Universidade Estadual de Londrina

ANA PAULA FORTES DOS SANTOS

EFEITO DA PRÓPOLIS BRASILEIRA EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO NA LEISHMANIOSE

Londrina
2015

ANA PAULA FORTES DOS SANTOS

EFEITO DA PRÓPOLIS BRASILEIRA EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO NA LEISHMANIOSE

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.

Londrina
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Santos, Ana Paula Fortes dos .
Efeito da própolis brasileira em células mononucleares do sangue periférico humano na leishmaniose / Ana Paula Fortes dos Santos. - Londrina, 2015.
51 f. : il.

Orientador: Ivete Conchon Costa.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental , 2015.
Inclui bibliografia.

1. Leishmaniose - Tese. 2. Citocinas - Tese. 3. Uso terapêutico de Própolis - Tese. I. Costa, Ivete Conchon. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental . III. Título.

ANA PAULA FORTES DOS SANTOS

EFEITO DA PRÓPOLIS BRASILEIRA EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO NA LEISHMANIOSE

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.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Ivete Conchon Costa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof[a]. Dr[a]. Carolina Panis
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE

Prof[a]. Dr[a]. Vera Lúcia Hideko Tatakihara
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 11 de junho de 2015.

“E tudo quanto fizerdes, fazei-o de coração, como ao Senhor, e não aos homens, sabendo que do Senhor recebereis como recompensa a herança;”

Colossenses 3:23,24

AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu fôlego de Vida e ,e fortaleceu na minha caminhada, a Ele seja todo louvor e toda adoração.

Aos meus pais que sempre estiveram comigo e todos os dias sonham os meus sonhos.

Ao meu marido por todas as palavras de incentivo, pelo caminhar lado a lado e por toda compreensão.

À minha orientadora Profª Drª Ivete Conchon Costa por abrir as portas do laboratório para mim e me dar a oportunidade de participar deste grupo de pesquisa. Agradeço pela orientação e paixão pela pesquisa, que sempre foi fonte de admiração.

Ao Profº. Dr. Wander R. Pavanelli e à Profª Drª Idessania N. Costa por me acolherem no laboratório e por sempre estarem dispostos à ajudar.

Aos amigos de laboratório que sempre estiveram por perto, compartilhando as alegrias e tristezas da vida científica, em especial à Fernanda, Tatiane, Allan, Milena e Natália, que não mediram esforçoes para me ajudar, não tenho palavras para agradecer todo apoio, socorro e amizade de vocês.

Ao técnico Pedro por sempre estar disposto a ajudar.

À Profª. Drª Carolina Panis por sua ajuda fundamental e suas palavras de ânimo que sempre vieram na hora certa.

Ao Profº. Dr. José Maurício Sforcin pelo extrato de própolis, correções e sugestões.

Ao Profº. Dr. Luiz Antonio Custódio e à Drª. Vera Lúcia Hideko Tatakihara que abriram as portas do Hospital das Clínicas e por serem sempre solícitos.

Aos técnicos do Hospital das Clínicas por toda a paciência no ensinar.

À todos os pacientes e demais doadores que doaram seu sangue para que essa pesquisa fosse possível.

Ao Dr. Juliano Bordignon pelo suporte em experimentos e sugestões.

Ao programa de pós-graduação em Patologia experimental-UEL pelo incentivo à pesquisa e apoio institucional. À CAPES, CNPq, Fundação Araucária e à PROPPG-UEL pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

SANTOS, Ana Paula Fortes dos. **Efeito da própolis brasileira em células mononucleares do sangue periférico humano na leishmaniose.** 2015. 51f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) causada por protozoários do gênero *Leishmania* é caracterizada pelo surgimento de lesões que podem se apresentar nas formas clínicas cutânea, cutânea difusa e mucocutânea. Essas manifestações clínicas são dependentes da interação entre as espécies do parasito envolvido, bem como a resposta imune apresentada pelo hospedeiro. Em humanos, a resposta imune à infecção por *Leishmania* não é tão bem caracterizada como na resposta em camundongos, em virtude do 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* esteja relacionada com o predomínio da resposta celular Th1 e Th2 respectivamente. Os medicamentos disponíveis para o tratamento da LTA apresentam toxicidade elevada, longo período de tratamento, aliado a relatos de pacientes que desenvolvem resistência a tais terapias, estes fatores tem promovido a busca por alternativas terapêuticas. Estudos têm demonstrado que a própolis apresenta grande potencial para o auxilio no tratamento da leishmaniose, devido à suas propriedades anti-inflamatória, imunomoduladora, antiparasitária e de reparo tecidual. Este trabalho teve como objetivo analisar, *in vitro*, a atividade biológica do extrato de própolis brasileira em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano de pacientes com leishmaniose e doadores saudáveis. Células mononucleares do sangue periférico de pacientes e indivíduos saudáveis foram cultivadas na presença ou ausência desses compostos com ou sem infecção com *L. braziliensis*. O sobrenadante e o soro de pacientes e doadores saudáveis foram utilizados para dosagem de óxido nítrico e citocinas. As células aderentes tratadas com própolis foram utilizadas para marcação com imunocitoquímica. Foi demonstrado que a própolis estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias em células de pacientes com leishmaniose sendo potencial regulador na imunossupressão induzida por *Leishmania braziliensis*

Palavras-chave: Imunomodulação. Alternativas terapêuticas. Citocinas. Leishmaniose. *Leishmania*.

SANTOS, Ana Paula Fortes dos. **Effect of brazilian propolis on human peripheral blood mononuclear cells in leishmaniasis**. 2015. 51p. Dissertation (Master in Experimental Pathology) - State University of Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

The American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) caused by protozoa of the genus Leishmania is characterized by the appearance of lesions that can appear in the clinical forms: cutaneous, diffuse cutaneous and mucocutaneous. These clinical manifestations are dependent on the interaction between the species of parasite involved and the immune response provided by the host. In humans, the immune response to Leishmania infection is not as well characterized as the response in mice, because of the involvement of cytokines, co-stimulatory molecules, as well as sandfly saliva, hampering the understanding of how the immune response is by the host. However, studies suggest that in all clinical forms of ACL, the immune response is T cell-dependent and, in general, it is accepted that the difference between resistance and susceptibility to Leishmania infection is related to the cellular response predominance Th1 and Th2, respectively. Available drugs for the treatment of ACL show high toxicity, prolonged periods of treatment, along with reports of patients developing resistance to such therapies, these factors have promoted the search for alternative treatment. Studies have shown that the propolis resin produced by bees, has great potential for the development of new drugs due to their anti-inflammatory, immunomodulatory, anti-parasitic and tissue repair. This study aimed to analyze, *in vitro*, the biological activity of extract of Brazilian propolis in mononuclear cells from peripheral blood (PBMC) of patients with leishmaniasis and healthy donors. Peripheral blood mononuclear cells from patients and healthy individuals were cultured in the presence or absence of these compounds with or without infection with *L. braziliensis*. The supernatant and serum from patients and healthy donors were used for measurement of nitric oxide and cytokines. The adherent cells were treated with propolis used for labeling with immunocytochemistry. Propolis has been shown to stimulate the production of proinflammatory cytokines in cell leishmaniasis patients with potential regulator in *Leishmania braziliensis* immunosuppression.

Keywords: Immunomodulation. Therapeutic alternatives. Cytokines. Leishmaniasis. Leishmania.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO

LISTA DE TABELA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Células NK	Células natural killer
Células Th1	Células T helper tipo 1
Células Th2	Células T helper tipo 2
Células Treg	Células T reguladoras
CON-A	Concanavalina-A
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
IL	Interleucina
IL- 4	Interleucina-4
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-1β	Interleucina-1β
IL-6	Interleucina-6
IFN-γ	Interferon-gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LM	Leishmaniose mucosa
L-NMMA	Ng-Monometil-L-Arginina
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
NADPH	Nicotinamida adenina dinnucleotídeo fosfato
NFκB	Fator nuclear κB
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase
PBMC	Células mononucleadas do sangue periférico
TGF-β	Fator de Trasformação do Crescimento – β
TLR-2	Toll like receptor-2
TLR-4	Toll like receptor-4
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α

SUMÁRIO

Esta dissertação foi realizada de acordo com as normas NBR 6023/2002.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

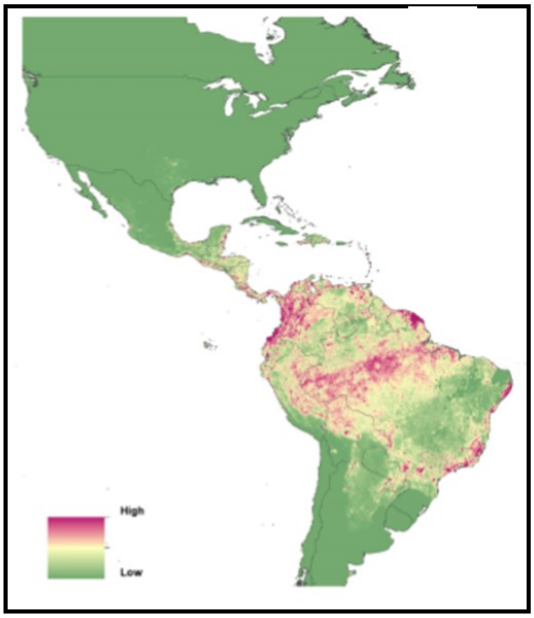
A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma infecção zoonótica provocada por parasitos do gênero *Leishmania* em hospedeiros vertebrados, transmitida por meio da picada de insetos flebotomíneos. (SILVEIRA et al., 2008). É uma antropozoonose de importância mundial na saúde pública, uma vez que representam um complexo de doenças com ampla diversidade epidemiológica, com participação de diversos agentes etiológicos, vetores e hospedeiros no seu ciclo de transmissão (MARINHO-JR, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 95% dos casos de leishmaniose tegumentar ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Estima-se que 0.7 a 1.3 milhões de novos casos ocorrem em todo o mundo anualmente, sendo que o Brasil está entre os países onde ocorre as infecções mais severas (Figura 1) (WHO, 2015; PIGOTT et al, 2014).

No Brasil, a LTA é uma doença em fase de expansão geográfica, registrando, na década de 80, casos em 19 estados brasileiros e, a partir de 2003, todas as Unidades Federadas passaram a registrar casos autóctones (NEGRÃO; FERREIRA, 2014). Entre 1980 e 1996 os casos registrados foram maiores de 300 mil (SILVEIRA et al., 1999). Em 2013, dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), confirmam 18.675 casos notificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, 2015). Esta doença tem relação com locais provenientes de colonização devido à modificação de matas remanescentes com a adaptação do vetor e reservatórios silvestres. Isto se fez propício para a continuidade do ciclo do parasita em regiões próximas a moradias, em zonas rurais e periferias de centros urbanos (LIMA et al., 2002).

No Paraná, Lima e colaboradores (2002) verificaram que houve registros crescentes de casos de LTA relatados até 1958 e a partir de 1980 se mantiveram endêmica em diversos municípios apesar do desmatamento já ocorrido. No Estado do Paraná, a LTA é endêmica com notificação em 276 dos 399 municípios, principalmente das regiões norte e oeste. No ano de 2013, 316 casos foram notificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, 2015).

Figura 1 - Distribuição da Leishmaniose Tegumentar Americana: áreas de risco do verde (baixa probabilidade de presença) para o roxo (alta probabilidade de presença). Adaptado de Pigott et al. 2014



No Brasil já foram descritas 6 espécies do subgênero *Viannia* e 1 do subgênero *Leishmania*, sendo que 3 espécies são os principais agentes etiológicos circulantes da Leishmaniose Tegumentar Americana: *Leishmania (Leishmania) amazonensis, Leishmania (Viannia) guyanensi* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (BRASIL, 2009). As espécies circulantes no estado do Paraná, *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) braziliensis,* são conhecidas pelo potencial patogênico por causar as formas cutânea, cutânea difusa e mucocutânea (SILVEIRA et al., 2008).

1.2 Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA é considerada uma enfermidade polimórfica, que atinge a pele e as mucosas, agrupadas em diferentes formas clínicas. Assim, os parasitos ao invadir um hospedeiro mamífero, no local da picada, formam, geralmente, uma única lesão limitada, porém, dependendo da espécie do protozoário e da resposta imune do hospedeiro, a doença pode apresentar amplo espectro de severidade e uma série de formas clínicas, tais como: cutânea aguda ou localizada; mucocutânea e cutânea difusa (GARNIER; CROFT, 2002).

A Leishmaniose Cutânea (LC) apresenta lesões com características típicas com formato arredondado ou ovalado, fundo granuloso, indolor e com base bem delimitada, podendo formar úlceras únicas ou múltiplas (Leishmaniose Cutânea Localizada ou Disseminada). Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) intimamente ligada a *L. amazonensis*, é uma forma grave e rara que está associada a pouca ou à falta de resposta celular ao antígeno do parasita, apresentando evolução lenta com lesões não ulceradas em grande parte da pele (SILVEIRA et al., 2008; BRASIL, 2009), enquanto a Leishmaniose Mucocutânea (LM) está associada principalmente a *L. braziliensis.* Pode ser secundária ou não a forma cutânea, sendo que aproximadamente 3–5% dos pacientes desenvolvem lesões na mucosa, que pode aparecer juntamente com as lesões cutâneas ou até após anos depois da cura de lesões cutâneas. Caracteriza-se por infiltração, ulceração e destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe e laringe (BRASIL, 2009; MEDEIROS et al., 2005; GOMES et al., 2014).

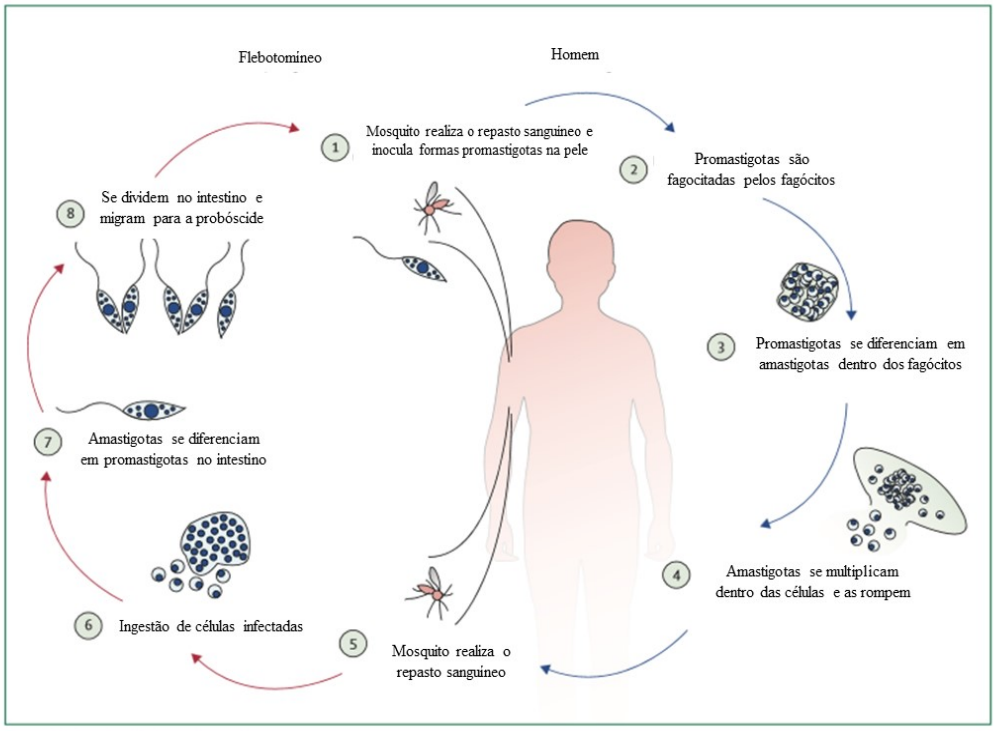
A intensidade da lesão causada por *Leishmania* é determinada pela espécie do parasita assim como pela resposta imune do hospedeiro; embora os mecanismos envolvidos na resposta imune de portadores de leishmaniose não estejam claramente elucidados (CARVALHO et al., 1992; BACELLAR et al., 2002).

1.3 Ciclo Biológico

Os parasitos pertencentes a este gênero apresentam um ciclo heteroxênico e com formas biológicas distintas: a forma amastigota, intracelular obrigatória e a forma promastigota, infectante para o homem e presente no tubo digestivo dos insetos vetores. A infecção se inicia após a inoculação das formas promastigotas metacíclicas na epiderme do hospedeiro, devido ao repasto sanguíneo praticado pelo vetor flebotomíneo fêmea (Ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia*). As formas promastigotas metacíclicas são internalizadas por fagócitos, principalmente macrófagos e rapidamente se diferenciam na forma intracelular, amastigota, que irão se multiplicar dentro destas células, resistindo à ação do fagolisossomo. A membrana da célula se rompe quando não há mais espaço para a multiplicação, neste momento as formas liberadas são fagocitadas por outras células fagocíticas desencadeando uma reação inflamatória no local. Outra fêmea do inseto flebomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo, ingere células infectadas. No intestino do inseto, as formas amastigotas

se diferenciam em promastigotas, se transformam em promastigotas metacíclicas e migram para a probóscide para reiniciar o ciclo quando houver novo repasto sanguíneo (LESSA et al., 2007; NEVES, 2011; GOMES et al., 2014; SILVEIRA et al., 2008)(Figura2).

Figura 2 - Ciclo evolutivo de *Leishmania sp.:* Adaptado de Reithinger et al., 2007



1.4 Resposta Imune na LTA

Assim como nas infecções parasitárias, as infecções por *Leishmania* spp. levam a uma ativação específica da resposta imunológica por parte do hospedeiro e no intuito de elucidar aspectos desta relação parasito-hospedeiro, a infecção experimental em camundongos tem sido utilizada.

Estudos em camundongos infectados com *L. major*, modelo melhor estudado na doença infecciosa crônica, têm mostrado que a resposta imune mediada por células T desempenha um papel importante no processo para cura ou agravamento da doença, assim a suscetibilidade a *L. major* em camundongos BALB/c está relacionada com a produção de interleucinas como a (IL)-4 e IL-10 que direcionam a resposta para o perfil Th2, enquanto linhagem resistentes de camundongos, como C57BL/6, CBA, C3H apresentam produção precoce e contínua de IFN-γ e TNF- α direcionando para um perfil Th1, que em conjunto levam a

ativação dos macrófagos, desencadeando o “burst” oxidativo, durante o processo de endocitose do parasito (PEARSON; STEIGBIGEL, 1981). Este fenômeno se caracteriza pelo aumento da atividade respiratória da célula, ativação de enzimas como a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH oxidase) que transfere prótons para moléculas de oxigênio, formando moléculas altamente reativas denominadas espécies reativas de oxigênio (ROS) como superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila; e aumento na atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), com consequente aumento na produção de NO, molécula microbicida envolvida na eliminação do parasito (QADOUMI; BECKER et al. 2002; CUNNINGHAM 2002).

No geral, após a ativação do macrófago por TNF-α e IFN-γ, há a produção de óxido nítrico (NO), um gás inorgânico, molécula oxidante com importante papel leishmanicida, que é sintetizada pela enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS) pela oxidação da L-arginina de maneira dependente na NADPH. A NOS possui três isoformas: nNOS (neuronal ou NOS1), eNOS (endotelial ou NOS2) e a iNOS (induzível ou NOS3), sendo que a nNOS e eNOS são conhecidas por serem constitutivas e a iNOS é a isoforma expressa em decorrência de resposta imune (DINIZ, 2004; GIUDICE et al., 2007).

A iNOS pode ser induzida por muitos estímulos imunológicos, como TNF-α e IFN-γ produzidos por células Th1, enquanto a resposta Th2 ativa macrófagos a produzir arginase que irá competir com a iNOS podendo inibir a produção do NO (HUANG et al., 1998; HORTA et al., 2012).

O NO tem seu papel no meio biológico como alvo de intensas pesquisas, por estar envolvido em uma gama de atividades biológicas como neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, citotoxicidade entre outros (QUEIROZ; BATISTA, 1999).

Está muito bem estabelecido a função do NO na morte de *Leishmania* spp. em células fagocíticas murina, contudo não há muitas observações sobre a produção deste metabólito em monócitos (BORDON-GRACIANI et al., 2012). Sabe-se que monócitos tem capacidade de produzir NO e de expressarem iNOS como foi demonstrado por Bordon-Graciani e colaboradores (2012) quanto tratou monócitos com IFN- γ, TNF-α ou GM-CSF.

Há também um importante papel de células T reguladoras (Treg), que por sua vez, atuam induzindo a imunossupressão durante este tipo de infecção (BELKAID et

al., 2002; CAMPANELLI et al., 2006; VIGARIO et al., 2007; RODRIGUES et al, 2009). Assim, citocinas como IL-10 e o Fator de Transformação de Crescimento-β (TGF-β) atuam sobre os macrófagos, reduzindo a sua capacidade de eliminar o parasita, diminuindo também a capacidade destes apresentarem o antígeno a células T efetoras, além de estarem associadas à proteção tecidual (GOMES et al., 2014).

Diante da correlação de uma resposta imune polarizada e o resultado da infecção, estabeleceu-se o conceito de que o balanço da resposta Th1/Th2 é que determina o resultado clínico da infecção (ROBERTS, 2006).

Porém essa dicotomia Th1/Th2 ainda não é muito clara na infecção humana (GOMES et al., 2014).

Em humanos, os monócitos circulantes, estão cada vez mais implicados como agentes essenciais na defesa contra muitos patógenos, entre eles parasitos do gênero *Leishmania* (SERBINA et al., 2008). Aproximadamente 10% dos leucócitos circulantes em humanos são monócitos do sangue periférico, este tipo celular é conhecido por ser a principal fonte de células progenitora circulante e fazem parte de uma parcela vital no sistema imune (GEISSMANN et al., 2010).

Durante a infecção por *Leishmania* spp. monócitos circulantes deixam a corrente sanguínea e migram para tecidos onde se diferenciam em macrófagos, principal célula alvo na LTA, após ação de fatores de crescimento locais como citocinas e produtos microbianos (SHI; PAMER, 2011). Esses macrófagos, quando infectados por *Leishmania*, induzem uma resposta imune adaptativa, principalmente pela ativação das células T (BACELLAR et al., 2002).

Castellano e colaboradores (2009) demonstraram que ocorrem níveis significativos de citocinas tanto dos padrões Th1, Th2 como Treg em pacientes com lesões ativas, contudo em pacientes curados, o padrão de resposta evoluiu para um padrão Th1 com a produção de IFN-γ. Segundo os autores, em pacientes com LC, a produção de IL-12 induz essa diferenciação para células Th1, na fase ativa da doença e parece ser importante para a manutenção da produção de IFN-γ durante essa mesma fase.

Embora essa resposta protetora de células Th1 esteja relacionada com a cura da doença, uma resposta exagerada de células T é considerada uma causa das lesões na leishmaniose cutânea e mucocutânea sendo que as lesões são caracterizadas por um rico infiltrado inflamatório e com difícil detecção de parasitos

nesta lesão (CARVALHO et al., 2007). Giudice e colaboradores (2012) demonstraram que macrófagos de pacientes com LC e LM produziam maior secreção de TNF-α após a infecção *in vitro* com *L. braziliensis* comparados com células de indivíduos subclínicos ou assintomáticos. O mesmo efeito foi verificado em monócitos por Vieira e colaboradores (2013) onde houve o aumento da produção de TNF-α em monócitos quando desafiados com antígeno solúvel de *L. braziliensis*.

O papel de outras citocinas também foi demonstrado no estudo de Gomes e colaboradores (2014) onde formas amastigotas de *L. braziliensis* interagem com PBMCs de doadores saudáveis estimulando a secreção de IL1β, IL-6, IL-10 e TGF-β.

1.5 TRATAMENTO

O tratamento atual da Leishmaniose se baseia na eliminação das formas amastigotas de *Leishmania* spp. Contudo, a localização intramacrofágica desta forma, impossibilita uma atuação mais eficaz dos atuais fármacos. Tal localização do parasita é crucial 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).

As formas de tratamento têm se baseado no uso de antimônios pentavalentes, desde a década de 40, como o antimonato de *N*-metil glucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam® ou Solustibosan®) (BRASIL, 2011). Outros fármacos como anfotericina B e pentamidina têm sido usados como alternativas nos casos de resistência aos antimoniais, mas não possuem um índice terapêutico tão favorável e também apresentam várias reações adversas (BRAY et al., 2003; BERMAN, 2006).

Gaspar Vianna foi o primeiro a utilizar um composto antimonial, o tártaro emético, para o tratamento da leishmaniose. O primeiro antimônio pentavalente sintetizado foi o estibogluconato de sódio em 1945; neste mesmo ano, ocorreu a síntese de outro composto pentavalente, o antimoniato de N-metil glucamina, Glucantime® (FUNASA, 2000).

O Glucantime® é a droga de escolha no Brasil, esta droga age inibindo, em formas amastigotas, a atividade glicolítica e a via oxidativa dos ácidos graxos. Porém este mecanismo não está totalmente elucidado (MEDEIROS et al, 2005).

Contudo, o Glucantime® possui toxicidade cumulativa que geralmente ocorre após a segunda semana de uso do medicamento. Os principais órgãos atingidos por esses efeitos colaterais são coração, rins e fígado podendo atingir pâncreas e causar dores articulares. Pacientes com doenças crônicas de rins, coração e idosos devem ser bem acompanhados quanto à prescrição de antimoniais (MEDEIROS et al, 2005).

A anfotericina B é um antibiótico que tem ação antifúngica e apresenta resultados no tratamento da leishmaniose. É utilizada quando a resposta de tratamento aos antimoniais não é satisfatória ou o uso destes não é recomendado. Seu mecanismo de ação se dá na membrana do parasito, alterando a permeabilidade celular, ocasionando a morte celular. Porém, possui alta nefrotoxicidade e cardiotoxicidade o que limita seu uso (FILIPPIN; SOUZA, 2006; MEDEIROS et al., 2005; BRASIL, 2011).

As pentamidinas agem no metabolismo de glicose, podendo levar a hiperglicemia que como consequência pode levar ao desenvolvimento de diabetes *mellitus.* É utilizado nas áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano, sendo comercializada nas formulações isotionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) e mesilato (Di-B-Hidroximetil-Sulfonato) (BRASIL, 2011).

Conforme o exposto, a quimioterapia para LTA não é satisfatória, devido: à toxicidade destas drogas; dificuldade de administração; longo tempo de tratamento, somado ao fato de relatos sobre o encontro de parasitos em pacientes considerados curados clinicamente. Além disso, vacinas efetivas ainda não foram desenvolvidas e cepas com diferentes sensibilidades e resistência às drogas disponíveis exigem uma urgência na busca de novas terapias leishmanicidas.

1.6 Alternativa Terapêutica

1.6.1 Própolis

Devido aos vários fatores expostos, a pesquisa para a descoberta de novas alternativas terapêuticas tem sido procurada nas últimas décadas. O uso de produtos naturais é tido como promissor para a descoberta de novos fármacos (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

O produto coletado pelas abelhas das gemas e exsudatos das plantas é transformado em um material resinoso na presença de enzimas, a própolis. Mais de

300 compostos já foram descritos e a cor juntamente com a composição química variam conforme a localidade, planta e flora local (SFORCIN et al., 2000; LOTFY, 2006; SFORCIN, 2007). Burdock (1998) demonstrou que a composição geral da própolis é de 30% de cera, 50% de resina de bálsamo e vegetal, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen, entre outras substâncias.

Para a medicina humana e veterinária as plantas medicinais e seus componentes químicos tem sido muito atraentes para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas (ORSATTI et al., 2010).

Um dos mais importantes produtos das abelhas contra microrganismos patogênicos é a própolis, que vem sendo usada pelos seres humanos desde os tempos antigos. Nos Estados Balcãns a própolis tem sido utilizada no tratamento de feridas, queimaduras e úlceras de estômago (BANKOVA, 2005).

Sforcin e Bankova (2011) relatam o uso da própolis por gregos e romanos devido a suas propriedades antissépticas e de cicatrização, e os egípcios a utilizavam para embalsamar os mortos devido a sua ação anti-putrefação.

Dentre as diversas atividades comprovadas que a própolis possui destacam-se as atividades antimicrobiana, estimulante do sistema imune, antifúngica, anti-inflamatória, imunomodulatória e leishmanicida (LOTFY, 2006; SFORCIN, 2007; AMARANTE et al., 2012; SILVA et al., 2013). A própolis já foi demonstrada por seu efeito antibacteriano contra isolados de *Streptococcus mutans* e antifúgica contra *Candida sp* (KROL et al., 2013) e antiprotozoários. Freitas (2006) demonstrou que a própolis inibiu o crescimento de trofozoitos de *Giardia* de maneira dose-dependente.

Silva e colaboradores (2013) verificaram que a própolis promoveu efeitos sobre a forma promastigotas de *L. braziliensis* reduzindo o crescimento e promovendo diversas alterações morfológicas. Verificou-se ainda, que na concentração de 100µg/mL de própolis, o mesmo efeito antiproliferativo sobre a promastigota que quando tratadas com Glucantime.

Em relação à resposta imune, nosso grupo demonstrou anteriormente que os níveis de expressão de mRNA de INF-γ foi modulado em PBMCs de doadores saudáveis e de pacientes com leishmaniose, tratados com própolis, enquanto os níveis de expressão de CCL5 em PBMCs de pacientes foram aumentados na presença de própolis (AMARANTE et al.,2012).

Outras citocinas também se mostraram moduladas por própolis, como TNF-α, que se mostrou aumentada de maneira significativa no exudato peritoneal e no

homogeneizado do fígado em camundongos tratados com a própolis após a infecção com *Leishmania* (SILVA et al., 2013). Do mesmo modo, as citocinas IL-1β e IL-6, também se mostraram moduladas pela própolis, quando ORSATTI e colaboradores, 2010 verificaram em macrófagos peritoneais que apenas o tratamento com própolis induz o aumento da produção basal de IL-1β, enquanto em cultura de células do baço de camundongos, houve aumento na produção tanto de IL-1β quanto de IL-6.

Orsatti e colaboradores (2010) também observaram o aumento na expressão de TLR-2 e TLR-4 em macrófagos de camundongos tratados com própolis. Verificou-se também o aumento na expressão apenas de TLR-4 em células do baço tratadas com própolis, sendo que a expressão deste tipo de TLR está correlacionada com a produção de TNF-α e IL-1β em macrófagos peritoneais.

Além de sua ação sobre a produção de citocinas, a própolis também é demonstrada por sua atividade no aumento na geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ORSI et al., 2000; IVANOVSKA et al., 1995).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Análise *in vitro* da atividade biológica da própolis brasileira, sobre monócitos obtidos de PBMC humano na leishmaniose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Própolis

- Avaliar *in vitro* a ação direta da própolis brasileira sobre formas promastigotas de *L. braziliensis*.
- Determinar *in vitro* os níves de óxido nítrico no soro de pacientes e doadores saudáveis.
- Avaliar *in vitro* o efeito da própolis brasileira sobre a síntese de NO em PBMC de pacientes com leishmaniose e indivíduos saudáveis, infectados com *Leishmania.*
- Verificar *in vitro* a expressão do fator de transcrição NFκB e o perfil de citocinas (IL-2, IL-6, IFN-γ e TGF-β) em PBMC de pacientes com leishmaniose e indivíduos saudáveis, tratados com da própolis brasileira e infectados com *L. braziliensis*.

3 REFERÊNCIAS

AMARANTE, M.K. et al. The effect of propolis on CCL5 and IFN-g expression by peripheral blood mononuclear cells from leishmaniasis patients. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, p. 154–160, 2012.

BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6734-40, 2002.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2**, p. 29–32. 2005.

BELKAID, Y. et al. CD4+ CD25+ regulatory Tcells control Leishmania major persistence and immunity. **Nature**. v.420, p502–507, 2002.

BERMAN, J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. **The Indian journal of medical research**, v.123, n.3, p.289-294, 2006.

BORDON-GRACIANI, A.P. et al. High expression of human monocyte iNOS mRNA induced by Paracoccidioides brasiliensis is not associated with increase in NO production. **Microbes and Infection**, v.14, p.1049-1053, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília : **Ministério da Saúde**, p.816, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de Situação: Paraná / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 5. ed. – Brasília : **Ministério da Saúde**, p. 35. 2011.

BRAY, P. G. et al. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa:past, present and future. **Trends Parasitology**, v.19, n.5, p.223-239, 2003.

BURDOCK, G.A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-363, 1998.

CAMPANELLI, A.P. et al. CD4+, CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhib it phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **J. Infect. Dis.** v.193, p.1313–1322, 2006.

CARVALHO, E.M. et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with L*eishmania donovani chagasi*. **Journal of Infectious Diseases**, v.165, p.535-540, 1992.

CARVALHO, L.P. et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. **Parasite Immunol.,** v.29, n.5, p.251–258, 2007.

CASTELLANO, L.R. et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-α production. **Human Immunology**, v.70, p. 383-390. 2009.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp Mol Pathol.,** v.72, p.132-141, 2002.

DINIZ, A.G. **Resistência de** *L. amazonensis* **e** *L. braziliensis* **ao óxido nítrico e correlação com a doença.** 2004. 95 f. Tese (Mestrado em Imunologia) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2004.

FILIPPIN, F.B.; SOUZA, L.C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, 2006.

FREITAS, S.F. et al. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine**, v. 13, p. 170–175, 2006.

FUNASA - Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana / Organização: Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. - Coordenação de Vigilância Epidemilógica - Centro Nacional de Epidemiologia – Fundação Nacional de Saúde - **Ministério da Saúde**. Brasília, p: 7-28. 2000.

GARNIER, T.; CROFT, S.L. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Curr. Opin.* **Investig. Drugs**. v.3, n.4, p.538-544, 2002.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, p. 656-61, 2010.

GIUDICE, A. et al. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, 2007.

GIUDICE, A. et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infectious Diseases,** 2012.

GOMES, C.M. et al. Leishmania braziliensis amastigotes stimulate production of IL-1β, IL-6, IL-10 and TGF-β by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residentes. **Parasite Immunology**, v.36, p.225–231, 2014.

HORTA, M.F. et al. Q. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v.2012, p.11, 2012.

HUANG, F.P. et al. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 28, p. 4062–4070, 1998.

IVANOVSKA, N.D. et al. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 145-147, 1995.

KROL, W. et al. Propolis: Properties, Application, and Its Potential. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

LESSA, M.M. et al. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.73, Nov/Dez, 2007.

LIMA, A.P. et al. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoreamento remoto orbital, no Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, p. 681-692, 2002.

LOFTY, M. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention,** v. 7, 2006.

MARINHO-JUNIOR, J.F. **Infecção Natural por *Leishmania* spp.em Pequenos Mamíferos Silvestres e Sinantrópicos Envolvidos na Manutenção da Leishmaniose Tegumentar Americana em Área Endêmica da Zona Da Mata Norte de Pernambuco, Brasil**. 2010. 77f. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

MEDEIROS, I.M.; NASCIMENTO, E. L. T.; HINRICHSEN, S. L. Leishmanioses (Visceral e Tegumentar). In: HINRICHSEN, S. L. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 398-409, 2005.

NEGRÃO, G.N.; FERREIRA, M.E.M.C. Considerações sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana e sua expansão no território Brasileiro. **Revista Percurso - NEMO Maringá**, v.6, n.1 , p.147- 168, 2014.

NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana.** 12 ed. SãoPaulo: Editora Atheneu; 2011.

ORSATTI, C.L. et al. Propolis Immunomodulatory Action In Vivo on Toll-Like Receptors 2 and 4 Expression and on Pro-Inflammatory Cytokines Production in Mice. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1141–1146, 2010.

ORSI, R.O. et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 6, p. 205–219, 2000.

PEARSON, R.D.; STEIGBIGEL, R.T. Phagocytosis and killing of the protozoan Leishmania donovani by human polymorphonuclear leukocytes. **J Immunol.** v.127, n.4, p.1438-1443, 1981.

PIGOTT, D.M. et al. Global distribution maps of the leishmaniases. **eLife**, 3:e02851; 2014.

QADOUMI; BECKER. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Infect Immun.** v.70, p.4638–4642, 2002.

QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A. Funções Biológicas do Óxido Nítrico. **Química Nova**, v. 22, p. 4, 1999.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous *Leishmania*sis. **Lancet Infect Dis,** v. 7, n. 9, p. 581-96, Sep 2007. ISSN 1473-3099 (Print) 1473-3099.

ROBERTS, M.T.M. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**,75-76, 115–130, 2006.

ROBERTS, M.T. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **Br Med Bull.** 2006.

RODRIGUES, A. M. et al. Fatores Associados ao Insucesso do Tratamento da Leishmaniose Cutânea com Antimoniato de Meglumina. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.39, n.2, p.139-145, 2006.

RODRIGUES, O.R. et al. Identification of regulatory T cells during experimental Leishmania infantum infection. **Immunobiol.**, v.214, p.101–111, 2009.

SERBINA, N.V. et al. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. **Annual Review of Immunology,** v. 26, p. 421–452, 2008.

SFORCIN, J.M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 73, p. 243-249, 2000.

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

SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology,** v. 133, p. 253–260, 2011.

SHI, C.; PAMER, E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature**, v. 11, 2011.

SILVA, S.S. et al. Brazilian Propolis Antileishmanial and Immunomodulatory Effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** 2013.

SILVEIRA, F.T. et al. REVISÃO SOBRE A PATOGENIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NA AMAZÔNIA, COM ÊNFASE À DOENÇA CAUSADA POR *Leishmania (V.) braziliensis* E *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, v.22, 2008.

SILVEIRA, T.G. et al. The laboratory diagnosis and epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Parana State, southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 32, p.413-23, 1999.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (Brasil).

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - **Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net.** Disponível em:http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def. Acesso em 01 jul 2015.

VIEIRA, E.L.M. et al. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. **Parasite Immunology**, v. 35, p. 65–72, 2013.

VIGÁRIO, A.M. et al. Regulatory CD4+CD25+Foxp3+ T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria. Int. J. **Parasitol.** v.37, p.963–973, 2007.

WHO, World Health Organization, Media Centre, Leishmaniasis, Fact sheet N°375, February 2015.

4. **PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

4.1 Artigo Científico

Brazilian propolis modulates leishmania-infected human mononuclear cells *in vitro*

Ana Paula Fortes dos Santos Thomazelli[a]; Carolina Panis[b]; Tatiane Marcusso Orsini[a]; Allan Henrique Depieri Cataneo[a]; Fernanda Tomiotto-Pelissier[a]; Milena Menegazzo Miranda[a;] Suelen Santos da Silva[a]; Luiz Antonio Custódio[c]; Vera Lúcia Hideko Tatakihara[c]; Maria Angélica Ehara Watanabe[a]; Juliano Bordignon[d]; José Maurício Sforcin[e]; Idessania Nazareth Costa[a]; Ionice Felipe[a]; Wander Rogério Pavanelli[a]; Ivete Conchon-Costa[*a].

[a] Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. Rodovia Celso Garcia Cid - Pr 445 Km 380, s/n - Campus Universitário, Londrina - PR, 86057-970. Telephone: +55 43 33714539.

[b] Laboratório de Mediadores Inflamatórios, Universidade do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. Street Maringá, 1200 - Vila Nova. Postal address: 85605-010. Telephone: +55 46 3520-4848.

[c] Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. Avenue Robert Koch, 60 – Vila Operária, Londrina – PR. Postal address: 86038-350. Telephone: +55 43 3371-2000.

[d] Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz/PR), Curitiba, Paraná, Brasil, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brazil. Professor Algacyr Munhoz Mader Street, Curitiba/PR, Brasil. Postal adress: 81350-010. Telephone: +55 41 3316-3230. Fax: +55 41 3316-3267.

[e] Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociência, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil. Rubião Junior District, s/n. Postal adress: 18618-970 - Botucatu, São Paulo. Telephone: +55 14 3811 6000.

[*] **E-mail:** conchon@uel.br**. Telephone +55 43 3371-4539.**

ABSTRACT

OBJECTIVES: The therapeutic options for American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) are very restricted and potentially toxic. Thus, the aim of this study was to investigate the immunomodulatory effects of propolis on ACL patients-derived peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

METHODS: PBMC were obtained from healthy donnors and patients diagnosed with ACL. Samples were incubated with Brazilian propolis and challenged with *Leishmania braziliensis*. Then, were perfomed the nitric oxide (NO) and cytokines (IL-2, IL-6 and IFN-γ) measurements, and the cells were used to immunocytochemical analyses for iNOS and cNOS, NFκB (p50) and TGF-β1. Additionally, we investigated the effect of propolis directly on promastigotes forms of *Leishmania braziliensis*.

KEY FINDINGS: Our data revealed that propolis inhibited the proliferative capacity of *Leishmania braziliensis* promastigotes. Regarding NO production, propolis treatment was not able to reverse the impairment of NO-axis caused by the parasite. Moreover, propolis did lead to the recovery of NFκB levels downregulated by leishmaniasis, as well as the upregulation of cytokines levels.

CONCLUSIONS: This data indicates that propolis can activate the proinflammatory cytokines production by leishmaniasis-derived PBMC, recovering these cells from immunosuppression induced by *Leishmania* parasites.

Key words: leishmaniasis, patients, propolis, NFκB

Introduction

American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is an infectious disesase caused by parasites of the genus *Leishmania* in vertebrate hosts. It is a zoonotic infection that can be transmitted to humans.[1, 2] The leishmaniasis parasites are spread worldwide in 88 countries and it is particularly prevalent in Brazil, India and some African countries.[3] This disease can manifest in the skin, mucocutaneous and visceral forms, depending on factors such as the host immune response and the parasite species. The mucocutaneous form predominates in *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection, which is characterized by infiltration, ulceration and destruction of the tissues of the nasal cavity, pharynx and larynx.[4]

Blood monocytes leave the bloodstream and migrate into tissues where they differentiate into macrophages after exposure to local growth factors such as cytokines and microbial products. The recruitment of monocytes is essential for the effective control and removal of viruses, bacteria, fungi and protozoa.[5]

Host resistance has been associated with activation of Th1 lymphocytes, with secretion of proinflammatory mediators such as interferon (IFN)-γ, interleukin (IL)-1β and tumor necrosis factor (TNF)-α. Subsequent activation of macrophages and production of other molecules, such as nitric oxide (NO), have also been reported and are responsible for the death of the parasite. On the other hand, the susceptibility to infection is related to the Th2 pattern, involving the secretion of IL-4 and IL-13.[6-10]

The chemotherapeutic treatment of ACL is still limited to the use of pentavalent antimonials such as the first-choice drugs N-methylglucamine (Glucantime®) and sodium stibogluconate (Pentostam), however the latter is not marketed in Brazil.[11] In addition, Glucantime® exerts cumulative toxicity which usually occurs after the second week of drug use. The main affected organs by this drug are heart, kidneys and liver, but it can also affect pancreas, and cause joint pain.[4] Besides, there are reports that parasites may be found in patients who are considered clinically healed with current chemotherapy. Therefore, the search for alternative drugs for the treating ACL is necessary, and natural compounds have emerged as potential therapeutic options for treating chronic pathologies, especially parasitic infections.

Recently, propolis has been one of the main studied natural products due its several biological effects, such as antimicrobial, immunomodulatory, antifungal, anti-inflammatory, and leishmanicidal activities.[12-15] Previous studies of our group have reported that the levels of IFN-γ mRNA were increased in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) derived from ACL patients after propolis treatment.[14] In addition, propolis also increased hydrogen peroxide generation by murine peritoneal macrophages.[16, 17]

Although there are some evidence that propolis may be effective against leishmaniasis, its effects on *Leishmania*-immunossupressed PBMC have not been investigated yet. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of propolis on NO production, TGF-β1, NFκB (p50), cNOS and iNOS expression and cytokine production (IL-2, IL-6 and IFN-γ) by human PBMC from healthy donors and patients diagnosed with ACL, treated with propolis and challenged with *L. braziliensis*.

Material and methods

Subjects

PBMC from healthy donors and patients diagnosed with leishmaniasis (by indirect immunofluorescence assay, biopsies and clinical parameters) were investigated. All individuals were treated in the Clinical Hospital of the State University of Londrina, Brazil. Patients (n=14) and healthy donors (n=9) signed a consent form. This work was approved by the Human Ethics Committee of the State University of Londrina and followed all institutional guidelines (257/08 - May 22, 2009). Clinicopathological data of patients are shown in Table 1.

Brazilian propolis extract

Brazilian propolis was produced by honeybee (*Apis mellifera L*.) colonies in the Beekeeping Section of the Lageado Farm, UNESP, Campus of Botucatu, Brazil, and was extracted and characterized using thin-layer chromatography (TLC), gas chromatography (GC), and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis in the same manner as previously reported.[18] The major constituents of Brazilian propolis were isolated and identified to be flavonoids (kaempferid, 5,6,7-trihydroxy-3,4′-dimethoxyflavone, aromadendrine-4′methyl ether), a prenylated p-coumaric acid and two benzopyranes (E- and Z-2,2-dimethyl-6-carboxyethenyl8-

prenyl-2H-benzopyranes), essential oils (spathulenol (2Z,6E)-farnesol, benzyl benzoate and prenylated acetophenones), aromatic acids (dihydrocinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid, 3,5-diprenyl-p-coumaric acid, 2,2-dimethyl-6-carboxy-ethenyl-8-prenyl-2H-1-benzopyran),and di-and triterpenes.[13]

Leishmania (_Viannia_) _braziliensis_ promastigotes

Promastigote forms of *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1987/M11272) were maintained in culture medium 199 (GIBCO Invitrogen), and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS GIBCO Invitrogen), 1M Hepes, 0.1% human urine, 0.1% L-glutamine, 10 µg/mL penicillin and streptomycin (GIBCO Invitrogen), and 10% sodium bicarbonate (complete medium for promastigotes – CMP). Cell cultures were incubated at 24ºC in 25cm^2 flasks.

Proliferation assay

Promastigote forms (1×10^6/mL) were incubated in CMP and treated with Brazilian propolis at final concentrations of 5 and 10 µg/mL for 7 days at 24ºC. Promastigotes were counted in a Neubauer chamber at the seventh day. Control promastigotes were cultured in CMP alone.

Human PBMC culture and treatments

Human PBMC obtained from the heparinized blood of patients and healthy control subjects were separated on Ficoll-Hypaque (Sigma) and maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), glutamine (0,1%, Invitrogen-Life Technologies) and penicillin-streptomycin (100 U/ml, Sigma). PBMC (5×10^5 cells/well) were incubated in 24 well plates containing 13 mm diameter glass coverslips in the absence or presence of propolis at 5 and 10 µg/ml for 24 h at 37°C and 5% CO_2. After propolis treatment, adherent PBMC were challenged with promastigote forms of *Leishmania braziliensis* (5:1) for 2 h and the supernatants were collected and kept at -76ºC until further analysis.

Determination of nitric oxide levels

NO determination was estimated as total nitrite content.[19] Briefly, supernatants of adherent PBMC from both patients and healthy controls treated or

not with propolis were deproteinized by adding $ZnSO_4$ (50 µL, 75 mM) and NaOH (70 µL, 55mM). The mixture was centrifuged (10.000 rpm, 5 minutes, 4ºC). The supernatant was recovered and diluted in glycine buffer solution (45 g/L pH 9.7). It was added cadmium granules previously activated with $CuSO_4$ (5mM) solution and left for 10 minutes at room temperature. After incubation time, 50µL of the supernatant aliquots were transferred to 96-well microplates and the same volume of Griess reagent was added. Calibration curve was prepared by dilution of $NaNO_2$ and the absorbances were measured at 550 nm in a microplate reader.

Immunocytochemistry for TGF-β1, NFκB, cNOS and iNOS

Immunocytochemistry for TGF-β1, NFκB (p50), cNOS and iNOS was performed on coverslip-adherent PBMC according to the protocol described previously, using the labeled streptavidin biotin method by LSAB KIT (DAKO Japan, Kyoto, Japan). The coverslips were incubated with 10% Triton X-100 solution for 1 hour, washed 3 times with PBS, and treated for 40 min at room temperature with 10% FBS. In addition, coverslips were incubated overnight at 4°C with the mouse primary antibodies (anti-TGF-β1, anti-NFκB (p50), anti-cNOS and anti-iNOS rabbit polyclonal antibodies at 1:300 dilution, Santa Cruz Biotechnology, USA). After secondary antibody treatment (2 hours, room temperature), horseradish peroxidase activity was visualized by adding H_2O_2 and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) for 5 min. At the last step, the sections were weakly counterstained with Harry's hematoxylin (Merck). For each case, negative controls were performed by omitting the primary antibody. Intensity and localization of immunoreactivities against primary antibody were examined on all coverslips using a photomicroscope (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). For image analysis, photomicroscopic colour slides of 20 representative areas (objective lens x 40) were digitally acquired. For determining a semi-quantitative scoring, images were evaluated by using the color de-convolution tool from the Image J software (NIH, USA). Pixels were scored as previously described[20] as high positive (3+), positive (2+), low positive (1+) and negative (0).

Cytokine determination

The Cytometric Bead Array Assay (CBA, BD Biosciences) was used to measure the levels of IL-2, IL-6 and IFN-γ in supernatants from adherent PBMC (patients and healthy controls) following the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

All analyses were conducted in triplicate. Statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad, USA). Results were expressed as arithmetic means and standard errors of the means. Differences among the groups were assessed by One-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Bonferroni's test or by Student's paired t-test. All data were checked using the Grubbs test (GraphPad Quickcalcs) to eliminate significant outliers ($p < 0.05$). A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Of the 14 patients with ACL, 12 were women aged between 33-71 years, with anti-*Leishmania* serology titles ranging from 1:40 to 1:320. It was possible to identify in the biopsies the presence of *Leishmania* parasites (15%) and inflammatory infiltrates (30%). Regarding the clinical observations, 30% of patients were diagnosed with the ulcerous form of the disease, while 70% presented mixed forms (ulcer, crusting of scarring lesions). Further, 40% of patients exhibited lesions in the lower limbs (Table 1).

First, we aimed at verifying if Brazilian propolis could exert leishmanicidal effects on promastigotes forms of *Leishmania braziliensis* (Figure 1). Data showed that both concentrations of propolis inhibited the proliferation of promastigotes significantly at the seventh day of treatment *in vitro* (control: 105.54 ± 17.4; 5 µg/mL of propolis: 50.34 ± 11.89; 10 µg/mL of propolis: 48.22 ± 8.08). Since propolis extract was efficient against *Leishmania* parasites, we conducted further experiments aiming to investigate its effect on human PBMC derived from healthy subjects and leishmaniasis patients. Leishmaniasis patients showed significantly reduced NO serum levels compared to healthy controls (Figure 2A – healthy controls: 167.30 ± 5.3 µM; patients: 81.60 ± 12.3 µM). Propolis treatment did not affect any variable in healthy PBMC (data not shown).Therefore, all data presented here regarding the treatment with propolis refers to leishmaniasis-derived PBMC and then infected with *L.braziliensis*.

Therefore, we investigated if Brazilian propolis was able to affect NO production in PBMC from patients, with or without *Leishmania braziliensis* parasites (Figure 2B). Propolis did not affect the capacity of patients-derived PBMC to produce NO in the presence of *Leishmania* promastigotes in compariston to untreated PBMC from patients (healthy control: 179.50 ± 21.90 μM; leishmanial PBMC plus propolis 5 μg/mL: 71.85 ± 20.50 μM; leishmanial PBMC plus propolis 10 μg/mL: 82.10 ± 29.16 μM). Thus, analyses were carried out using only propolis at 10 μg/mL.

Concerning immunocytochemistry labeling for NO axis, propolis treatment was not an efficient stimulator of cNOS expression in patient-derived PBMC challenged with *L.braziliensis* compared to healthy donors (healthy control: 0.60 ± 0.24 arbitrary units; untreated leishmanial PBMC: 0.80 ± 0.20 arbitrary units; leishmanial PBMC plus propolis 10 μg/mL: 0.60 ± 0.25 arbitrary units) neither iNOS expression (healthy control: 0.40 ± 0.25 arbitrary units; untreated leishmanial PBMC: 0.60 ± 0.25 arbitrary units; leishmanial PBMC plus propolis 10 μg/mL: 0.80 ± 0.37 arbitrary units) (Figure 2C and 2D).

Figure 3 shows the immunolabeling for NFκB (p50), showing that NFκB was downregulated in leishmaniasis-derived PBMC challenged with *L.braziliensis* compared to healthy PBMC (control: 1.75 ± 0.14 arbitrary units; leishmanial PBMC: 1.10 ± 0.16), which was significantly reversed by propolis 10 μg/mL treatment, reaching healthy PBMC levels (control: 1.75 ± 0.14 arbitrary units; Leishmanial PBMC: 2.30 ± 0.16).

Since an altered NFκB (p50) expression was seen after propolis exposure, we additionally measured the cytokine levels produced by PBMC (Figure 4). After propolis treatment, increased levels of all proinflammatory cytokines were observed in comparison to patients untreated PBMC: IL-2 (11.34 ± 0.34 ng/mL in patient PBMC plus propolis 10 μg/mL)(Figure 4A), IL-6 (90.91 ± 0.91 ng/mL in patient PBMC plus propolis 10 μg/mL) (Figure 4B), and IFN-γ (105.80 ± 5.83 ng/mL in patient PBMC plus propolis 10 μg/mL) (Figure 4C). TGF-β1 expression was also enhanced in untreated PBMC and patients PBMC after propolis exposure (control: 1.00 ± 0.21 arbitrary units; leishmanial PBMC: 0.90 ± 0.17; patient PBMC plus propolis 10 μg/mL: 1.85 ± 0.18 arbitrary units) (Figure 4D).

Discussion

According to the World Health Organization, leishmaniasis is in the list of the seventeen neglected tropical diseases,[21] meaning that few resources have been invested by governments aiming to develop effective treatments against this disease. Therefore, there is an urgent need for developing new therapies, since the available treatment is very toxic and fails frequently.[22] Thus, the use of natural compounds has emerged as a promising strategy[23] and in the present study we investigated the effects of Brazilian propolis as a putative immunomodulator for peripheral blood cells obtained from patients diagnosed with ACL.

Our data indicates that Brazilian propolis exerts a direct effect on *Leishmania* parasites, inhibiting promastigote proliferation. Previous findings of our group have demonstrated that Brazilian propolis is an antileishmanial product, displaying immunomodulatory effects on murine macrophages, regulating cytokines secretion.[15] Other studies have also confirmed the leishmanicidal properties of propolis[24-26] however, few studies have reported its effect on human PBMC obtained from patients bearing leishmaniasis.[14] Thus, we conducted this research by treating leishmaniasis-derived PBMC with Brazilian propolis, challenging with *L. braziliensis* and then evaluating its impact on nitric oxide axis and the production of cytokines.

We first determined the circulating NO levels in the serum of patients diagnosed with leishmaniasis and compared to those from healthy donors. NO is a metabolite produced from the substrate arginine by the activity of both constitutive (cNOS) and inducible (iNOS) nitric oxide synthase.[27] Notably, all components of the NO pathway are targets of *Leishmania* to evade of the immune response.[28] Our data demonstrated that leishmaniasis patients presented a depleted systemic NO, as well as reduced NO production by PBMC.

Impairment of NO production is well established in *Leishmania* infections; therefore, we investigated the impact of propolis affecting the NO axis from patients-derived PBMC challenged with *L.braziliensis*. Here, neither NO or NOS were reestablished in leishmaniasis-derived PBMC after propolis treatment. These data indicated that propolis was not able to overcome the NO depletion induced by *Leishmania* parasites on PBMC during leishmaniasis.

Propolis is a well known immunomodulatory product and may influence the cytokine production by mononuclear cells.[14] Therefore, we evaluated the effect of propolis treatment on cytokines produced by leishmaniasis-derived PBMC. Because cytokines may be affected by NFκB activity,[29] we investigated its expression after

propolis exposure. Our data demonstrated that propolis treatment significantly reversed NFκB downregulation promoted by leishmaniasis in human PBMC challenged with *L.braziliensis*, reaching the healthy control levels. Although previous reports indicate that propolis acts by reducing NFκB expression in experimental models,[29] no study has discussed its effects on human leishmaniasis after propolis intervention.

The upregulation of NFκB in PBMC suggested that cytokine production could be altered by propolis treatment, and this fact represents an advance in leishmaniasis research, because affected individuals are often immunosuppressed.[30] In fact, the proinflammatory cytokines IL-6 and IFN-γ were increased in PBMCs of patients after propolis treatment and challenged with *L.braziliensis*, as well as IL-2 and TGF-β1 levels. This data indicates that propolis extract may stimulate the Th1 pattern and favor the clonal expansion of lymphocytes during leishmaniasis. The predominance of a proinflammatory profile has been reported in PBMC from patients only after chemotherapeutic treatment or in self-healed subjects,[31] suggesting that propolis can exert a positive impact on the immune response against *Leishmania*. Propolis itself does not stimulate the production of IL-2, but can strongly stimulate its production in the presence of intracellular pathogens[32] which occurred in our experiment.

TGF-β is a cytokine strongly associated with wound-healing processes, and has been implicated in the immunopathogenesis of human cutaneous leishmaniasis.[33] Human macrophages are able to produce TGF-β during *Leishmania amazonensis* challenge, and it has been associated with the establishment of early infection in human cutaneous leishmaniasis[34]. Our data revealed that propolis extract enhanced TGF-β1 expression in *Leishmania*-derived PBMC challenged with *L.braziliensis*. Propolis may induce the expression of TGF-β1 in human immune cells, especially T regulatory lymphocytes.[35] It has been suggested that this cytokine is stimulated in leishmaniasis by amastigotes altogether with IL-6, and may contribute to the generation of a Th17 pattern.[36] Moreover, the overexpression of concomitant TGF-β and IFN-γ has been reported in granulomas from cutaneous leishmaniasis individuals bearing the intermediate form of the disease.[37] Furthermore, elevated TGF-β in PBMC or T cells was reported after propolis exposure, which is related to a strong iNOS inhibition.[13, 35] This fact helps to understand why the NO system was not affected by propolis in the present study.

Conclusion

Our findings indicated that propolis positively affected circulating mononuclear cells derived from leishmaniasis patients. Moreover, these findings reinforced that the host-parasite interactions may affect the immune response involving PBMC, and further indicates that the role of propolis in human PBMC infected with leishmaniasis may differ from the one found in experimental models.

References

1. Lessa MM *et al*. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2007; 73(6): 843-847.
2. Silveira FT *et al*. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania*. *Rev Para Med* 2008; 22(1): 9-20 .
3. Pigott DM *et al*. Global distribution maps of the leishmaniasis. *elife* 2014; 3:e02851
4. Medeiros IM *et al*. Leishmanioses (Visceral e Tegumentar). In: Hinrichsen, SL. DIP - Doenças infecciosas e parasitárias. Ed.Guanabara Koogan, Rio de janeiro, 2005.
5. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(11): 762-774.
6. Lima-Junior DS *et al*. Inflammasome-derived IL-1β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat Med* 2013; 19(7): 909-915.
7. Reis LC *et al.* Mecanismo imunológico da resposta celular e humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Pat Trop* 2006; 35(2): 103-115.
8. Reithinger R *et al*. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(9): 581-96.
9. Ji J *et al*. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 2003; 71(8): 4278-88.
10. Carvalho LP *et al.* Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol* 2007; 29(5): 251-8.
11. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. *Ministério da Saúde* 2009; 7ª ed.: 816.
12. Lotfy M. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asia Pac J Cancer Prev* 2006;7(1) 22-31.
13. Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol* 2007; 113(1): 1-14.
14. Amarante MK *et al*. The effect of propolis on CCL5 and IFN-γ expression by peripheral blood mononuclear cells from leishmaniasis patients. *J Pharm Pharmacol* 2012; 64(1): 154-60.
15. da Silva SS *et al*. Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 673058.
16. Orsi RO *et al*. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J Venom Anim Toxins* 2000; 6(2): 205-219.

17. Ivanovska N D *et al*. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity *in vivo*. *J Ethnopharmacol* 1995; 47(3): 145-7.
18. Sforcin JM *et al*. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *J Ethnopharmacol* 2005; 98(3): 301-5.
19. Panis C *et al*. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133(1): 89-97.
20. Chatterjee S *et al*. Quantitative immunohistochemical analysis reveals association between sodium iodide symporter and estrogen receptor expression in breast cancer. *PLoS ONE* 2013; 8(1):e54055.
21. World Health Organization. Control of the Leishmaniasis. WHO Technical Reports Series, 201, 2010.
22. Reveiz L *et al.* Interventions for american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. *PLoS One* 2013; 8(4):e61843.
23. Schmidt TJ *et* al. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part II. *Curr Med Chem* 2012; 19(14): 2176-228.
24. Pontin K *et al*. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitol Res* 2008;103(3): 487-92.
25. Santana LC *et al*. Brazilian brown propolis elicits antileishmanial effect against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Nat Prod Res* 2014; 28(5): 340-43.
26. Ferreira FM *et al*. Association of water extract of green propolis and liposomal meglumine antimoniate in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 2014; 113(2): 533-43.
27. Giudice A *et al*. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 2007; 7(7).
28. Gradoni L, Ascenzi P. Nitric oxide and anti-protozoan chemotherapy. *Parassitologia* 2004; 46(1-2): 101-3.
29. Búfalo MC *et al.* Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF-κB and MAPK activation in macrophages. *J Ethnopharmacol* 2013; 149(1): 84-92.
30. Kling JC, Körner H. Different regulatory mechanisms in protozoan parasitic infections. *Int J Parasitol* 2013; 43(6): 417-25.
31. de Assis Souza M *et al*. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microb Pathog* 2013; 57:27-32.
32. Fatahinia M *et al*. Propolis efficacy on TNF-α, IFN-γ and IL2 cytokines production in old mice with and without systemic candidiasis. *J Mycol Med* 2012; 22(3): 237-42.
33. Rodrigues FM *et al*. Expression of Foxp3, TGF-β and IL-10 in American cutaneous leishmaniasis lesions. *Arch Dermatol Res* 2014; 306(2): 163-71.
34. Barral A *et al.* Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol* 1995; 147(4): 947-54.
35. Ansorge S *et al*. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells. *Z Naturforsch C* 2003; 58(7-8): 580-9.

36. Gomes CM *et al*. *Leishmania braziliensis* amastigotes stimulate production of IL-1β, IL-6, IL-10 and TGF-β by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residents. *Parasite Immunol* 2014; 36(5): 225-31.
37. Díaz NL *et al*. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 2006; 31(1): 114-7.

Table

Table 1 – Clinicopathological data of patients. Patients diagnosed with American Cutaneous Leishmaniasis (by indirect immunofluorescence assay, biopsies and clinical parameters) from Clinical Hospital of the State University of Londrina, Brazil.

Parameter	Data
Total number of patients	14
Gender	85% female 15% male
Mean age in years (range)	51 (33-71)
Histopatological findings	15% with the parasite identified in the biopsy 30% inflammatory infiltrate presence
Mean titer of serology for Leishmaniasis	1:124
Type of lesions	30% ulcerous 70% ulcer, crusting or scarring
Site of infection	40% lower limbs 60% face and neck

Figures

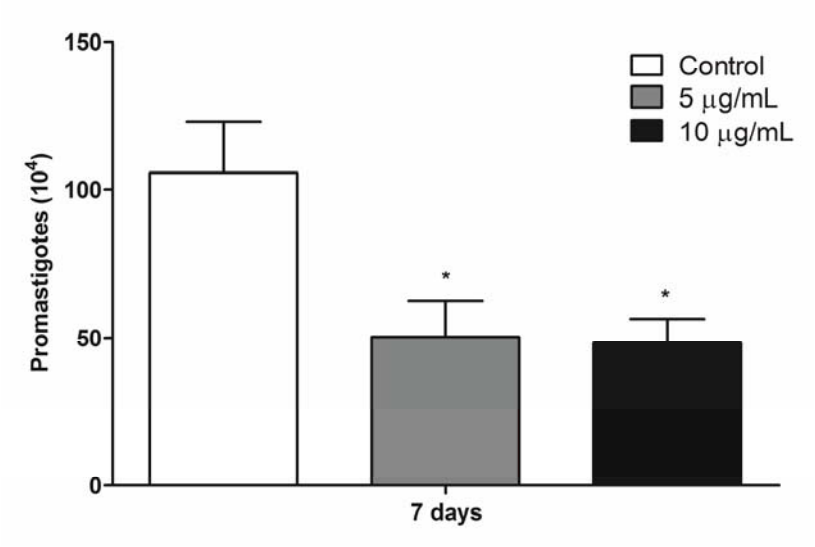


Figure 1 – *In vitro* leishmanicidal effect of Brazilian propolis on promastigotes of *L. braziliensis*. Promastigote forms of *L. braziliensis* treated with Brazilian propolis (5 and 10 ug/ mL) on the seventh day after treatment. The result is expressed as the mean ± SEM of three independent experiments. * P <0.05 compared with the control (One way ANOVA followed by Bonferroni's test).

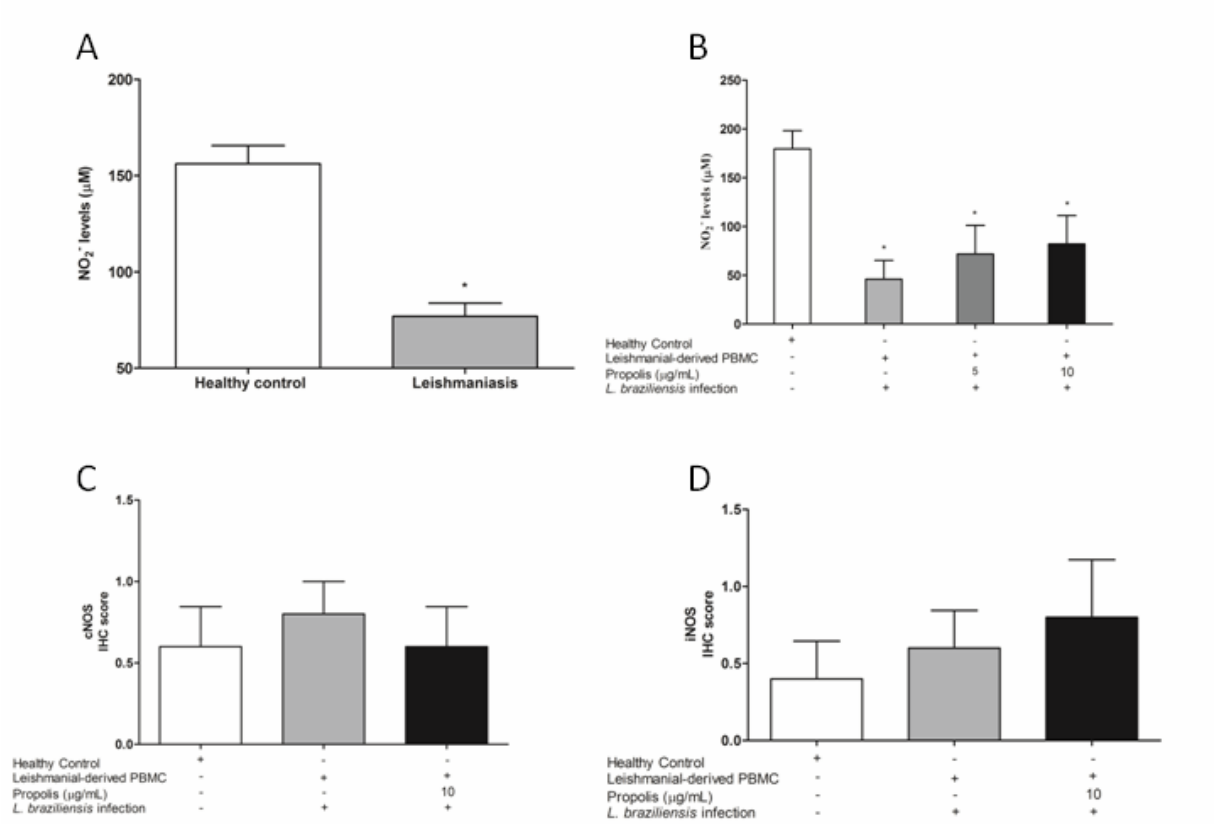


Figure 2 - Profile of NO in PBMC from healthy and ACL individuals. (A) Total production of NO in serum from healthy donors and from patients with ACL (* P <0.05 compared with the healthy control, Students-t Test). Adherent PBMC derived from healthy donors and patients with ACL treated with Brazilian propolis (5 or 10 *u*g/mL for 24 hours), infected or not with *L.braziliensis* (2h) were evaluated by (B) NO production (system cadmium-copper followed by Griess reaction), (C) expression of constitutive NOS (cNOS) and (D) inducible NOS (iNOS) by immunocytochemistry. The results are expressed as the mean ± SEM of groups. * P <0.05 compared with the healthy control (One way ANOVA followed by Bonferroni's test).

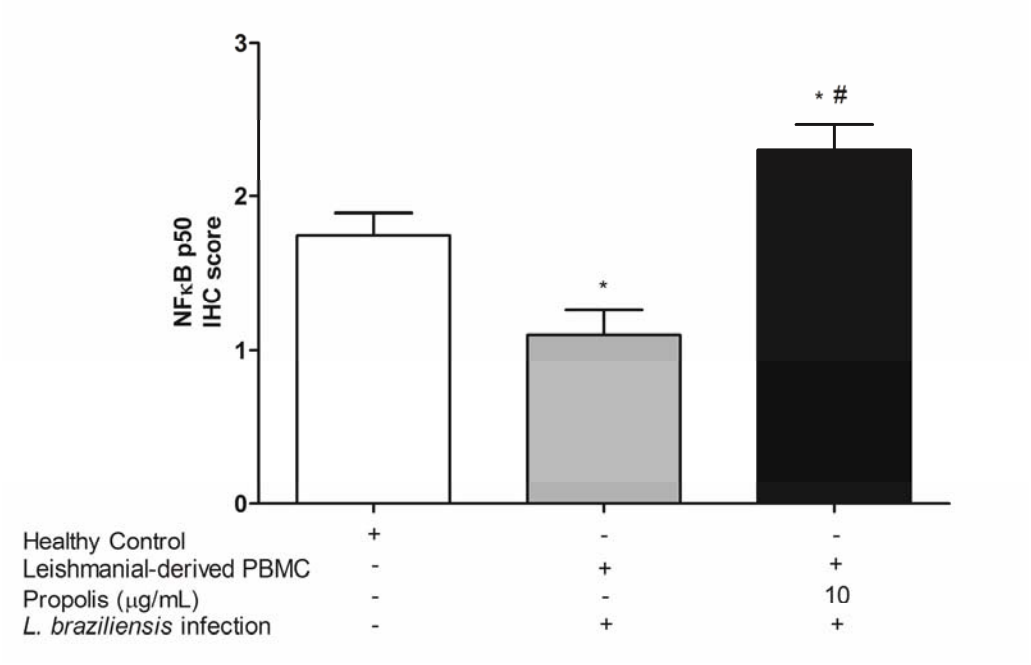


Figure 3- Brazilian propolis increases NFκB expression in PBMC of patients with ACL infected with *L. braziliensis*. Immunocytochemistry labelling of NFκB (p50) in adherent PBMC from healthy donors and ACL patients treated with 10 ug/mL of Brazilian propolis (24h) and infected with *L. braziliensis* (2h). The result is expressed as the mean ± SEM. * P <0.05 compared with the healthy control and # PBMC from ACL-patients infected with *L. braziliensis*. (One way ANOVA followed by Bonferroni's test).

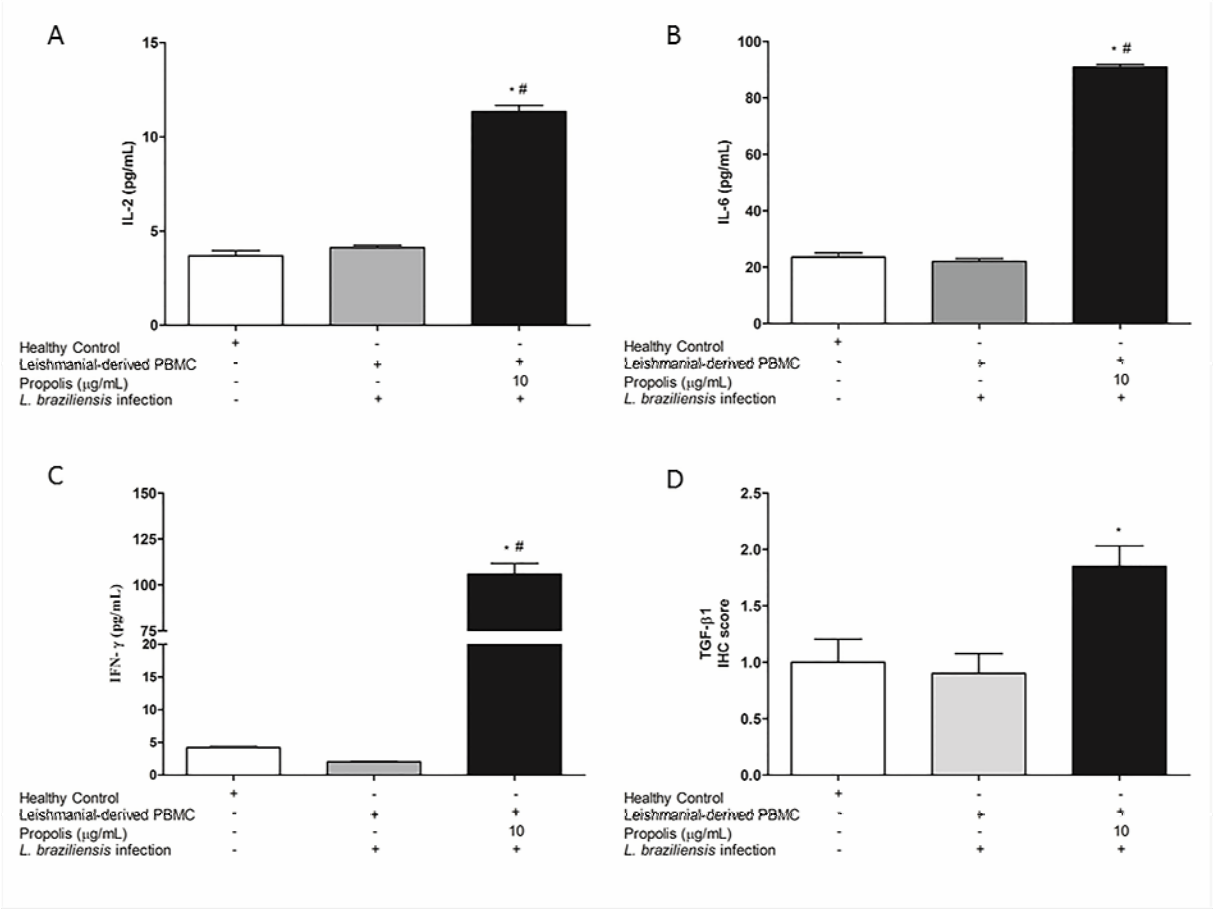
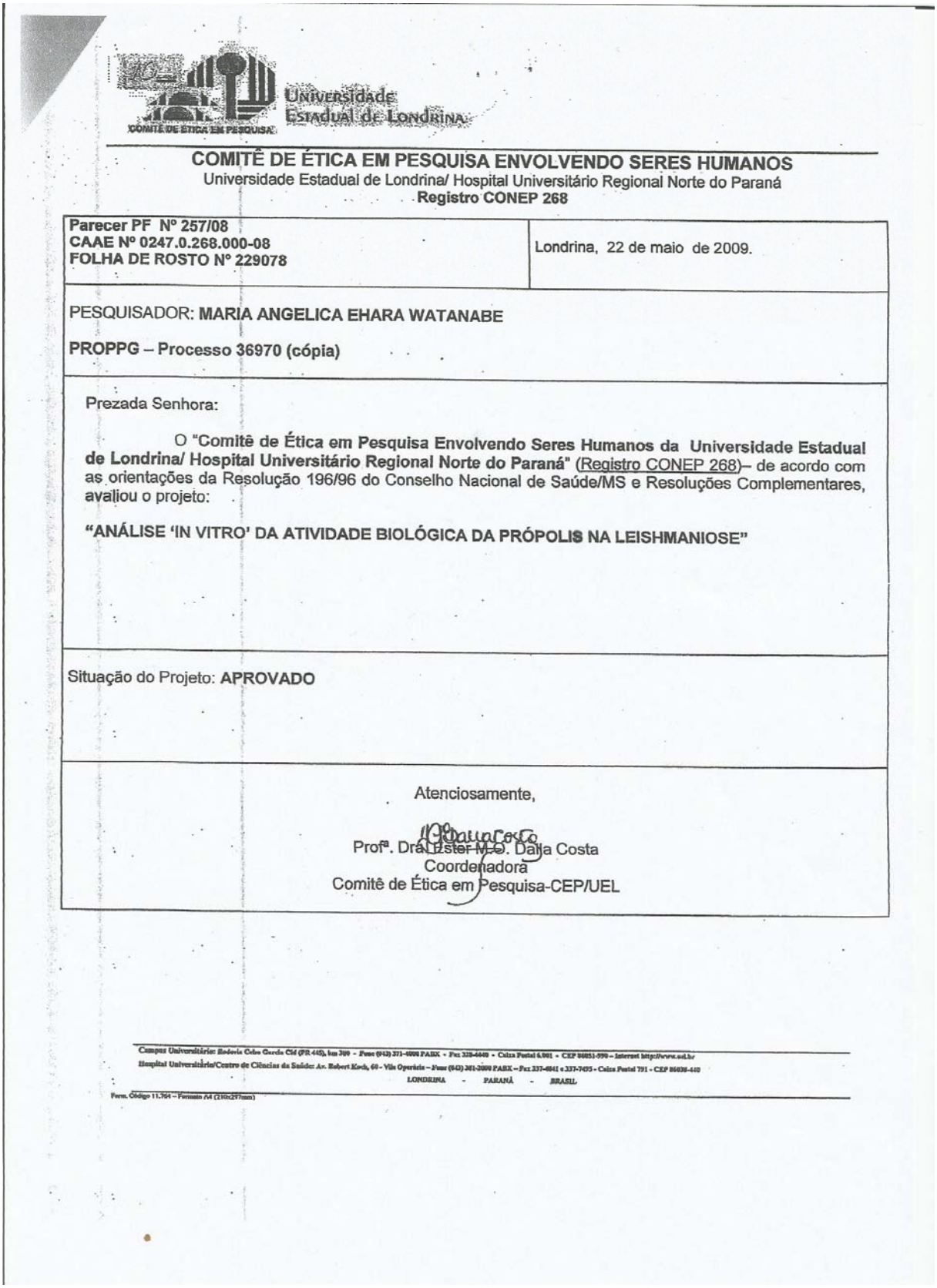


Figure 4 - Cytokine profile in PBMC from healthy donors and patients with ACL treated with Brazilian propolis and infected with *L. braziliensis.* PBMC from healthy donor and ACL patients, treated or not with Brazilian propolis (10 ug/mL for 24 hours) and infected with *L. braziliensis*. After infection (2 hours), the culture supernatant was collected and evaluated levels of (A) IL-2, (B) IL-6 (C) IFN-γ by CBA and (D) TGF-β by by immunocytochemistry. The result is expressed as the mean ± SEM. * P <0.05 compared with the healthy control and # PBMC from ACL-patients infected with *L. braziliensis*. (One way ANOVA followed by Bonferroni's test).

APÊNDICE A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina: Própolis



Universidade Estadual de Londrina
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná
Registro CONEP 268

Parecer PF Nº 257/08 **CAAE Nº 0247.0.268.000-08** **FOLHA DE ROSTO Nº 229078**	Londrina, 22 de maio de 2009.

PESQUISADOR: **MARIA ANGELICA EHARA WATANABE**

PROPPG – Processo 36970 (cópia)

Prezada Senhora:

O "**Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná**" (Registro CONEP 268)– de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"ANÁLISE 'IN VITRO' DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PRÓPOLIS NA LEISHMANIOSE"

Situação do Projeto: **APROVADO**

Atenciosamente,

Profª. Drª. Ester M.O. Daija Costa
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 371-4000 PABX - Fax 328-4440 - Caixa Postal 6.001 - CEP 86051-990 – Internet http://www.uel.br
Hospital Universitário/Centro de Ciências da Saúde: Av. Robert Koch, 60 - Vila Operária – Fone (043) 301-2000 PABX – Fax 337-4041 e 337-7455 - Caixa Postal 791 - CEP 86038-440
LONDRINA - PARANÁ - BRASIL

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE): Própolis

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: ANÁLISE *IN VITRO* DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PRÓPOLIS NA LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença que tem acometido muitos adultos e crianças. A doença aparece como uma lesão ulcerativa de bordas elevadas e indolor. Na nossa pesquisa utilizamos 5 ml de sangue das pessoas com leishmaniose para analisar as células do sangue na presença de estímulos como a própolis que pode influenciar na imunidade destas células. Assim, o pacientes estará contribuindo para o conhecimento da ação da própolis o que pode auxiliar no tratamento desta doença. Informamos que não haverá risco ao participar deste projeto, apenas o incômodo da picada da agulha. Não haverá nenhuma despesa ao participara deste projeto, como também não haverá compensação financeira.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. As professoras responsáveis são Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe e Profa. Dra. Ivete Conchon Costa.

As informações obtidas serão analisadas no total das informações, juntamente com dados de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação pessoal do paciente.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito deste projeto, e entendo que:

1- Com este estudo estarei contribuindo para o conhecimento da ação da própolis sobre o parasita que causa esta doença, o que pode vir a auxiliar no tratamento desta doença.
2- Minha participação consiste em doar 5 ml de sangue, não haverá risco ao participar deste projeto, apenas o incômodo da picada da agulha
3- Não sou obrigado a participar do projeto e posso sair do mesmo a qualquer momento.
4- O sigilo da minha participação será preservado.
5- Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo.

Londrina, ___ de _____ de

Nome do doador: _____ .

Assinatura do Doador: _____ .

Documento de identificação:_____ .

Endereço dos Coordenadores do Projeto: Comitê de Ética

Depto. Ciências Patológicas – Telefone 3371-4267
Universidade Estadual de Londrina
Londrina-Paraná

Telefone: 3371-2490
(Quinta-feira – Manhã)

CEP: 86051-970 TEL/FAX: (43) 3371-57284

APÊNDICE C - Normas da revista

Manuscript Preparation

General guidelines

- All contributing authors of a manuscript should include their full name, affiliation, postal address, telephone and fax numbers and email address on the cover page of the manuscript. One author should be identified as the corresponding author.
- For all manuscripts non-discriminatory (inclusive) language should be used.
- Authors are urged to be succinct, to use the minimum number of tables and figures necessary and to avoid repetition of information between these two media. Given the competition for space within the journal, the length of submission in relation to its likely contribution will be taken into account with regard to acceptability. Guidelines on length are provided below.
- The pages and lines of the manuscript must be numbered.

Ethical guidelines

- Authors should supply a conflict of interest statement with their submitted manuscript, detailing any financial or personal relationships that may bias their work, or a declaration that they have no conflicts of interest to disclose.
- Original research studies involving animals or human volunteers must include details of ethical approval. These should include:

  (a) the name of the Institutional Review Board or Ethics Committee that approved the study and all protocols,
  (b) the date of this approval and
  (c) the number of the certification or document which verified approval of the study.

  Identifying details of patients and study participants should be omitted. If identifying information is essential for scientific purposes, or if there is any doubt about the adequacy of the anonymity protection used, the patient (or parent/guardian) must give written informed consent for publication. Authors should provide this statement of informed consent upon submission of the manuscript.
- Manuscripts reporting randomised controlled trials should include a checklist and flowchart in accordance with the CONSORT Statement guidelines. The checklist should be submitted as a supplementary file, and the flowchart as a figure.
- Systematic reviews must be submitted together with a checklist and flowchart in accordance with the PRISMA guidelines. The checklist should be submitted as a supplementary file, and the flowchart as a figure.

The use of Natural Products

In studies that describe the use of natural products, the source organism must be authenticated by an expert and include reference to appropriate voucher specimens. All organisms must be validated taxonomically (in case of non-cultivated plant species http://www.ipni.org/ orhttp://www.theplantlist.org/ need to be used.

Chemical Composition of Extracts from Natural Products

All extracts from natural products should be fullly characterised to ensure that full details of the chemical composition is known. For this purpose, separative methods (e.g. HPLC) following by structural elucidation methods are required (e.g. spectroscopy). Furthermore, an HPLC chromatograph should be included, where appropriate.

Language

Manuscripts are accepted only in English. Authors whose first language is not English are recommended to ask a native speaker to proofread their manuscript before submission. There are also a number of services that provide mentoring, advice and copyediting to support authors unfamiliar with writing academic research papers for

publication in international journals. Authors are encouraged to make use of services such as AuthorAID if necessary.

Format

For ease of submission authors are welcome to submit new manuscripts in a single PDF file, in any format or layout as long as the manuscript is complete and can be used by reviewers. If you are invited to revise your manuscript, or if it is accepted, you will be asked to format your manuscript according to the journal layout style described on this page.

Original research papers

Original research papers should not exceed 4000 words.

Abstract

- Structured abstracts are required for all papers and should include objectives, methods, key findings and conclusions.
- Approximate length: 200 words

Keywords

- Three to six keywords should be supplied for all papers.

Introduction

- An introduction should provide a background to the study (appropriate for an international audience) and should clearly state the specific aims of the study. Please ensure that any abbreviations and all symbols used in equations are fully defined.
- Approximate length: 500-1000 words

Materials and Methods

- This section should describe the materials and methods used in sufficient detail to allow the study to be replicated. Please include details of ethical approval in this section.
- Approximate length: 500-1000 words

Results

- This section should provide detailed response rates. It is essential to include statistical analyses or other indicators to enable assessment of the variance of replicates of the experiments. Data should not be repeated in figures and tables.
- Approximate length: 1000-1500 words

Discussion

- The discussion section should summarise the main findings of the study, followed by a critique of the strengths and limitations of the research. The results should then be discussed in the context of international published literature and the contribution made to the field. Any policy limitations should be included.
- Approximate length: 1000 words

Conclusions

- A brief conclusions section should summarise the salient findings of the study. Authors are strongly advised to emphasise the contribution made to the field by their study in this section.
- Approximate length: 200 words

Tables

- Please keep the number of tables to a minimum.
- Tables should be numbered consecutively (Table 1, Table 2 etc) and each table must start on a separate page at the end of the manuscript.
- Each table must have a title. Each table legend, in paragraph form, should briefly describe the content and define any abbreviations used. If values are cited in a table, the unit of measurement must be stated.
- Tables should not be ruled.

Figures

- Please keep the number of figures to a minimum.
- Each figure must have a title. Each figure legend, in paragraph form, should briefly describe the content and define any abbreviations used. If values are cited in a figure, the unit of measurement must be stated. Graphs must have clearly labelled axes. A key may be included if appropriate.
- It is in the author's interest to provide the highest quality figure format possible. Please be sure that all imported scanned material is scanned at the appropriate resolution: 1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour.
- Files should be saved as one of the following formats: TIFF (tagged image file format), PostScript or EPS (encapsulated PostScript), and should contain all the necessary font information and the source file of the application (e.g. CorelDraw/Mac, CorelDraw/PC).
- Figures must be saved separate to text. Please do not embed figures in the paper file. The manuscript should indicate the position of the figures (e.g. see Figure 1) and all figures should be numbered consecutively in the order in which they appear in the paper. In multi-part figures, each part should be labelled (e.g. Figure 1(a), Figure 1(b)). The filename for a graphic should be descriptive of the graphic, e.g. Figure1, Figure2a.
- Authors must complete a Colour Work Agreement Form for any colour figures requiring payment. The form can be downloaded as a PDF* (portable document format) file from the home page. Completed forms must be sent by post/mail to: *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre, New Era Estate, Oldlands Way, Bognor Regis, West Sussex, PO22 9NQ. Authors should restrict their use of colour to situations where it is necessary on scientific, and not merely cosmetic, grounds. There are a limited number of colour pages within the journal's annual page allowance to be used at the Editor's discretion. *To read PDF files, you must have Acrobat Reader installed.

Acknowledgements and Funding

- Funding acknowledgements should be written in the following form: "This work was supported by the Medical Research Council [grant number xxx]"
- If the research has not been funded by any specific project grant, please include the statement: "This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors"

References

- References in the text are cited sequentially by number. All citations in the text must appear in the reference list and vice versa. The only exceptions to this are manuscripts not yet in press or published online, papers reported at meetings, or personal communications – these should be cited only in the text, not as a formal reference. Authors should get permission from the source to cite personal communications or unpublished work.
- At the end of the manuscript, references should be listed in numerical order as they appear in the text. Serial titles should be abbreviated in accordance with the standard approved abbreviations used by PubMed or BIOSIS. One-word titles are never abbreviated. Article identifiers, such as the Digital Object Identifier (DOI) or PubMed Unique Identifier (PMID), may be included as appropriate. State the references according to the format of the following examples:

Journal references

One author:

Szeto HH. Simultaneous determination of meperidine and normeperidine in biofluids. *J Chromatogr* 1976; 125: 503–510.

Two authors:
Vu-Duc T, Vernay A. Simultaneous detection and quantitation of O6-monoacetylmorphine, morphine and codeine in urine by gas chromatography with nitrogen specific and/or flame ionization detection. *Biomed Chromatogr* 1990; 4(2): 65–69.

Three or more authors: Huestis MA et al. Monitoring opiate use in substance abuse treatment patients with sweat and urine drug testing. *J Anal Toxicol* 2000; 4(Suppl.3): 509–521.
Article in press:
Ladines CA et al. Impaired renal D1-like and D2-like dopamine receptor interaction in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008 (in press).
Electronic publication ahead of print:
Teeuwen PHE. Doppler-guided intra-operative fluid management during major abdominal surgery: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Pract* (accessed 21 November 2007, epub ahead of print).
Online serial:
Margolis PA et al. From concept to application: the impact of a community-wide intervention to improve the delivery of preventive services to children. Pediatrics [online] 2001; 108:e42.
www.pediatrics.org/cgi/content/full/108/3/e42 (accessed 20 September 2001).

Corporate author:
The Cardiac Society of Australia and New Zealand . Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996; 164: 282–284.
Anonymous author:
Anon. Coffee drinking and cancer of the pancreas. *BMJ* 1981; 283: 628.
Author with prefix and/or suffix in their name:
Humphreys Jnr, Sir Robert and Adams T. Reference style in the modern age. *J Bib Cit* 2008; 1: 1–10.
Article not in English:
Sokolov S et al. [Studies of neurotropic activity of new compounds isolated from *Rhodiola rosea* L.] Khim Farm Zh 1985; 19: 1367–1371 [in Russian].

Book references

Book by a single author or group of authors working together as a single author:
Cole MD, Caddy B. *The Analysis of Drugs of Abuse: An instruction manual*, 2nd edn. New York : Ellis Horwood, 1995.
An edited book:
Hoepfner E et al. eds. *Fiedler Encyclopedia of Excipients for Pharmaceuticals*, Cosmetics and Related Areas, 5th edn. Aulendorf: Editio Cantor Verlag, 2002.
An article in an edited book:
Sanders PA. Aerosol packaging of pharmaceuticals. In: Banker GS, Rhodes CT , eds. *Modern Pharmaceutics*. New York : Marcel Dekker, 1979: 591–626.
A book in a series:
Scott RPW. Chromatographic Detectors – *Design, Function, and Operation*. Chromatographic Science Series, 73, Cazes J, ed. New York : Mercel Dekker, 1966.

Other references

Article in conference proceedings:
Dumasia MC et al. LC/MS analysis of intact steroid conjugates: a preliminary study on the quantification of testosterone sulphate in equine urine. In: Auer DE, Houghton E, eds. *Proceedings of the 11th International*

Conference of Racing Analysts and Veterinarians. Newmarket : R & W Publications (Newmarket), 1966: 188–194.

Standard:

ISO 9002. *Quality Systems – Model for Quality Assurance in Production, Installation and Servicing Quality Management System*. Geneva : ISO, 1994.

Offline database or publication:

Dictionary of Natural Products. CD-ROM. London : Chapman & Hall/CRC, 2003.

Milazzo S et al. Laetrile treatment for cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, issue 2. London : Macmillan, 2006.

Dissertation:

Youssef NM . School adjustment of children with congenital heart disease. Pittsburgh , Pennsylvania : University of Pittsburgh , 1988 (dissertation).

APÊNDICE D - Submissão do artigo

Journal of Pharmacy and Pharmacology

Dashboard

NEW MANUSCRIPTS - Authors are welcome to submit new manuscripts in a single PDF file, in any format or layout as long as it can be used by reviewers. If you are invited to revise your manuscript you will be asked to adhere closely to the 'Instructions for Authors' accessed via the Journal Home Page on the Instructions & Forms tab above.
- To **start the submission** of a new manuscript, click on the star below.
- To **continue** the submission of a new manuscript already in progress, click on "Unsubmitted Manuscripts" link below, then click on the "Continue Submission" button.

REVISED MANUSCRIPTS

- To **start the submission** of a revised manuscript, either click on the revision link, or look for "Manuscripts with Decisions" below and click on the "Create Revision" button.
- To **continue** after an interruption the submission of a revised manuscript look for "Revised Manuscripts in Draft" below and click on the "Continue Submission" button.

FIXING FAULTY SUBMISSIONS

To **submit again after a paper has been unsubmitted/sent back to you** (you will have been notified of this), look for "Unsubmitted Manuscripts" below and click on the "Continue Submission" button.

MANUSCRIPTS ACCEPTED FOR FIRST LOOK

If your paper is accepted but minor updates are required before the final files can be sent to production you will be notified of this and will find the paper listed under "Manuscripts Accepted for First Look". Click the link and then click "submit updated manuscript". Further instructions on how to upload your final files can be found on the screen that follows.

- Clicking on the various manuscript status links under "My Manuscripts" will display a list of all the manuscripts in that status at the bottom of the screen.

Be sure to read Wiley's Guidelines on Publishing Ethics before submitting your paper.

My Manuscripts

- **0** Unsubmitted and Manuscripts in Draft
- **0** Revised Manuscripts in Draft
- **0** Submitted Manuscripts
- **0** Manuscripts with Decisions
- **1** Manuscripts I Have Co-Authored
- **0** Withdrawn Manuscripts
- **0** Manuscripts Accepted for First Look
- **0** Invited Manuscripts

Author Resources

Click here to submit a new manuscript

Click here to send your manuscript to Wiley English Language Editing Service

The English Language Editing Service can help to ensure your paper is clearly written in standard, scientific English language appropriate to your discipline. Visit our site to learn about the options. Using the Wiley English Language Editing Service does not guarantee that your paper will be accepted for publication.

NOTE: Using this link will NOT submit your manuscript to the journal - it opens a new window for the English Language Editing Service.

This section lists the subjects of the five most recent e-mails that have been sent to you regarding your submission(s). To view an e-mail, click on the link. To delete an e-mail from this list, click the delete link.

Manuscripts I Have Co-Authored

Manuscript ID	Manuscript Title	Date Created	Date Submitted	Status
JPP-15-0369	Brazilian propolis modulates Leishmania-infected human mononuclear cells in vitro [View Submission]	03-Jun-2015	04-Jun-2015	EIC: Jones, David ADM: Gabronino, Shenna Marie Under Review

top

1

Gmail by Google

Ana Paula Fortes dos Santos Thomazelli <afortes90@gmail.com>

Journal of Pharmacy and Pharmacology - Account Created in ScholarOne Manuscripts [email ref: SE-4-a]

1 mensagem

JPPedoffice@wiley.com <JPPedoffice@wiley.com> 4 de junho de 2015 01:34
Para: afortes90@gmail.com

04-Jun-2015

Dear Miss Thomazelli:

A manuscript titled Brazilian propolis modulates Leishmania-infected human mononuclear cells in vitro (JPP-15-0369) has been submitted by Miss Ana Paula Thomazelli to Journal of Pharmacy and Pharmacology.

You are listed as an author for this manuscript and so the online peer-review system, ScholarOne Manuscripts, has automatically created a user account for you. Your Journal of Pharmacy and Pharmacology - ScholarOne Manuscripts account information is as follows:

Site URL: https://mc.manuscriptcentral.com/jppharm
USER ID: afortes90@gmail.com
PASSWORD: For security reasons your password is not contained in this email. To set your password click the link below.

https://mc.manuscriptcentral.com/jppharm?URL_MASK=09c322b4588148fe82f973c24849c1b0

You can use the above USER ID and PASSWORD (once set) to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. You may log in to https://mc.manuscriptcentral.com/jppharm to check and update your account information via the edit account tab at the top right.

Thank you for your participation.

Sincerely,
Journal of Pharmacy and Pharmacology Editorial Office

Links to ScholarOne's Terms and Conditions of Use and Privacy Policy can be found at the bottom of the page on every ScholarOne Manuscripts site.

2