

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



Leishmanicidal and Immunomodulating Activity of Brazilian Green Propolis

Abstract

Studies have shown that propolis, resin produced by bees, presents antiparasitic and immunomodulatory activity. This study aimed to evaluate the effect of the hydroalcoholic extract of Brazilian green propolis in infected macrophages with promastigote forms of *Leishmania (Viannia) braziliensis* under *in vitro* and *in vivo* protocols. When the effect of green propolis was evaluated directly on the promastigote forms, it was observed that this bee product is able to interfere in the growth, as well as in the morphology of *L. (V.) braziliensis* treated with propolis concentrations ranging from 5 to 100µg/mL. When evaluated the action of propolis on *in vitro* pretreatment of BALB/c peritoneal macrophages, there was an increase in the percentage of the number of amastigotes by macrophages in concentrations of 5 and 10µg/mL. Moreover, the treatment was able to reduce 82% and 94.4% the amount of recovered promastigotes from infected cells pretreated with 5 and 10µg/mL respectively. In *in vivo* treatment it was not noted any difference on IL-12 level, but the TNF-α production increased in mice pretreated with 10mg/kg and infected for 2 hours with *L. (V.) braziliensis*. Our results show that green propolis extract reduces the proliferation of *L. (V.) braziliensis* promastigotes and has immunomodulatory action, increasing macrophage activation by TNF-α, which agrees with studies that show the action of propolis on macrophages activation and in promastigote and amastigote forms of some *Leishmania* species.

Keywords: American Tegumentar Leishmaniasis, *Leishmania braziliensis*, green propolis, Cytokines

INTRODUCTION

Leishmaniasis is a parasitosis caused by several species of the protozoan *Leishmania*. The severity of disease presented many variations, from cutaneous infections, mucosa, diffuse cutaneous and visceral infections. It has been found that both species of protozoa as well as the host immune response are factors that determine the clinical forms of this disease. [1, 2]

In fact, in murine experimental models of cutaneous leishmaniasis with *L. major*, it was observed that the resistance to leishmaniasis is associated with the predominant Th1 response, while the susceptibility of some strains (such as BALB/c) is assigned to a Th2 response. [3] Nevertheless, when evaluated the clinical outcome for injuries caused by *L. amazonensis* and *L. braziliensis* in inbred lines of mice, these do not present the same profile of susceptibility and resistance, differing from the proposed model by infections with *L. major*. [4]

During the past 35 years, experimental cutaneous infections of mice with *L. major* and more recently works using *L. braziliensis*, the main agent of cutaneous leishmaniasis in Brazil, have been used widely to elucidate all types of cytokines and effectors antileishmanial mechanism necessary for the control of parasites and consequently diseases progression. Species diversity of parasites, vectors, host immune response and difficulties in dealing with the available drugs are factors that drive scientific studies in experimental leishmaniasis to search more effective treatments. [3, 4, 5, 6]

The chemotherapy of leishmaniasis has been based on the use of pentavalent antimonial drugs. Other drugs, such as pentamidine and amphotericin B have been adopted as alternative drugs. However, these drugs presented severe side effects, including parasite resistance, and long periods of treatment. [7, 8, 9]

Thus, the discovery of new compounds with antileishmanial and immunomodulatory proprieties is essential for development of new approaches for leishmaniasis therapy. In this sense, some studies with phytotherapics have been conducted in order to propose alternatives for the treatment of many diseases. Propolis has been widely used in popular medical practice and has shown promising results against some protozoonoses. [10]

Many authors have reported *in vitro* studies of propolis activity against different microorganisms including some important human pathogens such as *Staphylococcus*

aureus, *Salmonella* Thyphimurium, *Candida albicans*, *Trypanosoma cruzi*, and *Giardia duodenalis*.^[11,12,13,14,15,16]

Several biological actions have been described, including antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, anti-carcinogenic, and immunomodulation activities.^[17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]

In leishmaniasis studies, results show that the propolis coming from different regions promoted the lysis in promastigote and amastigote forms of many *Leishmania* species. Besides these data, it is necessary to take into account that some studies have demonstrated the antimicrobial and healing actions of propolis on skin lesions. These results provide evidence that propolis is a promising source of natural compounds for the development of new chemotherapeutic agents for the treatment of ATL.^[10,24]

In since, the objective of this study was to evaluate the antileishmanial and immunomodulatory properties of green propolis treatment on experimental infection with *L. (V.) braziliensis*.

MATERIALS AND METHODS

Leishmania (V.) braziliensis

We used *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1987/M11272), in promastigote forms maintained in culture medium 199 (GIBCO[®] Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum-FBS (GIBCO[®] Invitrogen), 10% HEPES, 0.1% human urine, 0.1% L-glutamine, 10µg/mL penicillin and streptomycin (GIBCO[®] Invitrogen) and 10% sodium bicarbonate. The cell culture was maintained in an incubator-type B.O.D. at 25 ° C, in a flask of 25 cm² cell culture.

Green propolis extract

The green propolis was collected in the Beekeeping Section of the Lageado Farm, UNESP, Botucatu, SP, Brazil, from honey bees (*Apis mellifera* L.). For extraction, propolis was ground and it was prepared a solution of propolis 30% in alcohol 70%. After the solvent evaporation it was determined the actual concentration of propolis and conducted its analysis using gas-chromatography (GC), gas

chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and thin layer chromatography (TLC). The final concentration of the solvent in the experiments did not exceed 0.1% ethanol.^[25]

Animals

Male BALB/c mice weighing approximately 25-30g with age between 6 - 8 weeks old from the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, SP, Brazil, were used in this study. Mice were maintained under specific pathogen-free conditions and used for experimentation, according to protocols approved by the institutional Animal Care and received approval from the Ethics Committee for Animal Experimentation of the State University of Londrina, under registration No. 09/2011.

Cell proliferation kinetics

1×10^6 promastigote forms were treated with propolis at concentrations of 5, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ or with the diluent (0.1% ethanol) for control.^[26] The positive control was used 199 culture medium and the negative control, Glucantime[®] 250 $\mu\text{g/mL}$.

They were kept in B.O.D incubator at a temperature of 25° C for 7 days. It was held the count of promastigotes in a Neubauer chamber daily. For the analysis they were evaluated in periods of 24, 96 and 168 hours.

Scanning Electron Microscopy

The promastigotes in exponential growth phase were cultured with propolis at 5, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ concentrations by treatments performed in periods of 2 and 24 hours. 2×10^6 (Leishmania/mL) *L. braziliensis* were placed in sterile plastic tubes (Falcon) with 1 mL of 199 culture medium and propolis at different concentrations. Among the treatments it was set up the control containing only the culture medium and different species of promastigotes, as well as propolis solvent. The treatments remained in an environmental chamber at 25 ° C for 2 and 24 hours. They were centrifuged twice at 2500rpm for 10 minutes and the promastigotes were resuspended in 0.9% sterile saline solution at pH 7.0. After this step the

promastigotes were placed on glass coverslips covered with Poly-L-lysine (GIBCO®) and fixed with 2% glutaraldehyde in phosphate buffer 0.1M (pH 7.0), post-fixed with 2% osmium tetroxide. Dehydration was performed with a crescent series of ethanol (70%, 80%, 90% and 100%). The critical point was carried out with a *Critical point dryer* (PCD 030 - BAL-TEC) and mounted on stubs and recovered with 30nm gold using a *Stutter coater* (SCD 050 - BAL-TEC). The samples were analyzed using a FEI QUANTA 200 scanning electron microscope. Such procedures are performed at the laboratory of Electron Microscopy and Microanalysis at the University of Londrina.

Phagocytic assay- *in vitro*

Primary mice macrophages (5×10^5 /mL) were obtained from peritoneal washing by injection of 2mL of RPMI 1640 culture medium (GIBCO®), cultured on 24-well plate contained 13 mm diameter glass coverslips. The cells were pre-incubated with 200µL RPMI medium for 2 hours and after treated with propolis at 5 and 10µg/mL concentrations or only with RPMI culture medium (positive control) and incubated for 24 hours in BOD at 37 ° C in 5% CO₂. The doses of 5 and 10µg/mL were chosen for this test according to the study of Amarate, et al., (2011) that found these concentrations cell viability human PBMC treated with propolis sample remained above 50%.

After 24 hours of treatment with propolis the cells were co-incubated with 1×10^6 *L. braziliensis* promastigotes by 2 or 24 hours. After the infection period the cells were fixed with methanol and stained with Giemsa. The analysis was by optical microscopy with the increase of immersion to establish whether there was an increase of phagocytosis by cells treated with propolis.

Leishmanicidal activity

BALB/c peritoneal macrophage were cultured on 6-well plates at 37°C in 5% CO₂ and treated with 5 and 10µg/mL of propolis. After 24 hours of treatment, the macrophage cells (5×10^5 /mL) were infected with promastigotes forms (5:1) for 2 hours of infection. The culture was washed to remove extracellular parasites and incubated with 199 culture medium at 24°C. The quantification of rescued

promastigotes forms were established by counting chamber neubauer from 3 days post infection.

Phagocytic assay- *in vivo*

Groups of three mice received intraperitoneally propolis dose 2.5, 5 and 10 mg/kg or solvent only (ethanol 0.1%).

In a previous studies, was demonstrated that the treatment of peritoneal macrophages with the same concentrations of propolis samples was able to modulate modulating the production of nitric oxide and INF- γ . [36, 49]

After 24 hours the mice were infected intraperitoneally with 1×10^7 /mL promastigote forms of *Leishmania (V.) braziliensis*. The animals were sacrificed 2 hours after infection, and the exudate cells were collected by rinsing the peritoneal cavity with 2mL of RPMI medium and the cells were distributed on 6-well plates followed incubation for 1 hour at 37 °C in 5% of CO₂. The supernatant was collected and centrifuged at 2000 rpm at 4°C for 7 minutes and stored at -20°C for cytokine assay. The liver was removed, macerated, centrifuged and stored at -20°C for subsequent determination of cytokine.

Cytokine determinations

The supernatant of cells culture and liver homogenate treated for the phagocytic assays- *in vivo* were analyzed of TNF- α and IL-12 level by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to manufacturer's instructions (eBiosciences®,USA). The plate was read at 450 nm, using an ELISA plate reader (Thermo Plate - TP-Reader).

Statistical analyses

Data were analyzed using Prism Graph Pad statistical software (Graph-Pad Software, Inc., USA-500.288). Significant differences between treatments were determined by ANOVA, followed by Tukey test by multiple comparisons. Statistical significance was accepted when $P < 0, 05$.

RESULTS

Cell proliferation kinetics of *Leishmania (V.) braziliensis* treated with green propolis

To determine the effect of propolis during the cell proliferation, promastigotes forms (1×10^6) of *Leishmania (V.) braziliensis* were grown in several concentrations of propolis (5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for a week. The results obtained, according to **Figure 1**, show that the 24-hour treatment only with the dose of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presented significant difference when compared with control group. However, considering the time of 96 and 168 hours of incubation, it was observed significant differences between all concentrations tested with the control. Regarding the dose of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ it showed the same antiproliferative effect of Glucantime[®] at dose 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. It was found that the solvent (0.1% ethanol) that was used in propolis cannot interfere in the proliferation of promastigotes *L. (V.) braziliensis*.

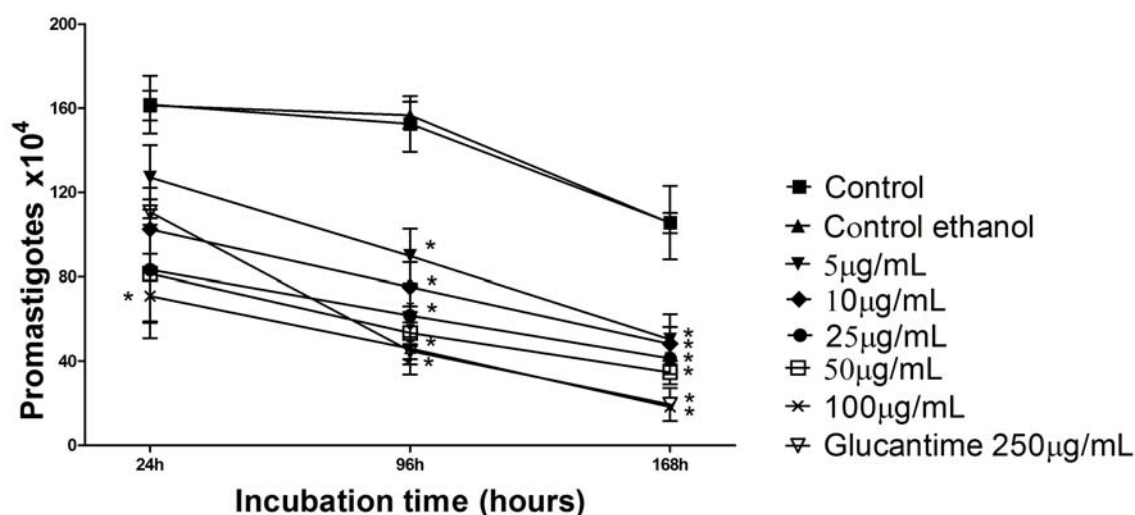


Figure 1- Kinetics proliferation of *L. (V.) braziliensis* promastigotes forms treated with of green propolis extract. Promastigotes forms (1×10^6) were treated with 5, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propolis concentration, or treated with glucantime[®]. The percentage of viable promastigote forms were determined after 24, 96 and 168 hours. The data shown represent the mean \pm SEM of results obtained on five independent experiments. * significant values in comparison to control ($p < 0,05$).

Scanning Electron Microscopy

The analyses of images obtained from *L. braziliensis* treated with propolis at concentrations of 5, 10, 25, 50 and 100µg/mL showed that the morphologic changes in the time of 2 hours are similar to those observed at 24 hours of incubation (data not shown). The alterations observed include loss of elongated shape and changes in the permeability membrane of treated parasites with all propolis concentration tested. It was also noted that increasing concentration resulted on major morphological changes on permeability of membrane (**Figure 2**). It was found that the propolis solvent (0.1% ethanol) cannot interfere on the morphology of promastigotes forms of *L.(V.) braziliensis*.

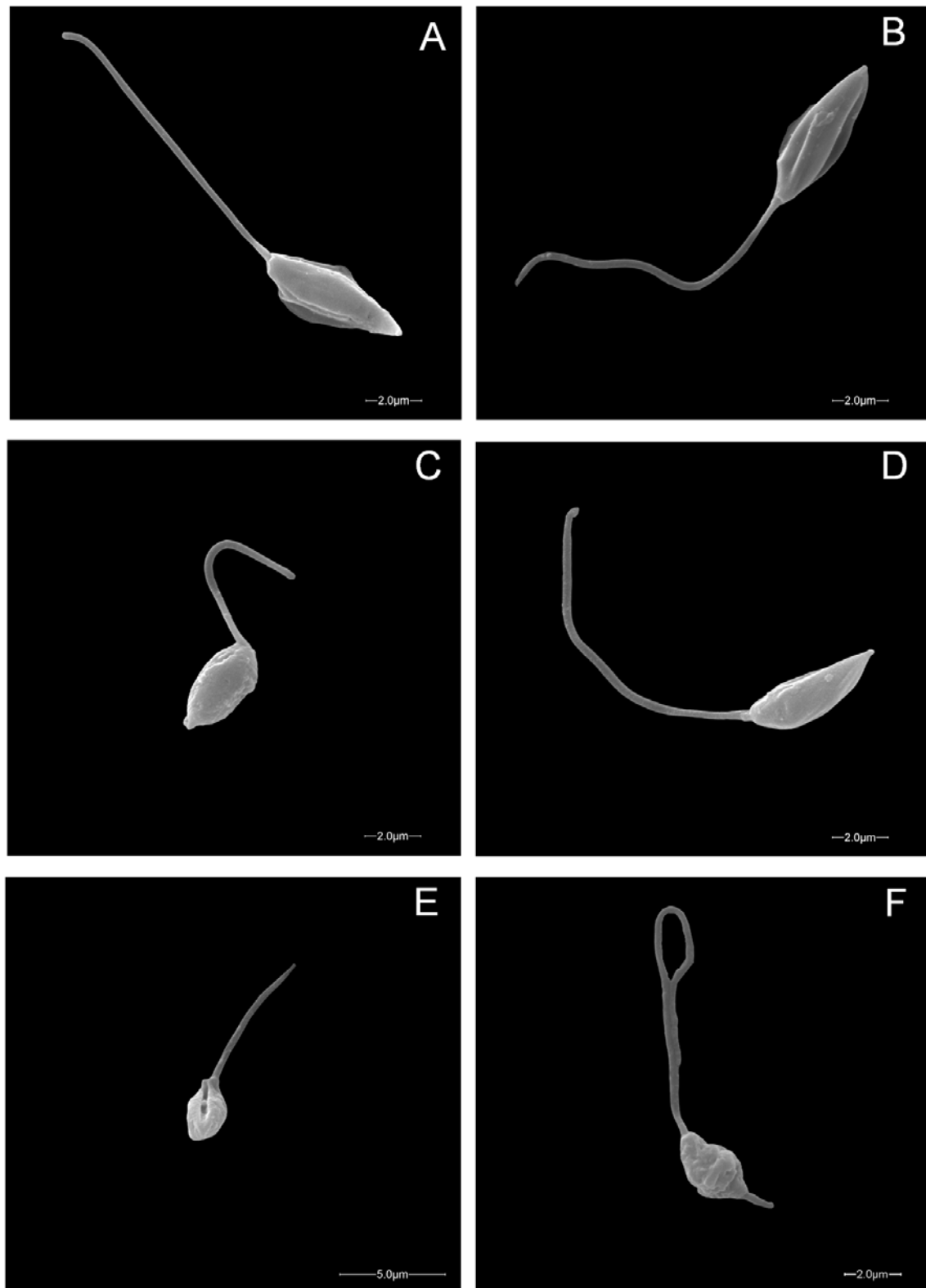


Figure 2- Scanning Electron Microscopy showing morphological changes in promastigotes forms of *L. (V.) braziliensis* treated with different concentrations of propolis by 24 hours at 16.000 magnification. **A:** control; **B:** 5µg/mL; **C:**10µg/mL; **D:**25µg/mL; **E:**50µg/mL;**F:** 100µg/mL.

Phagocytic assay- *in vitro*

Macrophage, the main cell involved on the immune response against *Leishmania*, was treated with propolis for analyzing the phagocytic activity. As shown in **Figure 4 A and C**, macrophage culture with propolis does not exhibit significant difference in the percentage of infected cells when compared with control. The mean of the amastigotes number per macrophage was significantly different when compared with control, with a 2-hour infection in 5 μ g/ mL concentration and with 24 hours of infection the cells treated with propolis in both concentrations of 5 and 10 μ g/mL.

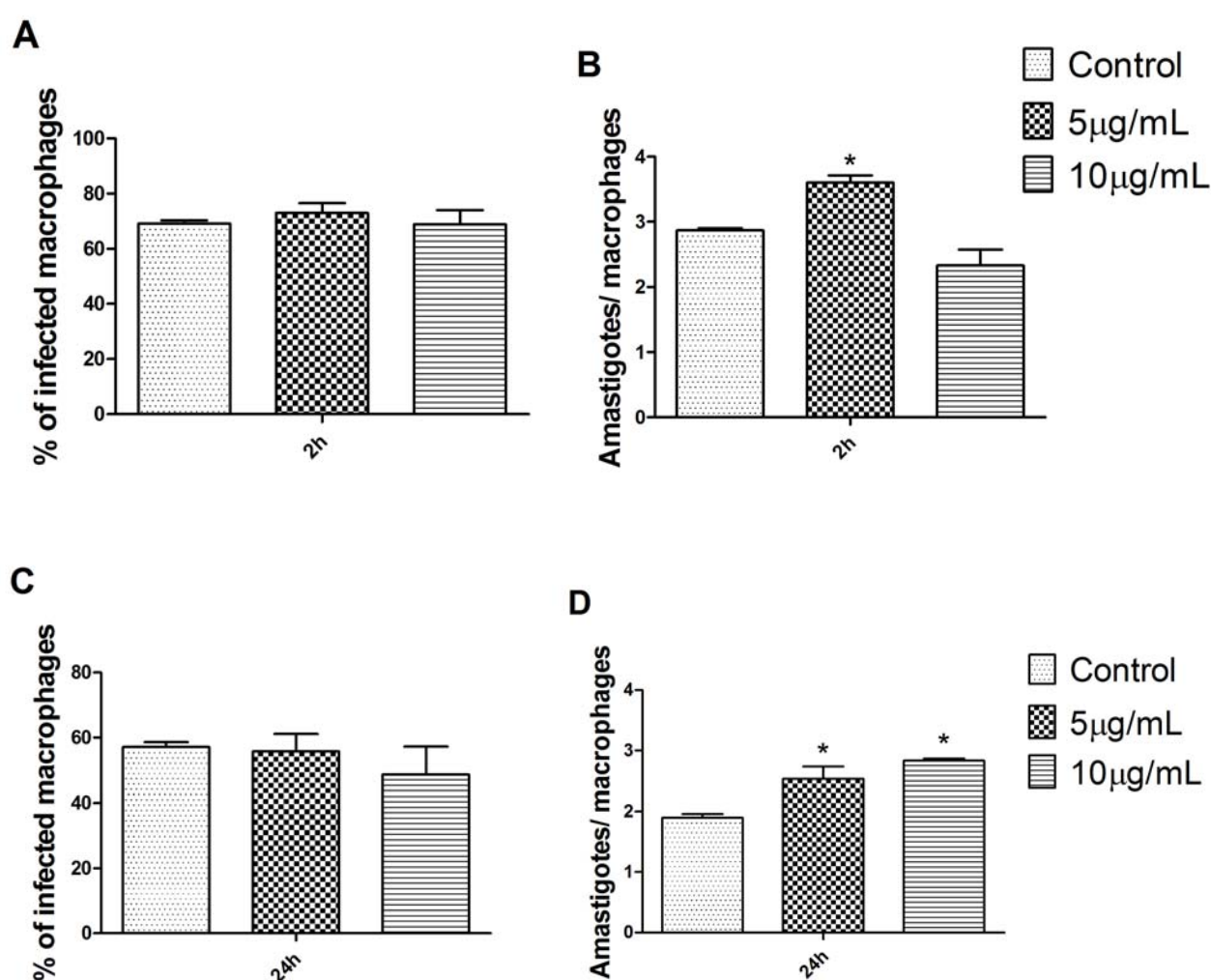


Figure 3- Green propolis extract on *in vitro* macrophage phagocytosis infected with *L. (V.) braziliensis* for 2 and 24 hours. A) Infected macrophages percentage on 2 hours infection B) number of intracellular amastigotes per macrophage on 2 hours infection. C) infected macrophages percentage on 24 hours infection. D) number of intracellular amastigotes per

macrophage on 24 hours infection. The data shown represent the mean \pm SEM of results obtained on three independent experiments. * significant values in comparison to control ($p < 0,05$).

Leishmanicidal activity in amastigote-macrophage

In an attempt to verify the capacity of propolis in inducing the activation of macrophages eliminating intracellular parasites, we observed on the third day post infection a significant reduction in the amount of recovered promastigotes from pretreated cells with 5 μ g/mL and 10 μ g/mL of propolis. Nevertheless, on the fifth day, the reduction was 82% in cells treated with 5 μ g/mL and 94.4% in cells treated with 10 μ g/mL of propolis (**Figure 5**).

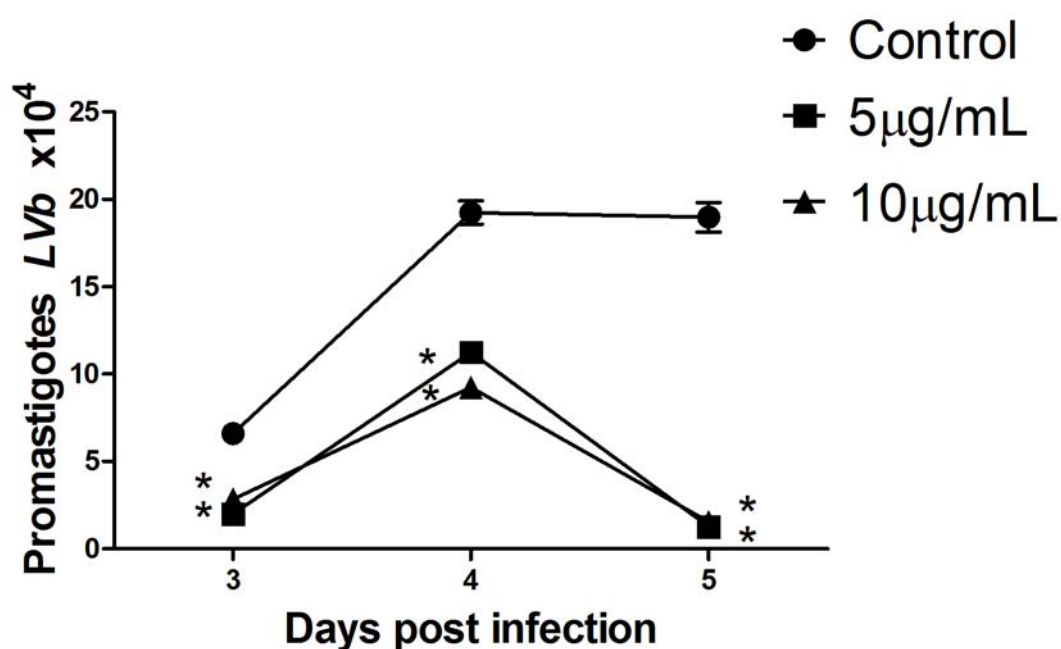


Figure 4- Effect of propolis pretreatment on macrophages infected with *L.(V.)braziliensis*. Kinetics of recovered promastigotes from infected macrophages. The data shown represent the mean \pm SEM of results obtained on three independent experiments. *significant values in comparison to control ($p < 0,05$).

Cytokine determinations

Several works have showed the importance of cytokines during the development of this parasitosis. Therefore, we determined the IL-12 and TNF- α

production in peritoneal exudates and liver homogenate of mice pretreated with different concentrations of propolis and infected with *L. (V.) braziliensis*.

The propolis treatment alone or with infection did not cause changes in IL-12 levels of concentration of peritoneal exudates and homogenate liver (**Figure 6 A and B**). The secretion of TNF- α increased in liver homogenate from mice treated with 10mg/kg post infection. (**Figure 6 D**).

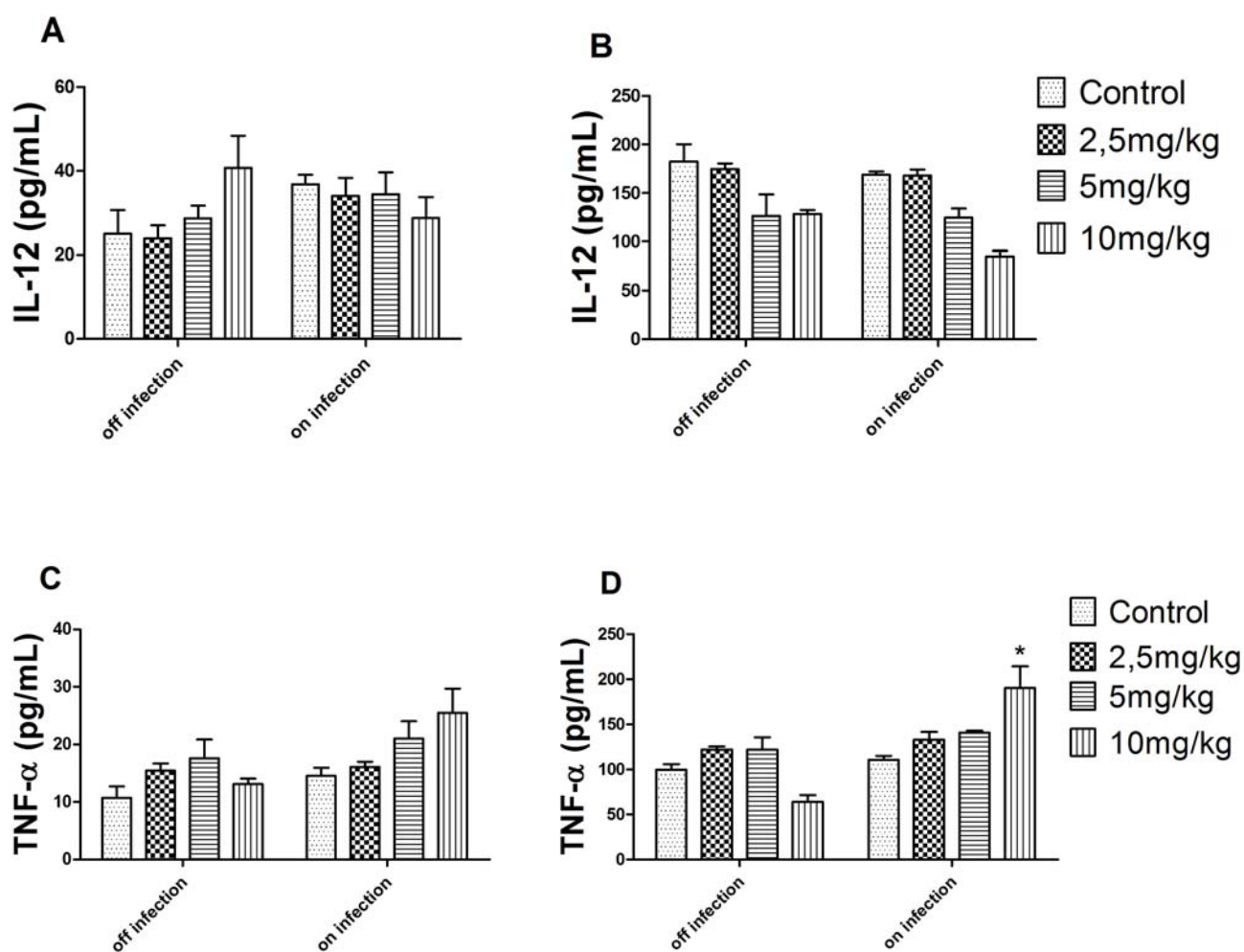


Figure 5- IL-12 and TNF- α production of BALB/c peritoneal exudate cells and liver homogenate pretreated with propolis in concentrations of 2.5, 5 and 10mg/kg and infected for 2 hours. The cytokines without infection were measured 24 hours after treatment and when infected were measured after 2 hours of infection A) IL-12 level from peritoneal exudate cells B) IL-12 level from liver homogenate; C) TNF- α level from peritoneal exudate cells D) TNF- α level from liver homogenate. The data shown represent the mean \pm SEM of results obtained on three independent experiments. *significant values in comparison to control (p<0,05)..

Discussion

Previous studies with different propolis extracts have shown their antiprotozoal activity.^[10,11,13] Many of these studies demonstrated the leishmanicidal action on both promastigotes and amastigotes forms of different *Leishmania* spp.^[10] However, it is worth noting that these results alone do not esclaescem the mechanism of action of propolis leishmanicidal agent, as they should be taken into account specific questions and hypotheses developed in each case and the results should be interpreted according to chemical diversity present in the propolis samples tested and the differences presented by leishmania species^[10,13,15,27]

The extract of green propolis used in our experiments exhibited leishmanicidal effect directly on the promastigotes forms of *L. (V.) braziliensis* (**Figure 1, 2 and 4**). Similarly, Machado *et al.* (2007) demonstrated the leishmanicidal effect of one type of Brazilian propolis (Nova Friburgo-RJ) and two types of propolis from Bulgaria on promastigotes forms of *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* and *L. major* using several doses (50, 100, 150, 200 and 250 mg/mL).^[28] In addition, in our work, the study by scanning electron microscopy permitted to check that the different concentrations of propolis tested were able to alter the normal morphology of the parasite in all observed periods (**Figure 2**).

Sforcin *et al.*, 2007, reported that the propolis used in our study has as main components phenolic compounds (flavonoids, aromatic acids and benzopyranes), di-and triterpenes and essential oils.^[25] According to literature data^[15], most of the biological activities of green propolis as antimicrobial, tripanocidal and antitumoral are associated mainly to its prenylated compounds.

In a study presented by Dantas *et al.* (2006) it was observed that ketone and ethanolic extracts of propolis from Bulgaria were able to promote changes in the mitochondrion-kinetoplast complex of trypanomastigotes forms (*Trypanosoma cruzi*) when analyzed by electronic transmission microscopy. Since the *Leishmania* is a *kinetoplastide* belonging to trypanosomatidae family, it is possible to relate the results obtained with *T. cruzi*, besides confirm the microbicidal action presented by propolis and help analyze the leishmanicidal results obtained by this bee product in this study.^[18]

The different compounds of propolis can promote several actions on parasite as well as in immune response of host.^[10,11,27] It is known that all species of

Leishmania parasite the mononuclear phagocytic system of the host.^[1,3] It is also known that promastigote forms inoculated in the mammalian host, through the bite of the vector insect, binds to macrophages and are rapidly phagocytized, transforming themselves in amastigotes, obligating intracellular forms.^[1,2,11] For this reason, we investigated the consequence of *in vitro* and *in vivo* pretreatment of propolis extract in macrophage.

In our *in vitro* experiments, we used the concentration of 10µg/mL and 5 due to the same sample of propolis on When Using human PBMC cells Already to have tested and tested These doses did not show cytotoxicity. ^[26]

When evaluated the action of propolis pretreatment in phagocytic assay, it was observed the percentage of infected macrophages did not present difference when compared with untreated cells (**Figure 4 A and C**). When it was determined the number of intracellular parasites, we verified that the treated cells had increased in number of amastigote forms (**Figure 4 B and D**). However, when maintained in culture for 5 days after infection the amount of recovered promastigotes was reduced by 82% in cells treated with 5 µg/mL, and reached 94,4% reduction in the treated cells with 10µg/mL (**Figure 5**). These results corroborate with other studies that show the action of propolis on phagocytosis.^[11,32] Ayres, *et al.*, (2007) showed that treatment with 6 µg/mL ethanolic extract of propolis for 72 hours decreased by 84.5% amastigote infection.^[11]

Similarly, Ozbilge *et al.*, (2010) reported that propolis Turkey has leishmanicidal effect on promastigotes of *Leishmania tropica*. These data corroborate other studies that demonstrate the action of propolis in promastigotes of different Leishmania species, as well as experimental infection of mice.^[28,29,30,31]

Some studies suggest that immunomodulation of propolis occurs through the activation of macrophages, ^[32,33] resulting in increased phagocytic capacity, stimulating the secretion of cytokines such as TNF-α and IL-12.^[22, 32, 34,35]

It is known that cytokines have an important role in directing of clinical outcome of leishmaniasis. ^[1,4,10] In our experiments, the production of IL-12 and TNF-α was performed in presence or absence of infection on *in vivo* pretreated macrophages. It was not observed difference in concentration of IL-12 (**Figure 6 A and B**). These results corroborate with other studies that related the inhibition of IL-12 level, as well as,IL-2 IL-4 and IL-10 in supernatant of PBMC or human T cells.^[36] Regarding to the TNF-α production, it was major in presence of parasite, in liver

homogenate and peritoneal exudate cells, when used the concentration of 10mg/kg of propolis. **(Figure 6 C and D).**

Liew, *et al.*, (1990), have already showed that lesions of BALB/c develop exacerbated when treated with anti-TNF- α antibody and this cytokine *in vitro* activates macrophages to kill this parasite.^[37] Recently, other studies have reported and confirmed the importance of this cytokine in the elimination of protozoa of the genus *Leishmania* and in the resolution of the lesions.^[38,39]

Many works have been shown that the synergistic action of TNF- α and INF- γ , activate phagocytic cells inducing the production of toxic molecules for parasites. Thus, the radicals of oxygen and nitrogen are considered critical in controlling infections by *Leishmania* spp.^[40,41]

In fact, Sforcin (2007) related that the propolis could exert this function by increasing directly the liberation of some pro-inflammatory cytokines as well as of oxygen and nitrogen metabolites.^[25]

However, other studies using different protocol were able to verify that the treatment with propolis inhibits NO production while H₂O₂ production is stimulated.^[33,36,42,43,44] Knowing that different species of *Leishmania* or polymorphisms, found in the same species, may confer susceptibility or resistance to NO donors that can interfere with the clinical aspect of the disease,^[45] we consider extremely important that further studies should be performed in order to investigate the chemical composition and leishmanicidal mechanism exerted by propolis.

Conclusion

The results obtained suggest that the treatment with Brazilian green propolis, in experimental leishmaniasis model was effective because it has direct action on parasite, affecting the proliferation and promoting morphologic alterations.

Additionally, it was possibly verified that the treatment of macrophage was more efficient in eliminating the infection. Therefore, the results suggest that the treatment *in vivo* with propolis increased the TNF- α secretion in leishmania infection.

References

1. GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R.. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 36(1):71-80, jan-fev, 2003.
2. World Health Organization (WHO).2011, <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.
3. SACKS, D. NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology* **2**, 845-858. 2002.
4. XIN, L.; WANDERLEY, J. L.; WANG, Y. ; VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; SOONG, L. The magnitude of CD4⁺ T-cell activation rather than TCR diversity determines the outcome of *Leishmania* infection in mice. **Parasite Immunology** Volume 33, Issue 3, pages 170–180, March 2011.
5. BEZERRA, R. J. S., LEON, L., GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences***. vol. 40, n. 2, abr./jun., 2004.
6. SCHRIEFER, A. L. F., SOUSA, R. S., GUIMARÃES, L. H., GÓES-NETO, A., ALBERT SCHRIEFER, A. Papel do Parasita e do Hospedeiro na Expressão Clínica das Leishmanioses. **Gaz. méd. Bahia**;75:1(Jan-Jun):46-56. 2005.
7. FREDERIC, F.; SCHETTINI, A.D. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia a base de antimônio. *Química Nova*, São Paulo, v.28, n.3, p.511-518, 2005.
8. LIMA, E.B. et al. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, v.82, n.2, p.111-124, 2007.
9. RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da Arte. *Química Nova*, São Paulo, v.26, n.4, 2003.
10. CUNHA, L. C., ALVES, L. D. S., SANTANA, L. C. L. R., NUNES, G. B. L., NETO, P. J. R. A própolis no combate a tripanossomatídeos de importância médica: uma perspectiva terapêutica para doença de chagas e leishmaniose. **Revista de patologia tropical**. Vol. 40 (2): 105-124. abr.-jun. 2011.
11. AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 2, 215-220. 2007.
12. BANKOVA, V.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, n. 31, 3–15. 2000.

13. DURAN G, DURAN N, CULHA G, OZCAN B, OSTAZ H, OZER B. *In vitro* antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. **Parasitol. Res.** 102: 1217-1225. 2008.
14. HIGASHI, K.O.; DE CASTRO, S.L. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. *J Ethnopharmacol* n 43, 149-155. 1994.
15. MARCUCCI, M.C. FERRERES, F.; GARCIA-VIGUEIRA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol.* n. 74, 105-112. 2001.
16. MIORIN, P.L.; LEVY JUNIOR, N.C.; CUSTODIO, A.R.; BRETZ, W.A.; MARCUCCI, M.C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* n.95, 913-920. 2003.
17. UZEL, A.; SORKUN, K.; ONCAG, O.; COGULU, D.; GENÇAY, O.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res*, n 160, 189-195. 2005.
18. DANTAS, A.P.; SALOMÃO, K.; BARBOSA H.S.; DE CASTRO S.L. The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz* n.101, 207-211. 2006.
19. FREITAS, S.F.; SHINOHARA, L.; SFORCIN, J.M.; GUIMARÃES, S. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine** n. 13, 170-175. 2006.
20. SFORCIN, J.M.; FERNANDES, J.R.A.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology.** n. 73, 243–249. 2000.
21. VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I.; SOSNOWSKI, Z. A comparative multicentre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, n. 7, 1–6. 2000.
22. KHAYYAL, M.T.; EL-GHAZALY, M.A.; EL-KHATIB, A.S. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. **Drugs Experimental and Clinical Research**, n.19, 197–203. 1993.
23. BAZO, A.P.; RODRIGUES, M.A.M.; SFORCIN, J.M.; CAMARGO, J.L.V.; RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F. Protective action of propolis on the rat colon

carcinogenesis. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, n. 22, 183–194. 2002.

24. BARBOSA, M. H., ZUFFI, F. B., MARUXO, H. B., JORGE, L. L. R. J. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paul Enferm.**;22(3):318-22. 2009.

25. SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 113, 1-14. 2007.

26. AMARANTE, M. K., WATANABE, M. A. E., CONCHON-COSTA, I., FIORI, L. L., ODA, J. M. M., BÚFALO, M. C., SFORCIN, J. M. The effect of propolis on CCL5 and IFN-g expression by peripheral blood mononuclear cells from leishmaniasis patients. Royal Pharmaceutical Society **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 64, pp. 154–160. 2011.

27. FISCHER, G., HÜBNER, S.O., VARGAS, G.D., VIDOR, T. IMUNOMODULAÇÃO PELA PRÓPOLIS. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.2, p.247-253, abr./jun., 2008.

28. MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L., CASTRO, S. L.. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of Leishmania. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. vol.102, n.1, 2007.

29. OZBILGE, H.; KAYA,E. G.; ALBAYRAK, S.; SILICI, S. Anti- leishmanial activities of ethanolic extract of Kayseri propolis. **African Journal of Microbiology Research** Vol. 4 (7), pp. 556-560, 4 April. 2010.

30. PONTIN K, SILVA-FILHO AA, SANTOS FF, SILVA MLA, CUNHA WRA, NANAYAKKARA D, BASTOS JK, ALBUQUERQUE S. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitol Res** 103: 487-492. 2008.

31. AYRES, D. C., FEDELE, T. A., MARCUCCI, M. C., GIORGIO, S. POTENTIAL UTILITY OF HYPERBARIC OXYGEN THERAPY AND PROPOLIS IN ENHANCING THE LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF GLUCANTIME. **Rev. Inst. Med. Trop.** Sao Paulo. 53(6):329-334, November-December, 2011.

32. ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.84, p.265-273, 2003.

33. ORSI, 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. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.6, n.2, p.205-219, 2000.
34. DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivate. **Vaccine**, v.10, n.12, p.817-823, 1992.
35. IVANOVSKA, N.D.; DIMOV, V.B.; PAVLOVA, S.; BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivate. **Journal of Ethnopharmacology**, v.47, p.135-143, 1995.
36. ANSORGE, S., REINHOLD, D., LENDECKEL, U., Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β_1 production of human immune cells. *Zeitschrift für Naturforschung* 58c, 580–589. 2003.
37. LIEW, F. Y., LI, Y., MILLOTT S. Tumour necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. **Immunology** . 71, 556-559,1990.
38. DE SOUZA CARMO, E. V., KATZ, S. BARBIÉRI, C. L. Neutrophils Reduce the Parasite Burden in Leishmania (Leishmania) amazonensis-Infected Macrophages. **Plos One**, Volume 5, Issue 11, 2010.
39. OLIVEIRA, C. F., ALMEIDA, D. M., MELLO, P. S., NATALE, C. C., SANTIAGO, H. C., MIRANDA, S. L., FERRAZ, F. O., SANTOS, L. M., TEIXEIRA, M. M., ARANTES, R. M. E., VIEIRA, L. Q. Characterization of Chronic Cutaneous Lesions from TNF-Receptor-1-Deficient Mice Infected by Leishmania major. **Clinical and Developmental Immunology**. Volume 2012, 2011.
40. KANE, M. M.; MOSSER, D. M. Leishmania parasites and their plays to disrupt macrophage activation. **Curr. Opin. Hematol.** 7: 26-31, 2000.
41. SCHARTON-KERSTEN, T.; SCOTT, P. The role of innate immune response in TH1 cells development following Leishmania major infection. *J. Leukoc. Biol.*, 57: 515-522, 1995.
42. MORIYASU, J. et al. In vitro activation of mouse macrophage by propolis extract powder. *Biotherapy*, V.8, p.364-5, 1994.
43. HU, F. et al. effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal model. *Journal of Ethnopharmacology*, V. 100, p.276-83, 2005.
44. MACMICKING, J. et al. Nitric oxide and macrophages function. *Annual Review of Immunology*, V. 15, p.323-50,1997.

45. MAUËL, J., RANSIJN, A. Leishmania spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. **Experimental Parasitology**, Volume: 87, Issue: 2, 98-111.1997.
46. SÁ-NUNES, A. FACCIOLI, L.H. SFORCIN, J.M. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. **Journal of Ethnopharmacology**. 87, 93-97. 2003.

Apêndice- Aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal



Universidade
Estadual de Londrina

COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 24/2011

Londrina, 05 de abril de 2011

Prezada Pesquisadora

O CEEA/UEL, reunido em 15 de março do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Análise da atividade da própolis na leishmaniose", registrado no CEEA sob o nº 09/11, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o *aprovado* para execução por entender que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 310 camundongos BALB/c, machos, pesando entre 28 a 32 gramas, com procedência do Biotério Central de Maringá. Os animais serão divididos em 31 grupos com 05 animais cada. Os procedimentos experimentais serão: 1. Ensaio fagocítico - serão obtidas células do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c por inoculação de 2 ml de RPMI e mantidas em presença ou ausência de própolis nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 µg/well. 2. Atividade da própolis em células fagocíticas peritoneais - será estudada com subgrupos de 5 camundongos BALB/c que receberão 50 µg, 100 µg e 250 µg do extrato de própolis intraperitoneal em 250 µg de PBS. Após 24 horas serão infectados i.p. com 10^7 formas promastigostas de Leishmania SP. (+ 01 grupo controle). 3. Atividade da própolis na infecção "in vivo" - subgrupos de 5 camundongos BALB/c receberão 10 µg, 25 µg e 50 µg do extrato de própolis em 50 µg de PBS, ou somente PBS no coxim plantar direito. Após 24 horas serão infectados com 2×10^6 formas promastigostas de Leishmania na fase estacionária em 50 µg de PBS livre de patógenos nas mesmas condições em que ocorreu o inoculo de parasitos. A evolução da doença nos animais infectados e no grupo controle será avaliada semanalmente, por um período de 10 semanas, pela medida do tamanho da lesão da pata infectada em comparação com medida da pata contralateral não infectada, utilizando-se um especímetro manual. Ao final da 10ª semana após a infecção, os animais serão sacrificados e removidos o coxim plantar e linfonodo regional poplíteo para análises. O estudo está previsto para ser desenvolvido entre abril de 2011 e março de 2013. Este comitê aprova a realização de duas repetições por tratamento e caso tenha necessidade de uma terceira repetição, o coordenador do projeto deverá solicitar a autorização do CEEA-UEL.

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Ivete Conchon Costa
Coordenadora do Projeto
Departamento de Ciências Patológicas
Centro de Ciências Biológicas

IB 1

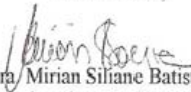


Universidade
Estadual de Londrina

Cumprе orientar que caso se pretendam quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação do CEEA/UЕL anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,


Prof. Dra. Mirian Siliane Batista de Souza
Coordenadora do CEEA/UЕL