



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALEX BARBOSA ALVES

**EFEITO SINÉRGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO
E NANOPARTÍCULAS DE PRATA SOBRE *Leishmania
amazonensis* IN VITRO**

Londrina
2020

ALEX BARBOSA ALVES

**EFEITO SINÉRGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO
E NANOPARTÍCULAS DE PRATA SOBRE *Leishmania
amazonensis* IN VITRO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Ivete Conchon Costa.

Londrina
2020

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

A474 Alves, Alex.
Efeito sinérgico do óleo essencial de orégano com nanopartículas de prata sobre *Leishmania amazonensis* / Alex Alves. - Londrina, 2020.
69 f. : il.

Orientador: Ivete Conchon Costa.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2020. Inclui bibliografia.

1. *Leishmania amazonensis* - Tese. 2. óleo essencial de orégano - Tese. 3. nanopartículas de prata - Tese. 4. Sinergismo - Tese. I. Conchon Costa, Ivete . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 576.8::61

ALEX BARBOSA ALVES

**EFEITO SINÉRGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO
E NANOPARTÍCULAS DE PRATA SOBRE *Leishmania
amazonensis* IN VITRO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Ivete Conchon Costa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Danielle Lazzarin Bidóia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 17 de abril de 2020.

Dedico este trabalho a minha família, minha esposa Jaqueline que sempre me apoiou e esteve a meu lado e meu filho Pedro que seu nascimento durante o percurso deste trabalho me incentivou e me mostrou o melhor lado da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me abençoou com saúde e vontade de aprendizado para realizar este trabalho.

A minha família em especial minha esposa Jaqueline e meu filho Pedro que sempre me apoiaram e tiveram paciência comigo.

A minha orientadora Profa. Dra. Ivete Conchon Costa por ter me dado a oportunidade de ingressar no seu laboratório de parasitologia onde pude crescer em minha carreira científica.

Ao Prof. Dr. Wander Rogerio Pavanelli por compartilhar seus conhecimentos, por permitir conhecer a ciência em seu laboratório.

Aos demais docentes da área de parasitologia, Profa. Dra. Idessania Nazareth da Costa e Prof. Dra. Danielle Lazarin Bidóia por contribuir com seus conhecimentos.

Aos amigos do laboratório Milena Menegazzo, Fernanda Tomiotto, Amanda Carloto, Taylon Silva, Manoela Gonçalves, Bruna Bortoleti, Ana Carolina Jacob, Raquel Sanfelice, Elaine Siqueira, Mariana Detoni, Virginia Concato e Ana Flavia Ganazza por toda ajuda durante os experimentos, por todo o conhecimento científico e por toda colaboração.

Aos integrantes da banca de qualificação pelo tempo e dedicação despendidos na correção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gerson Nakazato e Profa. Dra. Renata Kobayashi por gentilmente ceder os compostos óleo essencial de orégano e nanopartículas biogênica de prata para a realização desses experimentos.

A todos que diretamente ou indiretamente acreditaram neste trabalho e contribuíram para sua realização.

"Não a nós, Senhor, não a nós, mas pela Glória de teu nome" Slm 115:1

Alves, Alex Barbosa. **Efeito sinérgico do óleo essencial de orégano com nanopartículas de prata sobre *Leishmania amazonensis***. 2020. 70 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*. O tratamento atual apresenta vários problemas como a dificuldade de administração, baixa eficiência, toxicidade e resistência dos parasitos, levando a busca de novas substâncias ou associações como terapias alternativas. Produtos naturais como o óleo essencial de orégano (OEO), extraído da planta selvagem *Origanum vulgare*, possui uma gama de efeitos já estudados, como ação antiparasitária, antibacteriana e antifúngica. A associação do OEO com nanopartículas de prata (AgNp), que também possuem ações antimicrobianas, apresentaram efeitos sinérgicos em bactérias. Entretanto, não havia estudos desta associação em *Leishmania*. Portanto, o presente estudo investigou o efeito sinérgico leishmanicida da associação do OEO com AgNp sobre *L. amazonensis*. Para isso, foram utilizadas diferentes proporções de associação do OEO com AgNp para obtenção de uma dose que eliminasse 50% dos parasitos. Os dados obtidos das doses das combinações de OEO+AgNp foram avaliadas matematicamente verificando o efeito sinérgico entre elas. O ensaio antipromastigota foi realizado através da contagem em câmara de Neubauer, onde verificamos o efeito antileishmania do tratamento. Após isso, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), foram observadas alterações morfológicas e ultraestruturais em promastigotas tratadas com a associação OEO+AgNp, como rugosidade da superfície celular, arredondamento e redução do corpo celular, flagelo reduzido, extravazamento de conteúdo citoplasmático, inchaço mitocondrial, acúmulo de corpos lipídicos e de vacúolos autofágicos no citoplasma, desorganização do DNA nuclear e danos à membrana plasmática. Além disso, o tratamento com a associação induziu em promastigotas um aumento de espécies oxidantes, despolarização mitocondrial e exposição da fosfatidilserina, que acarretaram na morte celular por apoptose tardia. Em seguida, verificamos o efeito anti-amastigota da associação em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e a formação de marcadores microbicidas como óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs). Ao final, conclui-se que a associação de OEO+AgNp possui um efeito sinérgico em sua ação leishmanicida e induz a morte de promastigotas por um processo de apoptose tardia e apresenta um efeito anti-amastigota através da produção de EROs e NO por macrófagos infectados. Assim, a associação OEO+AgNp se apresenta como uma potencial alternativa de tratamento em uma realidade onde fármacos tóxicos e de baixa eficiência são utilizados no tratamento de LTA.

Palavras-chave: leishmaniose; efeito leishmanicida; associação de compostos; morte celular; apoptose-like.

Alves, Alex Barbosa. **Synergistic effect of oregano essential oil with silver nanoparticles on *Leishmania amazonensis***. 2020. 70 f. Dissertation (Master's degree in Clinical and Laboratory Pathophysiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

American Cutaneous Leishmaniasis (ATL) is a zoonosis caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The current treatment presents several problems such as the difficulty of administration, low efficiency, toxicity and resistance of the parasites, leading to the search for new substances or associations as alternative therapies. Natural products such as oregano essential oil (OEO), extracted from the wild plant *Origanum vulgare*, have a range of effects already studied, such as antiparasitic, antibacterial and antifungal action. The association of OEO with silver nanoparticles (AgNp), which also have antimicrobial actions, showed synergistic effects in bacteria. However, there were no studies of this association in *Leishmania*. Therefore, the present study investigated the leishmanicidal synergistic effect of the association of OEO with AgNp on *L. amazonensis*. For that, different proportions of association of OEO with AgNp were used to obtain a dose that eliminated 50% of the parasites. The data obtained from the doses of the combinations of OEO+AgNp were evaluated mathematically, verifying the synergistic effect between them. The antipromastigote assay was performed by counting in a Neubauer chamber, where we verified the antileishmania effect of the treatment. Thereafter, by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM), morphological and ultrastructural changes were observed in promastigotes treated with the association OEO+AgNp, such as cell surface roughness, rounded shape and reduction of cell body size, reduced flagellum, leakage of cytoplasmic contents, mitochondrial swelling, accumulation of lipid-storage bodies and autophagic vacuoles in the cytoplasm, DNA disorganization in nuclei and damage to the plasma membrane. In addition, treatment with the association induced in promastigotes an increase in oxidant species, mitochondrial depolarization and exposure of phosphatidylserine, which resulted in cell death by late apoptosis. Then, we verified the anti-amastigote effect of the association in macrophages infected with *L. amazonensis* and the formation of microbicidal markers such as nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS). Finally, it is concluded that the association of OEO+AgNp has a synergistic effect in its leishmanicidal action and induces the death of promastigotes by a process of late apoptosis and presents an anti-amastigote effect through the production of ROS and NO by infected macrophages. Thus, the association OEO+AgNp presents itself as a potential treatment alternative in a reality where toxic and low-efficiency drugs are used in the treatment of ATL.

Keywords: leishmaniasis; leishmanicidal effect; association of compounds; cell death; apoptosis-like.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATP	Adenosina trifosfato
B.O.D.	Bioquimic Oxygen Demand
CI	Combination Index
DMSO	Dimetilsulfóxido
GP63	metaloproteinase gp63 kDa
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FDA	Food and Drug Administration
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon gama
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCM	Leishmaniose cutâneomucosa
LPG	Lipofosfoglicana
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NO	Nitric oxide
AgNp	Nanopartícula de prata
OEO	Óleo essencial de orégano

OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SBF	Soro Bovino Fetal
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Leishmanioses	14
1.2	Ciclo Biológico do Protozoário.....	15
1.3	Interação Parasito Hospedeiro na LTA	17
1.4	Morte Celular.....	17
1.5	Tratamentos	18
1.6	Óleo Essencial de Orégano.....	19
1.7	Nanopartícula Biogênica de Prata.....	20
1.8	Associação de Compostos.....	22
2	JUSTIFICATIVA	24
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo Geral	25
3.2	Objetivos Específicos	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Animais e Aspectos Éticos	26
4.2	Manutenção de Promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	26
4.3	Óleo Essencial de Orégano.....	26
4.4	Nanopartículas Biogênicas de Prata	30
4.5	Atividade do OEO, AgNp e da Associação sobre Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	26
4.6	Viabilidade de Macrófagos Peritoniais	27
4.7	Construção dos Isobogramas Utilizando o Método de Proporções Fixas das Combinações de AgNp e OEO	28
4.8	Cálculo do Índice de Combinação.....	28
4.9	Análise Morfológica e Ultraestrutural de Promastigotas por Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	28
4.10	Deteção de Espécies Reativas de Oxigênio Total.....	29

4.11	Detecção de Óxido Nítrico	29
4.12	Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial	30
4.13	Avaliação de Corpos Lipídicos	30
4.14	Avaliação de Vacúolos Autofágicos	31
4.15	Determinação da Exposição de Fosfatidilserina.....	31
4.16	Ensaio Antiamastigota.....	31
4.17	Determinação de Nitrito como Estimativa dos Níveis de Óxido Nítrico em Macrófagos Infectados com <i>L. amazonensis</i>	32
4.18	Produção de Espécies Reativas de Oxigênio em Macrófagos Infectados com <i>L. amazonensis</i>	32
4.19	Análises Estatísticas	32
5	RESULTADOS	33
5.1	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	33
6	CONCLUSÕES	61
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
	ANEXO	69
	Comitê de ética em experimentação animal.....	69

1 INTRODUÇÃO

2

3 1.1 LEISHMANIOSES

4 As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias consideradas uma das
5 seis doenças infecto-parasitárias de maior importância pela Organização Mundial da
6 Saúde (OMS), constituindo um grave problema de saúde pública, com registros na
7 maioria dos estados brasileiros (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

8 Os protozoários causadores da leishmaniose pertencem a família
9 Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida e gênero *Leishmania*. Nas Américas
10 espécies de *Leishmania* já foram identificadas, dentre essas, sete no Brasil. Estas
11 espécies são pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*: *L. (V.) guyanensis*,
12 *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) braziliensis* e *L.*
13 *(L.) amazonensis* (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). O protozoário é
14 transmitido ao ser humano durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos fêmeas
15 infectadas, pertencentes a família Psychodidae, sub-família Psychodinae, gênero
16 *Lutzomyia*, com o envolvimento de várias espécies, sendo conhecidos no Brasil como
17 mosquito palha, birigui e tatuquira (BRASIL, 2015; DE BRITO et al., 2012).

18 A epidemiologia da leishmaniose depende das características das espécies
19 de parasitos, dos flebotomíneos, características ecológicas dos locais de transmissão,
20 exposição atual e passada da população humana ao parasito e comportamento
21 humano. Cerca de 70 espécies animais, incluindo seres humanos, foram encontradas
22 como hospedeiros naturais e reservatórios de parasitos do gênero *Leishmania*
23 (WHO/PAHO, 2019; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; ARENAS et al., 2017).

24 As diversas manifestações clínicas da leishmaniose são resultado da
25 interação entre a espécie do parasito infectante e a resposta imune do hospedeiro,
26 podendo ser classificada em relação ao local acometido como: leishmaniose cutânea
27 (LC), leishmaniose cutaneomucosa (LCM), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e
28 leishmaniose visceral (LV) (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). No Brasil, as
29 manifestações clínicas que envolvem a pele e mucosas, são denominadas
30 leishmaniose tegumentar americana (LTA) (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

31 A LC é a forma mais comum de leishmaniose, abrangendo em torno de 95%
32 dos casos. As principais manifestações clínicas são lesões de pele, principalmente
33 úlceras, nas partes expostas do corpo, deixando cicatrizes ao longo da vida e
34 incapacidade ou estigma graves (BRASIL, 2015).

1 A LCM inicialmente apresenta lesões semelhantes a LC, evoluindo
2 posteriormente à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca
3 e garganta. Mais de 90% dos casos de LCM no mundo ocorre na Bolívia, Brasil,
4 Etiópia e Peru (WHO/PAHO, 2019; BRASIL, 2015).

5 A LCD é caracterizada por lesões difusas não ulceradas, distribuídas
6 amplamente na pele, contem grande número de formas amastigotas, com a
7 disseminação do parasito por meio de vasos linfáticos ou migração de macrófagos
8 vacuolizados repletos de parasitos, assumindo a evolução de caráter crônico e
9 progressivo que persiste por toda a vida do paciente (BRASIL, 2015).

10 A LV pode afetar vários órgãos internos, geralmente baço, fígado, medula
11 óssea e rins. É uma infecção caracterizada pela perda de peso, febre irregular,
12 esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia e anemia. É causada pelas espécies
13 do complexo *L. donovani* [*L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum infantum* e *L. (L.) infantum*
14 *chagasi* (BEZERRA et al., 2019). Embora *L. amazonensis* cause LTA em sua maioria
15 dos casos, um amplo espectro de manifestações clínicas que vão desde infecção
16 assintomática até mesmo à forma visceral já foram relatadas (BARRAL et al., 1991).

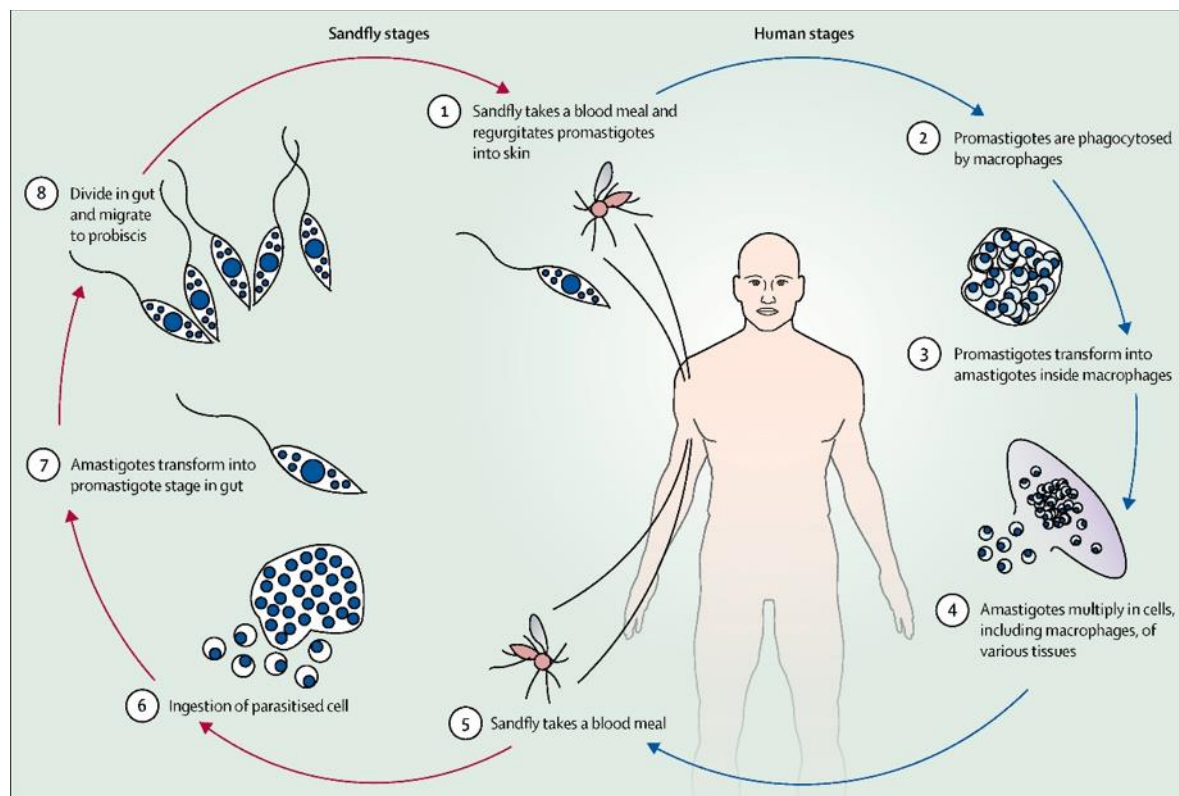
17 Nas Américas, um total de 940.396 casos novos de LC e LM foram
18 reportados em 17 dos 18 países endêmicos no período de 2001-2017, com uma média
19 anual de 55.317 casos. A série histórica de 17 anos mostra que em 2015 registrou-se
20 o menor número de casos novos (46.074) nas Américas, principalmente devido à
21 redução de 45%, 42% e 35% dos casos em Costa Rica, Panamá e Colômbia,
22 respectivamente. Entretanto, a partir de 2016 foi relatado um aumento dos casos nas
23 Américas, apesar do Brasil apresentar uma redução de 35% (WHO/PAHO, 2019). No
24 norte do Paraná, a LTA é considerada endêmica, apresentando um total de 108 casos
25 no período de 2010 a 2015 (DETONI et al., 2019).

26 27 1.2 CICLO BIOLÓGICO DO PROTOZOÁRIO

28 O ciclo biológico de *Leishmania* spp. envolve duas formas
29 morfológicas principais: promastigota e amastigota. O inseto fêmea infectado, no
30 momento do repasto sanguíneo regurgita juntamente com a saliva formas infectantes
31 promastigotas metacíclicas, estas entram em contato com os macrófagos. Estas
32 células fagocíticas apresentam uma variedade de receptores que se ligam à padrões
33 moleculares presentes na superfície do parasito, como moléculas de lipofosfoglicanos
34 (LPG) e metaloproteinase gp63 kDa (GP63), iniciando o processo de fagocitose. Após

1 a internalização, ocorre a formação do fagolisossomo, onde formas promastigotas se
 2 transformam em formas replicativas não flageladas denominadas amastigotas. Estas
 3 por sua vez se proliferam por divisão binária simples, rompem os macrófagos, e são
 4 liberadas, podendo ser novamente fagocitadas (ARENAS et al., 2017).

5



6

7 **Figura 1:** Ciclo biológico do protozoário *Leishmania* spp. (1) Durante o repasto
 8 sanguíneo flebotomíneos fêmeas regurgitam formas promastigotas metacíclicas na
 9 pele do hospedeiro; (2) na derme do hospedeiro vertebrado, os parasitos são
 10 fagocitados por macrófagos; (3) no interior dos macrófagos, formas promastigotas se
 11 diferenciam em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária; (4) após
 12 multiplicação, as amastigotas são liberadas após a lise celular; (5, 6) o ciclo se
 13 completa quando outro flebotomíneo ingere fagócitos infectados durante o repasto
 14 sanguíneo; (7) no interior do seu intestino, as formas amastigotas se diferenciam e
 15 promastigotas; (8) os parasitos se multiplicam e diferenciam-se em promastigotas
 16 metacíclicas, que migram para a probóscide do inseto. Fonte: REITHINGER, 2007
 17

18 Ambas a formas parasitárias apresentam características como sequências de
 19 DNA extra nuclear condensados em uma única organela, o cinetoplasto, que se
 20 encontra na porção anterior do corpo celular, sendo muito estudadas para o
 21 desenvolvimento de novos alvos farmacológicos (FRANTZ; WIPF, 2010).

1 1.3 INTERAÇÃO PARASITO HOSPEDEIRO NA LTA

2 A evolução da doença é dependente tanto dos fatores de virulência do
3 parasito como da resposta imune do hospedeiro com o envolvimento de neutrófilos,
4 macrófagos, quimiocinas e citocinas, influenciando diretamente a resposta imune
5 durante a infecção por *Leishmania* spp. (SCOTT; NOVAIS, 2016).

6 O modelo experimental mais utilizado na interação entre resposta imune e
7 padrões de resistência ou susceptibilidade tem sido por meio de infecções
8 experimentais com *L. major*, resultando em diferentes evoluções, dependendo do
9 modelo utilizado, camundongos das linhagens C57BL/6, CBA/J, C3H, B10D2 são
10 resistentes, enquanto a linhagem BALB/c apresenta-se suscetível ao parasito
11 (CAMPOS-NETO, 2005). Neste último, observa-se ativação preferencial da
12 subpopulação de linfócitos T CD4+ do padrão Th2 com produção de interleucina IL-4
13 e IL-13. Nos animais resistentes ocorre a ativação de linfócitos T CD4+ do padrão Th1
14 com produção de IFN- γ e TNF- α (ARENAS et al., 2017).

15 No entanto, esta resposta polarizada não é observada para todas as
16 espécies de *Leishmania*. Em *L. amazonensis* camundongos isogênicos (C57BL/6,
17 CBA/J, C3H, B10D2 e BALB/c) desenvolvem lesões progressivas com vacúolos
18 parasitóforos repletos de parasitos existe um gradiente de gravidade da doença
19 variando de camundongos BALB/c, que desenvolvem uma lesão muito rápida, que
20 ulceram, gerando extensas áreas de tecido necrótico, a camundongos C3H.HeN que
21 desenvolvem lesões não cicatrizantes, esta susceptibilidade generalizada observada
22 não parece estar diretamente relacionada à resposta preferencial do tipo Th2, mas
23 sim à ativação de células T CD4+ de ambos os padrões que produzem níveis
24 relativamente baixos de diversas citocinas (ARENAS et al., 2017).

25 A ativação da resposta Th1 é um importante processo para a eliminação do
26 parasito, pois sob a influência do IFN- γ os macrófagos exercem sua atividade
27 microbicida aumentada, como a secreção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias
28 como TNF α e IL-6, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio
29 (ERNs), alta atividade de apresentação de antígenos, aumento da produção de IL-12
30 e conseqüente morte do parasito (MURAILLE; LEO; MOSER, 2014).

31

32 1.4 MORTE CELULAR

33 A morte celular manifesta-se com alterações morfológicas e de acordo com
34 os mecanismos pelos quais as células mortas descartam seus fragmentos pode-se

1 classificar a morte celular em três formas principais: necrose, apoptose e autofagia
2 (GALLUZZI et al., 2012).

3 A necrose é caracterizada morfológicamente por um ganho no volume
4 celular, inchaço de organelas, perda da integridade da membrana plasmática e,
5 conseqüentemente, perda do conteúdo intracelular. A apoptose, por sua vez, é
6 caracterizada pelo arredondamento celular, encolhimento celular, condensação de
7 cromatina, fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos e modificações na
8 membrana plasmática com manutenção de sua integridade. A autofagia é um
9 processo catabólico intracelular que sequestra citosol e organelas em vesículas de
10 membrana dupla chamadas autofagossomos para fusão e degradação em
11 lisossomos, este é um processo de sobrevivência celular que permite que a célula
12 sobreviva à privação de nutrientes ou fator de crescimento, sendo que quando a via
13 autofágica é ativada acima de níveis basais pode ser correspondida a um processo
14 de morte autofágica. Sendo que o processo autofágico pode estar presente em outros
15 tipos de morte celular como necrose e apoptose (BASMACIYAN; CASANOVA, 2019;
16 GALLUZZI et al., 2012).

17

18 1.5 TRATAMENTOS

19 O tratamento de primeira escolha de portadores de leishmaniose se baseia
20 na eliminação das formas amastigotas intramacrofágicas, com o uso de antimoniais
21 pentavalentes, antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio
22 (Pentostam®), utilizados desde 1920 (PONTE-SUCRE et al., 2017). Contudo, estes
23 fármacos apresentam alta toxicidade, dificuldade de administração e relatos de
24 resistência (PONTE-SUCRE et al., 2017; DE BRITO et al., 2012; RODRIGUES et al.,
25 2006).

26 Os principais efeitos adversos desencadeados pela administração dos
27 antimoniais incluem: mialgia, artralgia, inapetência, náuseas, vômitos, sensação de
28 plenitude gástrica, pirose, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura,
29 insônia, edema, aumento sérico das enzimas hepáticas, insuficiência renal aguda,
30 pancreatite e cardiotoxicidade. Devido a estes efeitos tóxicos, o antimonial
31 pentavalente (Glucantime®) não é aprovado pelo FDA nos EUA (ARONSON; JOYA,
32 2019, CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; BERMAN, 1997).

33 Outros medicamentos podem ser utilizados como alternativa em pacientes
34 impedidos de utilizar os antimoniais ou em casos de resistência, como: pentamidina,

1 anfotericina B, miltefosina e alguns compostos azólicos (itraconazol e cetoconazol).
2 Atualmente, novas drogas estão sendo avaliadas, como paromicina e sitamaquina,
3 que se encontram na fase 2 de estudo (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019). Contudo,
4 os tratamentos de segunda escolha também apresentam muitos efeitos adversos,
5 baixa eficiência, uso restrito a apenas algumas espécies de *Leishmania* e relatos
6 recentes de resistência (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019; PONTE-SUCRE et al.,
7 2017). Somando-se a isso, ainda não foi possível o desenvolvimento de uma vacina
8 efetiva para portadores de leishmanioses (GHORBANI; FARHOUDI, 2018).

9 Deste modo, torna-se urgente a busca por alternativas quimioterápicas com
10 maior eficiência e menos efeitos adversos. Nesse sentido, a medicina natural pode
11 fornecer alternativas de tratamento para diversas doenças. Diversos estudos
12 demonstraram a atividade antileishmania de vários compostos, como por exemplo, o
13 óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides*, extratos de *Caryocar coriaceum*, ácido
14 grandiflorenico, um dos principais componentes da *Sphagneticola trilobata* (L.) e o
15 ácido diidroabiético do *Pinus elliotii* (ARONSON; JOYA, 2019; BORTOLETI et al.,
16 2018; GONÇALVES et al., 2018; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018; MONZOTE et
17 al., 2014).

18

19 1.6 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

20 O óleo essencial de orégano (OEO), extraído de *Origanum vulgare*, possui
21 uma gama de efeitos demonstrados na literatura, como ação antiparasitária,
22 antibacteriana e antifúngica (BISMARCK et al., 2019; PAVLI et al., 2019; GAUR et al.,
23 2018; LU et al., 2018; SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017). Os compostos
24 monoterpenos lipofílicos, presentes no OEO, como o carvacrol e o timol, são os mais
25 conhecidos por possuir ação antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasitária e
26 antioxidante (DE SOUZA et al., 2010; BURT, 2004). Estudos que avaliaram os
27 mecanismo de ação antibacteriana de óleos essenciais, incluindo o OEO, sugerem
28 aumento da permeabilidade e danos à membrana celular, alteração dos níveis de ATP
29 e na síntese de proteínas, distúrbios no pH celular e alterações citoplasmáticas
30 (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; DE SOUZA et al., 2010).

31 Em relação à atividade do OEO em protozoários, Gaur e
32 colaboradores (2018) demonstraram que *Cryptosporidium parvum* tratados com OEO
33 exibiram uma diminuição da sua infectividade. Com relação aos tripanosomatídeos,
34 estudos tem demonstrado a atividade de diferentes compostos de óleos essenciais

1 como o carvacrol e timol. ROBLEDO et al., 2005 já haviam demonstrado a atividade
2 do timol e seus derivados contra *L. panamensis in vitro e in vivo*. Os autores
3 observaram que tanto o timol quanto seus derivados apresentaram atividade contra
4 formas promastigotas que era substancialmente maior do que para as formas
5 amastigotas *in vitro*. Com relação aos experimentos *in vivo* não houve a cura completa
6 dos animais infectados, contudo o tratamento não foi tóxico para os animais.

7 MORALES-YUSTE et al., 2010 estudaram o efeito de diferentes
8 componentes de óleos essenciais em formas promastigotas de *L. infantum*, os autores
9 verificaram que o carvacrol foi o composto mais efetivo contra as formas testadas. Por
10 outro lado, ESCOBAR et al., 2010 demonstraram que o timol extraído de *Lippia spp*
11 foi eficaz contra formas promastigotas tanto de *T. cruzi* como de *L. chagasi*, contudo
12 foi eficiente sobre formas amastigotas apenas para *T. cruzi*. Ainda sobre a atividade
13 do timol em formas promastigotas de *Leishmania* DE MEDEIROS et al., 2011
14 verificaram que o timol apresenta atividade significativa contra as formas
15 promastigotas de *L. amazonensis*, contudo os autores relatam que neste estudo o
16 timol mostrou toxicidade contra macrófagos peritoneais, com baixa seletividade contra
17 os promastigotas.

18 Por outro lado, FARIAS-JUNIOR et al., 2012 avaliaram o efeito
19 inibitório de um óleo essencial rico em carvacrol, obtido de folhas de *L. sidoides*, em
20 promastigotas de *L. chagasi*, os autores verificaram que o óleo era mais eficaz, com
21 IC₅₀ / 72 h de 54,8 µg / mL em comparação com 74,1 µg / mL para óleo rico em timol.

22 Recentemente YOUSSEFI et al., 2019 descreve o efeito
23 leishmanicida do carvacrol e do timol sobre *L. infantum in vitro e in vivo*. Os autores
24 verificaram que ambos os compostos apresentaram efeito inibitório no crescimento de
25 formas promastigotas sendo que o timol apresentou um efeito inibitório maior. Nos
26 experimentos *in vivo* os autores concluíram que o timol foi o tratamento mais seguro
27 com menores efeitos secundários no fígado em comparação com os outros compostos
28 testados.

30 1.7 NANOPARTÍCULA BIOGÊNICA DE PRATA

31 A nanociência foi estabelecida como uma nova ciência interdisciplinar, sendo
32 considerada como o conhecimento sobre propriedades fundamentais de objetos de
33 tamanho nano, sendo que esta unidade indica um bilionésimo ou 10⁻⁹ (ABBASI et al.,
34 2016).

1 Diferentes tipos de nanopartículas vêm sendo estudadas como alternativa no
2 tratamento de diversas doenças graves ou crônicas, por apresentarem propriedades
3 químicas e físicas únicas como alta estabilidade em soluções aquosas e tamanho
4 reduzido (ZDROJEWICZ et al., 2015, BAIOTTO et al., 2011).

5 A prata é uma substância utilizada pela medicina há pelo menos seis milênios
6 para prevenir infecções bacterianas e tem sido eficaz na maioria dos organismos
7 testados (ALEXANDER, WESLEY, 2009). Desse modo, a produção de nanopartículas
8 de prata (AgNp), por ser menos tóxicas que seus íons, têm se destacado por
9 apresentar outras diversas aplicações, tais como: aplicações antimicrobianas,
10 materiais de biossensores, nanocompostos, fibras, materiais supercondutores,
11 criogênicos, produtos cosméticos e componentes eletrônicos (ABBASI et al., 2016;
12 DE LIMA; SEABRA; DURÁN, 2012). A síntese de AgNp pode ser realizada através de
13 métodos químicos ou biológicos (BEHRA et al., 2013), sendo que no método biológico
14 pode-se utilizar bactérias e fungos, entre eles o fungo filamentoso *Fusarium*
15 *oxysporum*, cujas vantagens incluem, processo confiável e ecologicamente correto e
16 de relativa facilidade de manipulação (ABBASI et al., 2016, DURÁN et al., 2005).

17 Com relação a atividade de NpAg sobre espécies de *Leishmania*
18 ALLAHVERDIYEV et al., 2011 demonstraram que houve redução no número das
19 formas promastigotas de *Leishmania tropica* quanto tratadas com NpAg além de
20 alterações morfológicas, infectividade, atividade metabólica e efeito inibitório nas
21 formas amastigotas interiorizadas.

22 Do mesmo modo, BAIOTTO et al., 2011 observaram que nanopartícula de
23 prata apresentaram um efeito antiproliferativo sobre as formas promastigotas de
24 *Leishmania infantum*, e diminuição do número de amastigotas intracelular em
25 macrófagos de camundongos BALB/c.

26 Devido efeitos tóxicos decorrentes da síntese química, quanto das próprias
27 nanopartículas sobre o organismo humano e sobre o meio-ambiente, (BEHRA et
28 al., 2013), surgiram alternativas para a produção de nanopartículas mais ecológico, a
29 chamada síntese “verde”. Esta síntese pode ser realizada pelos processos
30 metabólicos de plantas, bactérias e, dentre estes o fungo filamentoso *Fusarium*
31 *oxysporum*, cujas vantagens consistem no processo confiável, ecologicamente correto
32 e de relativa facilidade de manipulação (ABBASI et al., 2016, DURÁN et al., 2005).

33 ROSSI-BERGMANN et al., 2012 demonstraram que nanopartículas de prata
34 biogênica apresentam atividade antipromastigota em *L. amazonensis in vitro*, além

1 disso, os autores comparam a eficiência das nanopartículas produzidas quimicamente
2 e biologicamente e constatou-se que o tratamento com NpAgBio resultou na redução
3 no tamanho da lesão enquanto animais tratados com nanopartículas quimicamente
4 produzidas tiveram aumento de lesão após a terceira semana de tratamento.
5 Observou-se também redução da carga parasitária nos animais tratados com
6 NpAgBio, além de não apresentarem efeitos tóxicos em órgão como rins, coração e
7 fígado.

8 Posteriormente, Fanti e colaboradores, 2018 também verificaram
9 ação antipromastigota do tratamento com NpAg biológica sobre formas promastigotas
10 de *L. amazonensis*, os autores observaram ainda que o provável mecanismo de ação
11 foi a perda da integridade da membrana mitocondrial devido ao aumento na produção
12 de ROS, e consequente morte por apoptose-like. Os autores confirmaram dados da
13 literatura que a NpAg é capaz de atuar nas formas intracelulares diminuindo as formas
14 amastigotas interiorizadas por ação direta ou por maximizar os mecanismos
15 microbicidas dos macrófagos.

16

17 1.8 ASSOCIAÇÃO DE COMPOSTOS

18 A associação de compostos têm se destacado por melhorar a eficácia,
19 diminuir resistência e efeitos colaterais (FISCHBACH, 2011). A dinâmica da
20 associação pode ser realizada através do método de proporções fixas em relação a
21 um efeito conhecido, para calcular sua eficiência em conjunto (SEIFERT; CROFT,
22 2006).

23 O valor e eficiência desta associação pode ser demonstrada através de
24 cálculos matemáticos utilizando-se de ferramentas como o índice de combinação (IC)
25 (HALL; MIDDLETON; WESTMACOTT, 1983) e expressos graficamente como
26 isobogramas (ZHAO; WIENTJES; AU, 2004). O efeito sinérgico pode ser devido a
27 vários fatores, como: alteração da biodisponibilidade, um composto aumentar a
28 permeabilidade celular do outro composto, atuação em diferentes sítios, tempo de
29 meia-vida e a solubilidade (BOLLENBACH, 2015). Várias associações já foram
30 testadas para o tratamento de leishmaniose, e apresentaram efeitos sinérgicos,
31 indicando assim que o efeito das substâncias em conjunto é melhor do que elas
32 isoladas (PASTOR et al., 2015; TOLOUEI et al., 2011; SEIFERT; CROFT, 2006).

33 A associação do OEO e AgNp-bio já foi avaliada em bactérias
34 multirresistentes e apresentou um efeito aditivo ou sinérgico dependendo da cepa

- 1 avaliada, contudo até o momento não há estudos que tenham avaliado o efeito desta
- 2 associação em *Leishmania* spp. (SCANDORIEIRO et al., 2016).

1 2 JUSTIFICATIVA

2

3 O tratamento de primeira escolha atualmente utilizado para a LTA tem
4 apresentado algumas dificuldades como efeitos tóxicos e o surgimento de cepas
5 resistentes. Aliados a isso os fármacos de segunda escolha, como anfotericina B e
6 pentamidina, também apresentam efeitos colaterais indesejáveis e baixa eficiência na
7 eliminação do parasito, dificultando o tratamento.

8 Dessa forma, estudos têm demonstrado que a utilização de extratos
9 naturais e de AgNp pode ser uma alternativa no tratamento por apresentar efeitos
10 antileishmania, justificando a associação de ambas, visando maior eficiência e menor
11 toxicidade para o hospedeiro. Visto que a associação do OEO com AgNp apresenta
12 uma ação sinérgica em bactérias e a mesma não foi estudada em leishmaniose, este
13 estudo propõe-se alcançar os objetivos a seguir.

14

1 3 OBJETIVOS

2

3 3.1 OBJETIVO GERAL

4 Avaliar o efeito *in vitro* da associação de OEO e AgNp-bio sobre *L.*
5 *amazonensis* e os possíveis mecanismos envolvidos na morte do parasito.

6

7

8 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

9 a) Determinar o efeito leishmanicida da associação de OEO e AgNp-bio
10 sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*;

11 b) Verificar a citotoxicidade da associação de OEO e AgNp-bio sobre
12 macrófagos peritoniais;

13 c) Demonstrar por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e
14 microscopia eletrônica de transmissão (MET) as alterações morfológicas e
15 ultraestruturais de formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a
16 associação de OEO e AgNp-bio;

17 d) Caracterizar os mecanismos de morte induzidos pelo tratamento da
18 associação de OEO e AgNp-bio sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*.

1 4 MATERIAIS E MÉTODOS

2

3 4.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

4 Camundongos BALB/c foram gentilmente fornecidos pelo Instituto Carlos
5 Chagas/Fiocruz-PR, Curitiba, Brasil. Os animais foram mantidos em condições
6 estéreis no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade
7 Estadual de Londrina até atingirem o peso aproximado de 25-30 gramas e idade entre
8 6-8 semanas, com luminosidade e temperatura controlada. O estudo foi aprovado e
9 os animais foram utilizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em
10 Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (UEL) nº
11 8595.2018.89.

12

13 4.2 MANUTENÇÃO DE PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

14 Formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1989/166MJO) foram
15 mantidas em meio de cultura 199 (GIBCO Invitrogen, New York, EUA) suplementado
16 com 10% de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO Invitrogen, New York, EUA), meio
17 HEPES 1M, urina humana 1%, L-glutamina 1%, estreptomicina com penicilina (GIBCO
18 Invitrogen) e 10% bicarbonato de sódio. O cultivo celular foi mantido em estufa tipo
19 B.O.D a 25 °C, em frasco de cultura de 25 cm². Foram utilizadas em todos os
20 experimentos formas promastigotas na fase estacionária de crescimento.

21

22 4.3 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

23 O OEO foi obtido na Ferquima Indústria e Comércio de Óleos Essenciais
24 (São Paulo, Brasil). Este óleo (lote 224) foi extraído por destilação a vapor e sua
25 densidade (0,954 g/mL) e composição (componentes principais: 71% carvacrol, 3%
26 timol, 4,5% gama terpineno, 3,5% para-cimeno e 4% beta- cariofileno) foram descritos
27 em um relatório técnico. Uma solução estoque de 50% de OEO foi preparada em
28 dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A concentração
29 máxima de DMSO nos ensaios foi de 1%.

30

31 4.4 ATIVIDADE DO OEO, AgNP E DA ASSOCIAÇÃO SOBRE PROMASTIGOTAS DE *L.* 32 *AMAZONENSIS*

33 Formas promastigotas de *L. amazonensis* (10⁶) foram tratadas com
34 diferentes concentrações de OEO (3,12; 6,25; 12,5; 50 e 100 µg/mL) , AgNp-bio (0,1;

1 0,5; 1; 5 e 10 µg/mL) e das proporções da associação OEO+AgNp: 80%/20%
2 (3,2/0,01; 6,4/0,02; 12,8/0,04 e 25,6/0,08 µg/mL OEO/AgNp); 60%/40% (2,4/0,02;
3 4,8/0,04; 9,6/0,08 e 19,2/0,16 µg/mL OEO/AgNp); 50%/50% (2/0,02; 4/0,05; 8/0,1 e
4 16/0,2 µg/mL OEO/AgNp); 40%/60% (1,6/0,03; 3,2/0,06; 6,4/0,12 e 12,8/0,24 µg/mL
5 OEO/AgNp) e 20%/80% (0,8/0,04; 1,6/0,08; 3,2/0,16 e 6,4/0,32 µg/mL OEO/AgNp).
6 Os parasitos foram avaliados em câmara de Neubauer após 24 h de tratamento. Como
7 controle negativo, utilizou-se promastigotas de *L. amazonensis* mantidas em meio de
8 cultura sem tratamento e como controle do veículo utilizou-se DMSO 0,1%.

9

10 4.5 VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS

11 Para avaliar um possível efeito citotóxico do OEO, AgNp-bio e da associação
12 de ambas em macrófagos peritoniais, foi realizado o teste de MTT (brometo de 3-(4,5-
13 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), que mensura a atividade metabólica da
14 mitocôndria como descrito por MOSMANN (1983). Macrófagos (5×10^5 células/mL)
15 foram recuperados da cavidade peritoneal com tampão fosfato-salino (PBS) gelado
16 suplementado com 3% de SBF e então cultivados em placas de 24 poços com 500 µL
17 de meio RPMI 1640 e 10% SBF por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. As células aderentes
18 foram incubadas com diferentes concentrações do OEO (16, 32, 64, 128 e 256 µg/mL),
19 AgNp-bio (0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µg/mL) e das proporções da associação: 80%/20%
20 (12,8/0,04; 25,6/0,08; 51,2/0,16; 102,4/0,32 e 204,8/0,64 µg/mL OEO/AgNp-bio);
21 60%/40% (9,6/0,08; 19,2/0,16; 38,4/0,32; 76,8/0,64 e 153,6/1,28 µg/mL OEO/AgNp-
22 bio); 50%/50% (8/0,1; 16/0,2; 32/0,4; 64/0,8 e 128/1,6 µg/mL OEO/AgNp-bio);
23 40%/60% (6,4/0,12; 12,8/0,24; 25,6/0,48; 51,2/0,96 e 102,4/1,92 µg/mL OEO/AgNp-
24 bio) e 20%/80% (3,2/0,16; 6,4/0,32; 12,8/0,64; 25,6/1,28 e 51,2/2,56 µg/mL
25 OEO/AgNp-bio) cultivadas por 24 h nas mesmas condições. Posteriormente, as
26 células foram lavadas com PBS e foi adicionado aos poços MTT (5 mg/mL), seguido
27 de nova incubação por 4 h. O produto do MTT (cristais de formazan) foi diluído com
28 300 µL de DMSO, transferido para uma placa de 96 poços e lido em espectrofotômetro
29 (Thermo Scientific, Multiskan GO) a 550 nm. Como controle negativo, utilizou-se
30 macrófagos não tratados, enquanto o controle positivo foram células tratadas com
31 peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 4% (Anidrol, SP, BR). Os resultados foram expressos
32 como porcentagem de viabilidade em comparação com o grupo controle e calculado
33 com a seguinte fórmula: % (macrófagos viáveis) = amostra do grupo tratado / média
34 do controle não tratado) x 100.

1

2 4.6 CONSTRUÇÃO DOS ISOBOLOGRAMAS UTILIZANDO O MÉTODO DE PROPORÇÕES FIXAS 3 DAS COMBINAÇÕES DE AgNP E OEO

4 A dinâmica da interação da AgNP e do OEO foi estudada pelo método de
5 proporções fixas descrita por (SEIFERT; CROFT, 2006) para a obtenção do IC₅₀
6 (concentração inibitória de 50% dos parasitos) e CC₅₀ (concentração citotóxica de
7 50% dos macrófagos peritoneais) de cada proporção da associação OEO/AgNP. Para
8 isso, foi avaliado a associação de OEO/AgNP nas seguintes proporções:
9 (P1=80%/20%; P2=60%/40%; P3=50%/50%; P4=40%/60% e P5=20%/80%) que
10 correspondem as doses de (P1=12,8/0,04; P2=9,6/0,08; P3=8/0,1; P4=6,4/0,12 e
11 P5=3,2/0,16 µg/mL OEO/AgNP). Assim, foi construído um isobograma para a
12 atividade antileishmania e um para a viabilidade dos macrófagos, onde no eixo x do
13 gráfico foi colocado a dose de AgNP e no eixo y a dose do OEO, traçando entre os
14 valores das substâncias isoladas uma linha de aditividade, sendo que pontos abaixo
15 da linha indicam efeito sinérgico, pontos na linha indicam efeito aditivo e pontos acima
16 da linha indicam efeito antagônico (ZHAO; WIENTJES; AU, 2004).

17

18 4.7 CÁLCULO DO ÍNDICE DE COMBINAÇÃO

19 O valor e a eficiência dessa associação podem ser demonstrados através de
20 cálculos matemáticos, utilizando ferramentas como o índice de combinação (CI)
21 (HALL; MIDDLETON; WESTMACOTT, 1983). O CI pode ser calculado usando a
22 fórmula em que: $CI = (IC_{50} \text{ combinado OEO} / IC_{50} \text{ OEO sozinho}) + (IC_{50} \text{ combinado}$
23 $AgNP / IC_{50} \text{ AgNP sozinho})$ para atividade sobre promastigotas e, $CI = (CC_{50} \text{ OEO}$
24 $\text{combinado} / CC_{50} \text{ OEO sozinho}) + (CC_{50} \text{ AgNP combinado} / CC_{50} \text{ AgNP sozinho})$ para
25 citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais, onde $CI < 1$, $= 1$ ou > 1 indicam efeito
26 sinérgico, aditivo e antagonista, respectivamente (CHOU; TALALAY, 1984).

27

28 4.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DE PROMASTIGOTAS POR MICROSCOPIA 29 ELETRÔNICA DE VARREDURA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

30 Formas promastigotas de *L. amazonensis* (10⁶) foram tratadas com a
31 associação na dose escolhida (OEO 9,6 µg/mL e AgNP 0,08 µg/mL) e incubadas
32 durante 24 h. Após, os parasitos foram coletados por centrifugação, lavados em PBS
33 0,01 M pH 7,2 e fixados por imersão em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de
34 sódio 0,1 M.

1 Para avaliação das alterações morfológicas por MEV, promastigotas fixadas
2 com glutaraldeído foram aderidas em lamínulas recobertas com poli-L-lisina por 60
3 min. Após, foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, desidratadas em
4 concentrações crescentes de etanol (30 – 100%), submetidas a secagem em ponto
5 crítico através da substituição de etanol por CO₂, metalizadas com ouro e analisadas
6 em microscópio eletrônico de duplo feixe de alta resolução FEI SCIOS (DA SILVA et
7 al., 2013).

8 Para avaliação das alterações ultraestruturais por MET, promastigotas
9 fixadas com glutaraldeído foram transferidas para microtubos, lavadas três vezes com
10 tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%,
11 ferrocianeto de potássio 0,8% e 10.0 mM CaCl₂ a temperatura ambiente e ao abrigo
12 da luz. Após, foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, desidratadas em
13 concentrações crescentes de acetona (50 – 100%), incluídas em resina EPON e
14 polimerizadas em estufa a 60 °C durante 72 h. Cortes ultrafinos foram feitos em
15 ultramicrótomo, depositados sobre grid de cobre, contrastados com acetato de uranila
16 e citrato de chumbo, durante 20 e 10 min, respectivamente. A análise foi realizada em
17 microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1400 (SANTOS, 2011).

18

19 4.9 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO TOTAL

20 A detecção de EROs total foi realizada utilizando o marcador diacetato de 2'-
21 7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para
22 isso, formas promastigotas (10⁶) foram tratadas com associação na dose escolhida
23 (OEO 9,6 µg/mL e AgNp 0,08 µg/mL) por 24 h. Após, parasitos foram lavados com
24 PBS e incubados com 10 µM do marcador H₂DCFDA e incubados no escuro por 30
25 min a 25 °C. Como controle positivo, foi utilizado H₂O₂ 4% por 30 min. EROs foram
26 mensurados como um aumento na fluorescência causada pela conversão do corante
27 não fluorescente para o altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), em
28 espectrofluorímetro (Victor X3, PerkinElmer, Finland), nos comprimentos de onda de
29 excitação e emissão de 488 nm e 530 nm, respectivamente.

30

31 4.10 DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

32 Óxido nítrico foi determinado pelo método de Griess. Para isso, em alíquotas
33 de 60 µL do ensaio direto sobre as formas promastigotas, foi adicionado 60 µL de
34 reagente de Griess (sulfanilamida a 1% e 0,1% de naftililodiamino-bicloridrato em

1 ortofosfórico (H_3PO_4) 5%) e incubados por 10 minutos, à temperatura ambiente. Após
2 a incubação, as amostras foram colocadas em microplacas de 96 poços. Uma curva
3 padrão foi feita usando diluições seriadas de $NaNO_2$, e a absorbância foi determinada
4 a 550 nm em um leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan GO).

5

6 4.11 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

7 Formas promastigotas (10^6) foram tratadas com associação na dose
8 escolhida (OEO 9,6 $\mu g/mL$ e AgNp 0,08 $\mu g/mL$) por 24 h com a finalidade de se avaliar
9 o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), por meio da marcação com éster etil
10 tetrametilrodamina (TMRE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os parasitos
11 tratados foram lavados e incubados com 2,5 μM de TMRE por 30 min a 25 °C e
12 analisados em espectrofluorímetro (Victor X3, PerkinElmer, Finland) nos
13 comprimentos de onda de excitação de 480 nm e emissão de 580 nm.

14

15 4.12 NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE PRATA

16 As nanopartículas biogênicas de prata (AgNp-bio) foram obtidas de acordo
17 com DURÁN et al (2005). Brevemente, o fungo filamentoso *F. oxysporum* foi cultivado
18 em um meio contendo extrato de malte (2%) e extrato de levedura (0,5%) a 28 °C
19 durante 6 dias consecutivos. A biomassa crescida foi filtrada e ressuspendida em água
20 esterilizada. Aproximadamente 10 g da suspensão fúngica foi transferida para um
21 frasco cônico contendo 100 mL de água destilada, mantida por 72 h a 28 °C. A esta
22 solução será adicionada $AgNO_3$ (na concentração final de 10 mM) e mantida por várias
23 horas a 28 °C para a síntese das nanopartículas.

24

25 4.13 AVALIAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS

26 Formas promastigotas (10^6) foram tratadas com associação na dose
27 escolhida (OEO 9,6 $\mu g/mL$ e AgNp 0,08 $\mu g/mL$) por 24 h. Os parasitos foram colhidos
28 e lavados duas vezes em PBS e marcados com 10 $\mu g/mL$ de vermelho do Nilo (Sigma-
29 Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 30 min a 25 °C. Os corpos lipídicos citoplasmáticos
30 dos parasitos foram detectados em espectrofluorímetro (Victor X3, Perkin-Elmer,
31 Finland) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 530 nm e 635 nm,
32 respectivamente.

33

1 4.14 AVALIAÇÃO DE VACÚOLOS AUTOFÁGICOS

2 Para avaliação da presença de vacúolos autofágicos, formas promastigotas
3 foram tratadas por 24 h com associação na dose escolhida (OEO 9,6 µg/mL e AgNp
4 0,08 µg/mL). Os parasitos foram lavados duas vezes em PBS, incubados com 5 µL de
5 monodansilcadaverina (MDC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 1 h à 25 °C e
6 analisados em espectrofluorímetro (Victor X3, Perkin-Elmer, Finland) nos
7 comprimentos de onda de excitação e emissão de 380 nm e 525 nm, respectivamente.

9 4.15 DETERMINAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA

10 Formas promastigotas (10^6) foram tratadas com a associação na dose
11 escolhida (OeO 9,6 µg/mL e AgNp 0,08 µg/mL) por 24 h, lavadas e resuspendidas em
12 100 µL de tampão de ensaio 1x (Santa cruz Biotechnology), seguido pela adição de
13 uma mistura contendo 1 µL de anexina-V/FITC (Invitrogen, Eugene, USA) e 5 µL de
14 iodeto de propídio (PI) (Santa cruz Biotechnology). A análise dos dados foi realizada
15 em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus. Um total de 10.000 eventos foram
16 adquiridos. As células marcadas com anexina-V (positivas ou negativas para PI) foram
17 consideradas apoptóticas e as células positivas para PI (e negativas para anexina-V)
18 foram classificadas como necróticas (DOROODGAR et al., 2016; GHAFARIFAR et
19 al., 2015).

20

21 4.16 ENSAIO ANTIAMASTIGOTA

22 Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^5) foram cultivados
23 em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 13 mm, incubados com 500
24 µL de meio RPMI 1640 por 24 h à 37°C e 5% CO₂. Os macrófagos aderentes foram
25 infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* (2.5×10^6) por 2 h. Após a
26 infecção, formas promastigotas não internalizadas foram removidas por lavagem com
27 PBS e as células aderentes foram tratadas com a associação dos compostos na
28 proporção escolhida (OEO 9,6 µg/mL e AgNp 0,08 µg/mL), meio RPMI 1640 (controle
29 negativo), DMSO 0,1% (veículo), anfotericina B (controle positivo) por 24 h (37 °C e
30 5% CO₂). Em seguida, as células foram coradas com solução eosina-azul de metileno
31 segundo Leishman (Corante de Leishman) (Inlab -SP Brazil). Um total de 20 campos
32 foram analisados por imersão no aumento de 1000x, usando um microscópio óptico
33 (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan).

34

1 4.17 DETERMINAÇÃO DE NITRITO COMO ESTIMATIVA DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO EM
2 MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *L. AMAZONENSIS*

3 O NO foi determinado pelo método de Griess. Alíquotas de sobrenadantes
4 do ensaio de anti-amastigota (60 μ L) foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 2 min
5 e um volume de 50 μ L de sobrenadante foi recuperado. Após, adicionou-se 50 μ L de
6 reagente de Griess. Após 10 min de incubação a temperatura ambiente, as amostras
7 foram colocadas em microplacas de 96 poços. Uma curva padrão foi feita usando
8 diluições seriadas de NaNO₂, e a absorbância foi determinada a 550 nm em leitor de
9 microplacas (Thermo Scientific, Multiskan GO).

10

11 4.18 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *L.*
12 *AMAZONENSIS*

13 Macrófagos infectados com formas amastigotas foram tratados com a dose
14 da proporção escolhida (OEO 9,6 μ g/mL e AgNp 0,08 μ g/mL) por 24 horas. Após este
15 período, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 10 μ M de H₂DCFDA por
16 30 min a 37 °C. Como controle positivo, foi utilizado H₂O₂ 4% por 30 min. EROs foram
17 mensurados como um aumento na fluorescência causada pela conversão do corante
18 não fluorescente para o altamente fluorescente DCF, em espectrofluorímetro (Victor
19 X3, PerkinElmer, Finland), nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 488
20 nm e 530 nm, respectivamente.

21

22 4.19 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

23 As análises estatísticas foram determinadas por ANOVA, seguido pelo teste
24 de Tukey para comparações múltiplas. Três experimentos independentes foram
25 realizados, cada um com conjuntos de dados em triplicata. Os dados foram expressos
26 como média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados usando o software
27 estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., EUA, 500-288). Valores de $p \leq$
28 0,05 foram considerados estatisticamente significativo.

29

1 5 RESULTADOS

2

3 Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em um
4 artigo científico que será submetido à revista Acta tropica, com fator de impacto 2.270.

5

6 5.1

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

7

8 SYNERGIC EFFECT OF THE ESSENTIAL OIL OF OREGAN AND SILVER 9 NANOPARTICLES ON *Leishmania amazonensis*

10

11 Alex Barbosa Alves^a, Bruna Taciane da Silva Bortoleti^{a,b}, Fernanda Tomiotto-
12 Pellissier^{a,b}, Ana Flávia Marques Ganaza^a, Manoela Daele Gonçalves^c, Amanda
13 Cristina Machado Carloto^a, Ana Carolina Jacob Rodrigues^a, Taylon Felipe da Silva^a,
14 Gerson Nakazaki^d, Renata Katsuko Takayama Kobayashi^d, Danielle Lazarin-Bidóia^a,
15 Milena Menegazzo Miranda-Sapla^a, Idessania Nazareth Costa^a, Wander Rogério
16 Pavanelli^a, Ivete Conchon-Costa^{*a}.

17

18 ^a Laboratory of Immunoparasitology of Neglected Diseases and Cancer, Department of Pathological
19 Sciences, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, PR, Brazil.

20 ^b Carlos Chagas Institute (ICC-Fiocruz-Pr), Molecular Virology Laboratory, Curitiba PR, Brazil.

21 ^c Laboratory of Biotransformation and Phytochemistry, Department of Chemistry, Center of Exact
22 Sciences, State University of Londrina, PR, Brazil.

23 ^d Departament of Microbiology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, PR, Brazil.

24

25

26

27 * Corresponding Author: Laboratory of Immunoparasitology of Neglected Diseases and Cancer,
28 Department of Pathological Sciences, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, PR,
29 Brazil

30 e-mail address: conchon@uel.br

31

32

33

34

35

1 **Abstract**

2

3 American Tegmental Leishmaniasis (ATL) is a zoonosis caused by protozoa of the
4 genus *Leishmania*. The current treatment presents several problems such as the
5 difficulty of administration, low efficiency, toxicity and resistance of the parasites,
6 leading to the search for new substances or associations as alternative therapies.
7 Natural products such as oregano essential oil (OEO) extracted from the wild plant
8 *Origanum vulgare*, have a range of effects already studied, such as their antiparasitic,
9 antibacterial and antifungal action, associated with silver nanoparticles (AgNp) that
10 have antimicrobial and antiparasitic action since the effect of this association showed
11 synergistic effects in bacteria. We show that the association of OEO and AgNp *in vitro*
12 has a synergistic antileishmanial effect on *L. amazonensis* promastigotes forms and
13 antileishmanial activity on *L. amazonensis*-infected macrophages. This association
14 presented morphological and ultrastructural changes in promastigotes. Afterwards, we
15 investigated the mechanisms involved in the death of the parasite, as increase of
16 oxidant species, mitochondrial depolarization, accumulation of lipid-storage bodies
17 and autophagic vacuoles in the cytoplasm, phosphatidylserine exposure and damage
18 of the plasma membrane. In addition, we observed that the treatment caused a
19 reduction in the percentage of infected cells and the number of amastigotes per
20 macrophages. Our results demonstrated that the association OEO+AgNp acts on
21 promastigote forms through a late apoptosis-like mechanism and on intracellular
22 amastigote forms increase the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric
23 oxide (NO) by infected macrophages.

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

1 1. Introduction

2 *Leishmania amazonensis* is one of the main causative agents of American
3 Tegumentary Leishmaniasis (ATL), which is a zoonotic disease that affects humans
4 and several species of wild and domestic animals and characterized by chronic
5 inflammation of the skin and mucous membranes (ARENAS et al., 2017). ATL is
6 transmitted to humans by female sandflies of *Lutzomyia* spp. and its pathogenesis
7 depends on factors such as the virulence of the parasite and the host's immune
8 response (ARENAS et al., 2017).

9 The current treatment of ATL is based on the elimination of amastigote forms,
10 with the antimonials pentavalent (Glucantime® and Pentostam®), which have been
11 used since 1920. As a second choice in cases of therapeutic failure, other drugs, such
12 as pentamidine, amphotericin B, miltefosine and some azole compounds (PONTE-
13 SUCRE et al., 2017). However, the available drugs present have low efficiency, side
14 effects and difficulty in administration (PONTE-SUCRE et al., 2017; ALVAR et al.,
15 2012). In addition, the administration of a single drug has led to the development of
16 strains resistant to the available drugs. Thus, the combination of compounds have
17 become good alternatives and has shown advantages over monotherapy
18 (BOLLENBACH, 2015).

19 Natural medicine can provide important treatment alternatives for various
20 diseases, such as the anti-leishmanial activity the essential oil of *Chenopodium*
21 *ambrosioides*, extracts of *Caryocar coriaceum* and grandiflorenic acid, one of the main
22 components of *Sphagneticola trilobata* and dihydroabietic acid of *Pinus elliottii*
23 (BORTOLETI et al., 2018; GONÇALVES et al., 2018; TOMIOTTO-PELLISSIER et al.,
24 2018; MONZOTE et al., 2014). Among the natural products, the oregano essential oil
25 oregano (OEO) that is extracted from the wild plant *Origanum vulgare* with a range of
26 effects already studied such as its antiparasitic and antibacterial action (BISMARCK et
27 al., 2019; PAVLI et al., 2019; GAUR et al., 2018; LU et al., 2018).

28 Furthermore, with the advent of nanotechnology, silver, which that is used in
29 medicine for at least six millennia to prevent bacterial infections and effective against
30 almost all, tested organisms. Thus, the production of silver nanoparticles (AgNp), being
31 less toxic than their ions, has recently gained prominence, as it presents several
32 advantages (DE LIMA; SEABRA; DURÁN, 2012; ALEXANDER, WESLEY, 2009).

33 In this way, different therapeutic strategies for the treatment of leishmaniasis
34 patients have been explored, including new natural and synthetic compounds,

1 combination of compounds and nanotechnology. Thus, the objective of this work was
2 to evaluate the anti-leishmania activity of the association of OEO and AgNp, as well as
3 to evaluate the possible morphological, ultrastructural and biochemical changes
4 induced by the treatment on *L. amazonensis* promastigote forms.

5

6

7 **2. Materials and methods**

8 **2.1 Culture of *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

9 Promastigotes of *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1989/166MJO) were
10 maintained in culture medium 199 (GIBCO, Invitrogen, New York, USA) supplemented
11 with 10%-fetal bovine serum (FBS) (GIBCO, Invitrogen, New York, USA), 1M-HEPES
12 buffer, 1%-human urine, 1%-L-glutamine, streptomycin and penicillin (GIBCO,
13 Invitrogen) and 10%- sodium bicarbonate. The cell culture was maintained in a B.O.D
14 at 25 °C in 25 cm² culture flask. In all experiments, promastigote forms in the stationary
15 growth phase were used (5-day culture).

16

17 **2.2 Animals and ethics committee**

18 The BALB/c mice were kindly supplied by the Carlos Chagas Institute/Fiocruz-
19 PR, Curitiba, Brazil. The animals were kept under sterile conditions in the Vivarium of
20 the Department of Pathological Sciences of the State University of Londrina until they
21 reached an approximate weight of 25-30 grams and age between 6-8 weeks, with
22 controlled light and temperature. The study was approved and the animals were used
23 according to the rules of the Animal Experimentation Ethics Committee of the State
24 University of Londrina (UEL) n^o 8595.2018.89.

25

26 **2.3 Oregano essential oil**

27 The OEO was obtained from Ferquima Indústria e Comércio de Essential Oils
28 (São Paulo, Brazil). This oil (batch 224) was extracted by steam distillation and its
29 density (0.954 g/mL) and composition (main components: 71% carvacrol, 3% thymol,
30 4.5% terpinene range, 3.5% para-cymene and 4% beta-caryophyllene) were described
31 in a technical report. A 50% OEO stock solution was prepared in dimethylsulfoxide
32 (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). The maximum concentration of DMSO
33 in the tests was 1%.

34

1

2 **2.4 Silver nanoparticles**

3 The biogenic silver nanoparticles (AgNp-bio) were obtained according to
4 DURÁN et al (2005). Briefly, the filamentous fungus *Fusarium oxysporum* was grown
5 in a medium containing malt extract (2%) and yeast extract (0,5%) at 28 °C for 6
6 consecutive days. The grown biomass was filtered and resuspended in sterile water.
7 Approximately 10 g of the fungal suspension was transferred to a conical flask
8 containing 100 mL of distilled water, maintained for 72 h at 28 °C. To this solution will
9 be added AgNO₃ (at the final concentration of 10 mM) and maintained for several hours
10 at 28 °C for the synthesis of the nanoparticles.

11

12 **2.5 OEO, AgNp and association activity on promastigote forms of *L.*** 13 ***amazonensis***

14 The promastigote forms of *L. amazonensis* (10⁶) were treated with different
15 concentrations of OEO (3.12, 6.25, 12.5, 50, 100 µg/mL), AgNp-bio (0.1, 0.5, 1, 5, 10
16 µg/mL) and the proportions of the OEO+AgNp associations: 80%/20% (3.2/0.01,
17 6.4/0.02, 12.8/0.04, 25.6/0.08 µg/mL OEO/AgNp), 60%/40% (2.4/0.02, 4.8/0.04,
18 9.6/0.08, 19.2/0.16 µg/mL OEO/AgNp), 50%/50% (2/0.02, 4/0.05, 8/0.1, 16/0.2 µg/mL
19 OEO/AgNp), 40%/60% (1.6/0.03, 3.2/0.06, 6.4/0.12, 12.8/0.24 µg/mL OEO/AgNp) and
20 20%/80% (0.8/0.04, 1.6/0.08, 3.2/0.16, 6.4/0.32 µg/mL OEO/AgNp). The parasites
21 were evaluated in a Neubauer chamber after 24 h of treatment. As a negative control,
22 *L. amazonensis* promastigotes kept in untreated culture medium were used, and as a
23 vehicle control, was used DMSO 0.1%.

24

25 **2.6 Peritoneal macrophage viability**

26 To evaluate a possible cytotoxic effect of OEO, AgNp-bio and the associations
27 of both, the MTT assay (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide)
28 (Sigma-Aldrich) was performed, which measures the metabolic activity of the
29 mitochondria, as described by MOSMANN (1983). Macrophages (5x10⁵ cells/mL) were
30 recovered from the peritoneal cavity with ice-cold PBS supplemented with 3% FBS and
31 then cultured in 24-well plates with 500 µL of RPMI 1640 medium and 10% FBS for 24
32 h at 37 °C and 5% CO₂. The adherent cells were incubated with different
33 concentrations of OEO (16, 32, 64, 128, 256 µg/mL), AgNp-bio (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2
34 µg/mL) and the proportions of the association: 80%/20% (12.8/0.04, 25./0.08,

1 51.2/0.16, 102.4/0.32, 204.8/0.64 $\mu\text{g/mL}$ OEO/AgNp-bio), 60%/40% (9.6/0.08,
2 19.2/0.16, 38.4/0.32, 76.8/0.64, 153.6/1.28 $\mu\text{g/mL}$ OEO/AgNp-bio), 50%/50% (8/0.1,
3 16/0.2, 32/0.4, 64/0.8, 128/1.6 $\mu\text{g/mL}$ OEO/AgNp-bio), 40%/60% (6.4/0.12, 12.8/0.24,
4 25.6/0.48, 51.2/0.96, 102.4/1.92 $\mu\text{g/mL}$ OEO/AgNp-bio) and 20%/80% (3.2/0.16,
5 6.4/0.32, 12.8/0.64, 25.6/1.28, 51.2/2.56 $\mu\text{g/mL}$ OEO/AgNp-bio) for 24 h in the same
6 conditions. Subsequently, the cells were washed with PBS and MTT (5 mg/mL) was
7 added to the wells, followed by further incubation for 4 h. The MTT product (formazan
8 crystals) was diluted with 300 μL of DMSO, transferred to a 96-well plate and read on
9 a spectrophotometer (Thermo Scientific, Multiskan GO) at 550 nm. As a negative
10 control, untreated macrophages were used, while the positive control was cells treated
11 with 4% H_2O_2 (Anhydrol, SP, BR). The results were expressed as a percentage of
12 viability compared to the control group and calculated using the following formula: %
13 (viable macrophages) = sample from the treated group / mean from the untreated
14 control) x 100.

15

16 **2.7 Isobologram construction using the fixed-ratio method from OEO and AgNp** 17 **combination**

18 The interaction dynamics of AgNp and OEO was studied by the method of
19 fixed proportions described by (SEIFERT; CROFT, 2006) to obtain the IC_{50} (inhibitory
20 concentration of 50% of the parasites) and CC_{50} (cytotoxicity concentration of 50% of
21 the peritoneal macrophages) of each proportion of the OEO/ AgNp association. For
22 this, the association of OEO/ AgNp was evaluated in the following proportions: (P1 =
23 80%/20%, P2 = 60%/40%, P3 = 50%/50%, P4 = 40%/60% and P5 = 20%/80%) that
24 correspond to the doses of (P1 = 12.8/0.04, P2 = 9.6/0.08, P3 = 8/0.1/ P4 = 6.4/0.12
25 and P5 = 3.2/0.16 $\mu\text{g/mL}$ OEO/ AgNp). Thus, was constructed an isobologram for anti-
26 leishmania activity and one for the viability of macrophages, where on the x-axis of the
27 graph the AgNp dose was placed and on the y-axis the OEO dose, drawing an
28 additivity line between the values of the isolated substances, wherein points below the
29 line indicating synergistic effect, points on the line indicating additive effect and points
30 above the line they indicate antagonistic effect (ZHAO; WIENTJES; AU, 2004).

31

32 **2.8 Calculation of combination index**

33 The value and efficiency of this association can be demonstrated through
34 mathematical calculations using tools such as the CI (combination index) (HALL;

1 MIDDLETON; WESTMACOTT, 1983). The CI can be calculated using the formula: CI
2 = $(IC_{50} \text{ combined OEO} / IC_{50} \text{ OEO alone}) + (IC_{50} \text{ combined AgNp} / IC_{50} \text{ AgNp alone})$
3 for activity in promastigotes and, $CI = (CC_{50} \text{ OEO combined} / CC_{50} \text{ OEO alone}) + (CC_{50}$
4 $\text{AgNp combined} / CC_{50} \text{ AgNp alone})$ for cytotoxicity on peritoneal macrophages, where
5 $CI < 1, = 1 \text{ or} > 1$ indicates synergistic, additive and antagonistic effect, respectively
6 (CHOU; TALALAY, 1984).

7

8 **2.9 Morphological and ultrastructural analysis of promastigotes by scanning** 9 **electron microscopy and transmission electron microscopy**

10 Promastigote forms of *L. amazonensis* (10^6) were treated with the association
11 in the chosen dose (OEO 9.6 $\mu\text{g/mL}$ and AgNp 0.08 $\mu\text{g/mL}$) and incubated for 24 h.
12 Afterwards, the parasites were collected by centrifugation, washed in PBS 0.01 M pH
13 7.2 and fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer.

14 For evaluation of morphological changes by SEM, promastigotes fixed with
15 glutaraldehyde were adhered to coverslips covered with poly-L-lysine for 60 min.
16 Afterwards, they were washed with 0.1 M sodium cacodylate buffer, dehydrated in
17 increasing concentrations of ethanol (30 - 100%), dried at a critical point by replacing
18 ethanol with CO_2 , coated with gold, and analyzed using a high-resolution double beam
19 electron microscope FEI SCIOS (DA SILVA et al., 2013).

20 For evaluation of ultrastructural changes by MET, promastigotes fixed with
21 glutaraldehyde were transferred to microtubes, washed three times with 0.1 M sodium
22 cacodylate buffer and post-fixed in a solution of 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium
23 ferrocyanide, and 10.0 mM CaCl_2 in 0.1 M sodium cacodylate buffer at room
24 temperature and protected from light. After, the samples were washed with 0.1 M
25 sodium cacodylate buffer, dehydrated in increasing concentrations of acetone (50 -
26 100%), included in EPON resin and polymerized at 60 °C for 72 h. Ultrathin sections
27 were made in ultramicrotome, deposited on a copper grid, contrasted with uranyl
28 acetate and lead citrate, for 20 and 10 min, respectively. The analysis was performed
29 using a transmission electron microscope JEOL JEM 1400 (SANTOS, 2011).

30

31 **2.10 Detection of reactive oxygen species**

32 Promastigote forms (10^6) were treated with an association at the chosen dose
33 (OEO 9.6 $\mu\text{g/mL}$ + AgNp 0.08 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. After, the parasites were washed with
34 PBS and loaded with 10 μM of the probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

1 (H₂DCFDA) (Sigma St. Louis, MO, USA) and incubated in the dark for 30 minutes at
2 25 °C. As a positive control, was used 4% H₂O₂ for 30 minutes. ROS were measured
3 as an increase in fluorescence caused by the conversion of the non-fluorescent dye to
4 the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), in spectrofluorimeter (Victor X3,
5 PerkinElmer, Finland), at excitation and emission wavelengths of 488 nm and 530 nm,
6 respectively.

7

8 **2.11 Detection of nitric oxide**

9 Nitric oxide (NO) was determined by the Griess method. For this, in 60 µL
10 aliquots for direct assay on promastigotes forms was added 60 µL of Griess reagent
11 (1% sulfanilamide and 0.1% of naphthyltylamidine amino acid in orthophosphoric
12 hydrochloride (H₃PO₄) 5%) and incubated for 10 min, at room temperature. After
13 incubation, the samples were placed in 96-well microplates. A standard curve made
14 using serial dilutions of NaNO₂, and the absorbance was determined at 550 nm in a
15 microplate reader (Thermo Scientific, Multiskan GO).

16

17 **2.12 Determination of mitochondrial membrane potential**

18 Promastigote forms (10⁶) treated with an association at the chosen dose (OEO
19 9.6 µg/mL and AgNp 0.08 µg/mL) for 24 h in order to assess the potential of the internal
20 mitochondrial membrane ($\Delta\Psi_m$). The treated parasites were washed and incubated
21 with 2.5 µM tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,
22 USA) for 30 min at 25 °C and analyzed in a spectrofluorimeter (Victor X3, PerkinElmer,
23 Finland) at excitation wavelengths of 480 nm and emission of 580 nm.

24

25 **2.13 Evaluation of lipid bodies**

26 Promastigote forms (10⁶) treated with an association at the chosen dose (OEO
27 9.6 µg/mL + AgNp 0.08 µg/mL) were harvested and washed twice in PBS and stained
28 with 10 µg/mL of Nile red (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 30 min at 25 °C. The
29 presence of cytoplasmic lipid bodies was detected in spectrofluorimeter (Victor X3,
30 Perkin-Elmer, Finland) at excitation and emission wavelengths of 530 nm and 635 nm,
31 respectively.

32

33

34

1 **2.14 Evaluation of autophagic vacuoles**

2 The presence of autophagic vacuoles was evaluated in promastigote forms
3 treated for 24 hours with association in the chosen dose (OEO 9.6 µg/mL + AgNp 0.08
4 µg/mL). The parasites were washed twice in PBS, incubated with 5 µL of
5 monodansilcadaverine (MDC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 1 h at 25 °C
6 and analyzed using a spectrofluorimeter (Victor X3, Perkin-Elmer, Finland) at
7 excitation and emission wavelengths of 380 nm and 525 nm, respectively.

8 **2.15 Detection of phosphatidylserine exposure**

9 Promastigote forms (10^6) treated with the combination at the chosen dose
10 (OeO 9.6 µg/mL + AgNp 0.08 µg/mL) for 24 h, were washed and resuspended in 100
11 µL of 1x assay buffer (Santa Cruz Biotechnology), followed by adding a mixture
12 containing 1 µL of annexin-V/FITC (Invitrogen, Eugene, USA) and 5 µL of propidium
13 iodide (PI) (Santa Cruz Biotechnology). Data analysis was performed using a BD
14 Accuri™ C6 Plus flow cytometer. A total of 10,000 events were acquired. Cells
15 negative for annexin-V and PI are considered viable, cells stained with annexin-V
16 (positive or negative for PI) were considered apoptotic and cells positive for PI (and
17 negative for annexin-V) were classified as necrotic (DOROODGAR et al., 2016;
18 GHAFFARIFAR et al., 2015).

19

20 **2.16 Antiamastigote assay**

21 Peritoneal macrophages from BALB/c mice (5×10^5) were cultured in 24-well
22 plates containing glass coverslips, incubated with 500 µL of RPMI 1640 medium for 24
23 h at 37 °C and 5% CO₂. The adhering macrophages were infected with promastigote
24 forms of *L. amazonensis* (2.5×10^6) for 2 h. After infection, the non-internalized
25 promastigote forms were removed by washing with PBS and the adherent cells were
26 treated with the combination of the compounds of the chosen proportion (OEO 9.6
27 µg/mL and AgNp 0.08 µg/mL), RPMI 1640 medium (negative control), 0.1% DMSO
28 (vehicle), amphotericin B 1 µM (positive control) for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Then,
29 the cells were stained with methylene blue-eosin solution according to Leishman
30 (Leishman's dye) (Inlab -SP Brazil). A total of 20 fields were analyzed by immersion at
31 1000x magnification, using an optical microscope (Olympus BX41, Olympus Optical
32 Co., Ltd., Tokyo, Japan).

33

34

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

2.17 Determination of nitrite as estimate levels of NO in peritoneal macrophages infected with *L. amazonensis*

NO was determined using the Griess method. Briefly, aliquots of supernatants from the anti-amastigote assay (60 μ L) were centrifuged at 5,000 rpm for 2 min and a volume of 50 μ L of supernatant was recovered and 50 μ L of Griess reagent. After 10 min of incubation at room temperature, the samples placed in 96-well microplates. A standard curve made using serial dilutions of NaNO₂, and the absorbance was determined at 550 nm in a microplate reader (Thermo Scientific, Multiskan GO).

2.18 Production of ROS in macrophages infected with *L. amazonensis*

Macrophages infected with amastigote forms were treated with the dose of the chosen proportion (OEO 9.6 μ g/mL + AgNp 0.08 μ g/mL) for 24 h. After this period, the cells were washed with PBS and loaded with 10 μ M of H₂DCFDA and incubated for 30 min at 37 °C. As a positive control, was used 4% H₂O₂ for 30 minutes. ROS were measured by increase in fluorescence caused by the conversion of the non-fluorescent dye to the highly fluorescent, DCF, in spectrofluorimeter (Victor X3, PerkinElmer, Finland), at excitation and emission wavelengths of 488 nm and 530 nm, respectively.

2.19 Statistical analysis

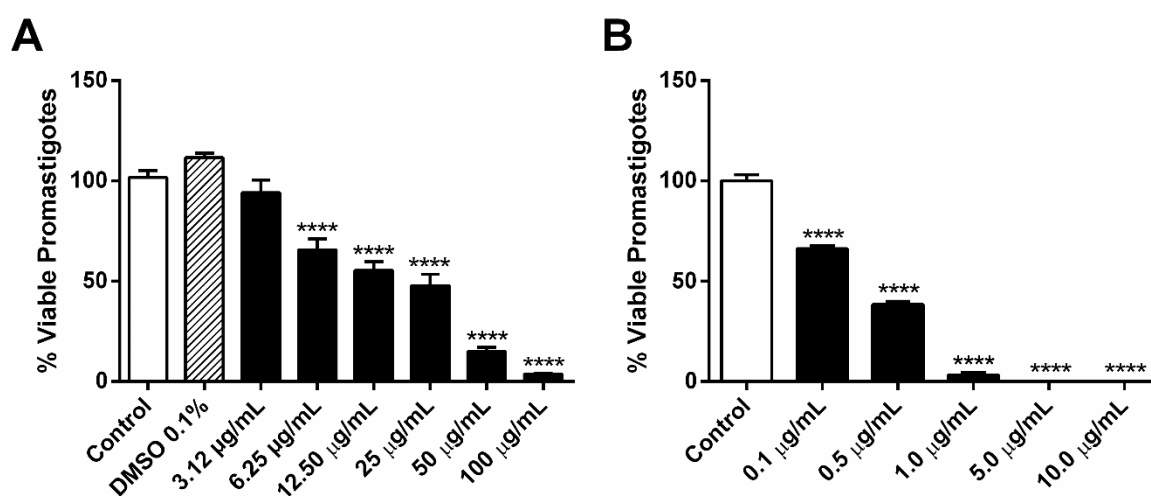
The statistical analyzes were determined by ANOVA, followed by the Tukey test for multiple comparisons. Three independent experiments were carried out, each with data sets in triplicate. The data were expressed as mean \pm standard error of the mean. The data were analyzed using the GraphPad Prism statistical software (GraphPad Software, Inc., USA, 500-288). *p*-value \leq 0.05 was considered statistically significant.

1
2
3
4
5
6
7
8

3. Results

3.1 OEO and AgNp activity isolated and in combination on promastigote forms of *L. amazonensis* and peritoneal macrophages

The values of IC₅₀ of the separate compounds were 16.0±0.05 µg/mL to OEO and 0.2±0.06 µg/mL to AgNp (Fig. 1A, B).



9
10
11
12
13
14
15

Figure 1: Effect of OEO and AgNp on *L. amazonensis* promastigotes treated for 24 h with (A) OEO (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL) and (B) AgNp (0.1, 0.5, 1, 5, 10 µg/mL) and evaluated the percentage of viable promastigotes. DMSO 0.1% (diluent control). The values represent the mean ± SEM of three independent experiments. Asterisks indicate significant difference compared to control **** $p \leq 0.0001$.

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

From these values was calculated the proportions of the association, obtaining the values of IC₅₀ of each proportion (P1=12.7/0.04 (±0.03), P2=7.4/0.06 (±0.04), P3=8.0/0.10 (±0.02), P4=5.1/0.09 (±0.03), P5=2.5/0.13 (±0.03) OEO/AgNp µg/mL) (Table 1). Then the IC₅₀ values of the proportions were used to calculate the CI and the results showed that the proportions P2=60%/40%, P4=40%/60% e P5=20%/80% of OEO and AgNp presented an CI>1 (Table 2), demonstrating a synergistic effect. These results have also been demonstrated through the isobologram, which showed that these proportions are below the line of additivity (Fig. 2A). On the other hand, the proportions P1=80%/20% and P3=50%/50% of OEO and AgNp presented a CI=1, indicating an additive effect. The treatment of isolated

1 compounds on peritoneal macrophages showed CC_{50} of $116.50 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ and
 2 $2.25 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$ for OEO and AgNp, respectively.

3

4 Table1: Proportion between the amounts of OEO/AgNp using the IC_{50} values of the
 5 substances alone

	Fixed Ratio (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	OEO/AgNp		
OEO	100/0	16 (± 0.05)	116.50 (± 0.04)
P1	80/20	12.7/0.04 (± 0.03)	105.60/0.33 (± 0.08)
P2	60/40	7.4/0.06 (± 0.04)	90.48/0.75 (± 0.02)
P3	50/50	8/0.10 (± 0.02)	105.90/1.32 (± 0.03)
P4	40/60	5.15/0.09 (± 0.03)	82.01/1.53 (± 0.02)
P5	20/80	2.52/0.13 (± 0.03)	41.06/2.05 (± 0.03)
AgNp	0/100	0.2 (± 0.06)	2.25 (± 0.09)

6 IC_{50} dose required to eliminate 50% of promastigote forms, CC_{50} dose needed to
 7 eliminate 50% of macrophages in the cytotoxicity assay

8

9

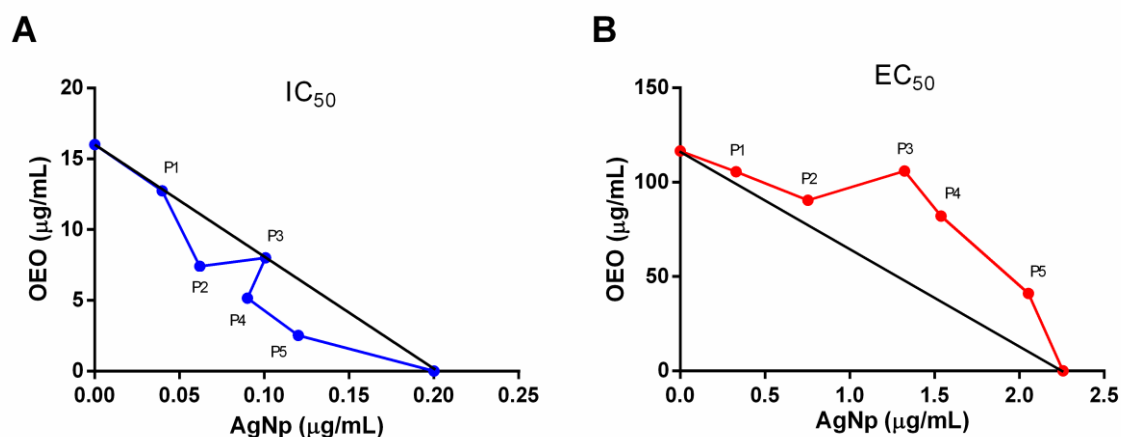
10 Table2: CI Combination index

	Fixed Ratio (%)	CI IC_{50}	CI CC_{50}
	OEO/AgNp		
P1	80/20	0.99	1.05
P2	60/40	0.76	1.11
P3	50/50	1	1.49
P4	40/60	0.77	1.38
P5	20/80	0.80	1.26

11 $CI=1$, the combination is additive, when $CI < 1$, the combination is synergistic and when
 12 $CI > 1$ the combination is antagonistic.

13

14 Subsequently, all proportions were assessed by obtaining the CC_{50} values
 15 (P1= $105.6/0.33 (\pm 0.08)$, P2= $90.48/0.75 (\pm 0.02)$, P3= $105.90/1.32 (\pm 0.03)$,
 16 P4= $82.01/1.53 (\pm 0.02)$, P5= $41.06/2.05 (\pm 0.03)$ $\mu\text{g/mL}$ OEO/AgNp) and the CI value
 17 was calculated, with antagonistic results showing $CI > 1$ (Table 2). The antagonistic
 18 characteristic of the association was also observed in the isobologram, where all
 19 proportions with 50% of toxicity are above the tendency line of the graph (Fig. 2B).



1

2 **Figure 2:** Representative isobologram of *in vitro* interactions between OEO and AgNp
 3 using the method of fixed ratios. Numbers on the axes represent doses calculated from
 4 IC_{50} and CC_{50} values of each compound. (A) activity on promastigotes of *L.*
 5 *amazonensis*; (B) cytotoxicity on peritoneal macrophages from BALB/c.

6

7

8 In the host cell, the treatment proved to be less toxic, since higher doses were
 9 necessary to obtain CC_{50} . From these results, we selected the fixed ratio P2=60%/40%
 10 of OEO/AgNp dose 9.6/0.08 $\mu\text{g/mL}$, since this combination presented the lowest CI:
 11 0.76.

12

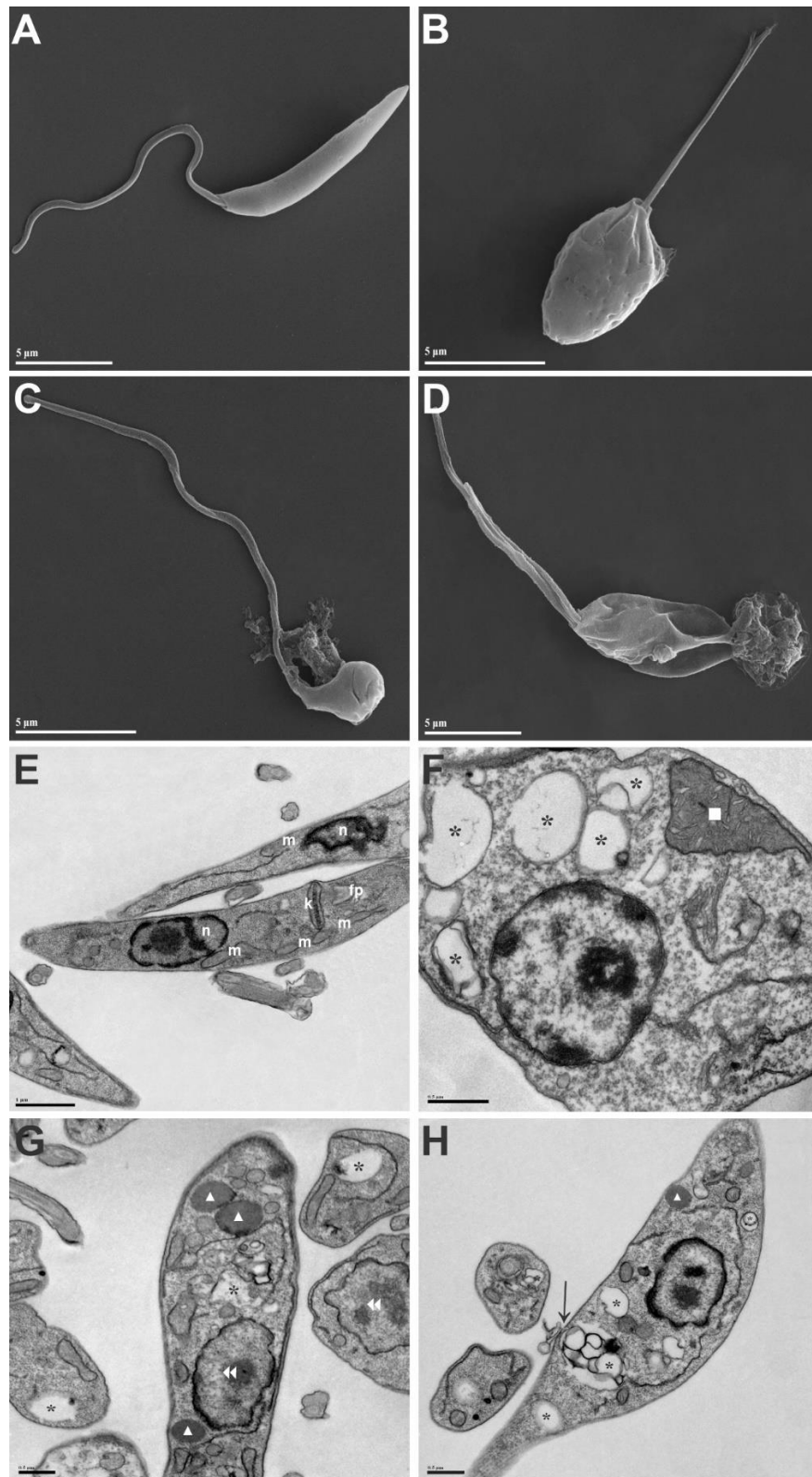
13

14 **3.2 Combination of OEO and AgNp induces morphological and ultrastructural** 15 **alterations in *L. amazonensis* promastigotes**

16

17 After determining the best proportion (P2), SEM and TEM was performed to
 18 determine the morphological and ultrastructural changes induced by the treatment in
 19 promastigotes. Untreated parasites showed normal characteristics compatible with
 20 elongated body, flagellum proportional to body size, smooth and intact cell surface and
 21 well-preserved structures (Fig. 3A,E). Meanwhile, parasites treated with the
 22 association showed morphological and ultrastructural changes, such as cell surface
 23 roughness, rounded shape and reduction of cell body size, reduced flagellum, leakage
 24 of cytoplasmic contents (Fig. 3B-D), mitochondrial swelling, accumulation of lipid-
 storage bodies and autophagic vacuoles in the cytoplasm, DNA disorganization in
 nuclei and damage to the plasma membrane (Fig. 3F-H).

24



1

2 **Figure 3:** Morphological and ultrastructural changes on promastigotes of *L.*
 3 *amazonensis* treated with 9.6/0.08 µg/mL OEO/AgNp for 24 h. (A-D) SEM images: (A)
 4 untreated promastigotes; (B-D) OEO/AgNp treated-promastigotes. (E-H) TEM images:
 5 (E) untreated promastigotes; (F-H) OEO/AgNp treated-promastigotes. fp, flagellar
 6 pocket; k, kinetoplast; m, mitochondrion; n, nucleus; *, autophagic vacuole; ■, swelling
 7 mitochondrial; ▲, lipid-storage bodies; ►►, DNA disorganization in nuclei; →, alteration
 8 of the plasma membrane. Scale bars = 5 µm (A-D), 1 µm (E), 0.5 µm (F-H).

3.3 Combination of OEO and AgNp exerts an antipromastigote effect by altering mitochondrial integrity thus forming lipid bodies and autophagy vacuoles

SEM and TEM analysis showed that the association induced morphological and ultrastructural changes in the parasites (Fig. 3). Thus, different markers were used to assess biochemical targets that could be affected by treatment with this association.

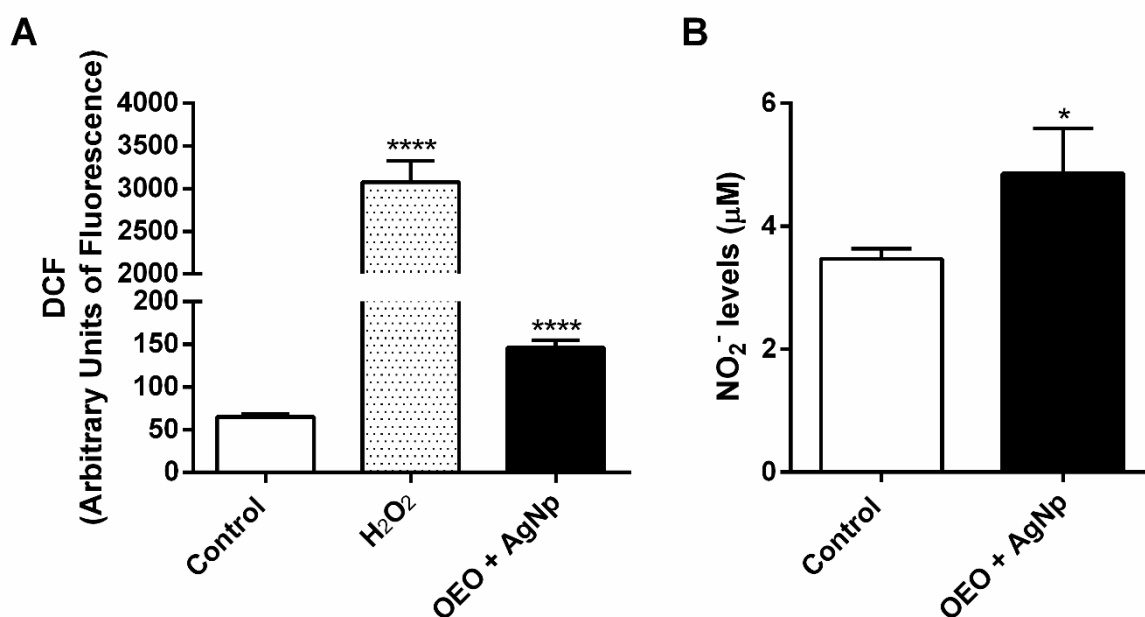
Based on analysis by TEM, that showed the effect of association of OEO/AgNp on mitochondrion of promastigotes, we initially decided to evaluate the ROS and NO production and $\Delta\Psi_m$ in OEO-AgNp treated-parasites and marked with H₂DCFDA, Griess reagent and TMRE, respectively. The mitochondria are a major site of ROS production. Mitochondria provide the majority of ATP through a process known as oxidative phosphorylation, that involve the active transfer of positively charged protons across the inner mitochondrial membrane, resulting in a mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$), that can be detected by staining cells with positively charged dyes, such as TMRE (CROWLEY; CHRISTENSEN; WATERHOUSE, 2016). Increases in production of oxidant species result in mitochondrial dysfunction, such as alterations in the $\Delta\Psi_m$. A significant loss of $\Delta\Psi_m$ depletes cells of energy, with subsequent death (JOSHI; BAKOWSHA, 2011). Our results demonstrated that the association induced an increase in ROS and NO in promastigotes when compared with control (Fig. 4). Moreover, the treatment induced a decrease in the total fluorescence by 21.7% of the TMRE in relation to the control group, indicating loss of mitochondrial integrity (Fig. 5A).

Analysis by TEM also showed an accumulation of lipid-storage bodies in the cytoplasm. Furthermore, since mitochondrial dysfunctions, such as mitochondrial depolarization, induces an increase in lipid bodies, we investigated their presence in parasites treated with the association by staining with Nile red, a fluorescent dye with a high affinity to neutral lipids (LEE et al., 2013). Our results exhibited an increase in fluorescence by 76.68% in relation to the control, showing the increase of the formation of lipid bodies (Fig. 5B).

Additionally, it was observed by TEM that treatment with association triggered intense formation of autophagic vacuoles in promastigotes. Moreover, the formation of autophagic vacuoles can be activated in situations of cellular stress, such as an increase in cellular ROS levels (FILOMENI; ZIO; CECCONI, 2014). Thus, we also evaluated whether the treatment induced an increase in autophagic vacuoles, once MDC accumulates as a selective fluorescent marker for autophagic vacuoles. Thus,

1 increased presence of these organelles may precede cell death (MUNAFÓ;
2 COLOMBO, 2001). Parasites treated and marked with MDC presented increase by
3 180% in fluorescence in relation to the control, suggesting the formation of autophagy
4 vacuoles (Fig. 5C).

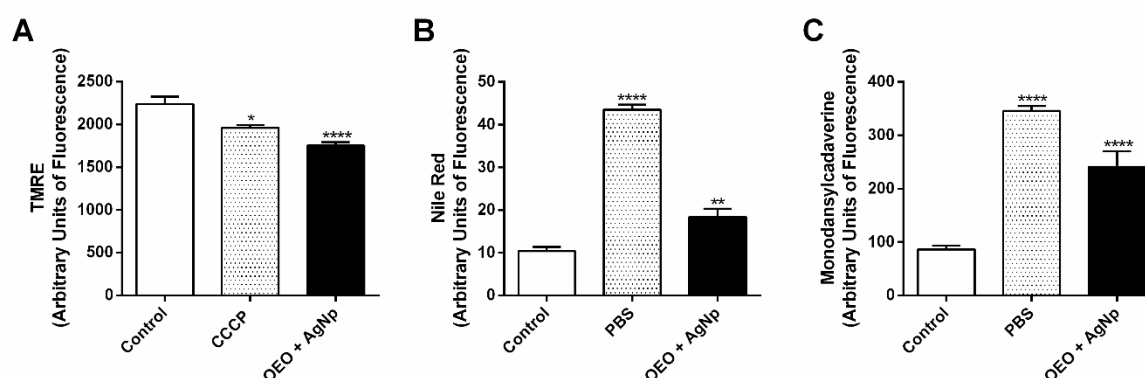
5



6

7 **Figure 4:** ROS and NO production in promastigotes treated with the association at the
8 chosen dose (9.6/0.08 µg/mL OEO/AgNp). (A) Total ROS were measured by increase
9 in fluorescence caused by the conversion of nonfluorescent dye, H₂DCFDA, to
10 fluorescent, DCF; (B) Griess method for nitrite levels in supernatant. The values
11 represent the mean ± SEM of three independent experiments performed in duplicate.
12 Asterisks indicate significant difference compared to control *($p \leq 0,05$), ****($p \leq 0,0001$).

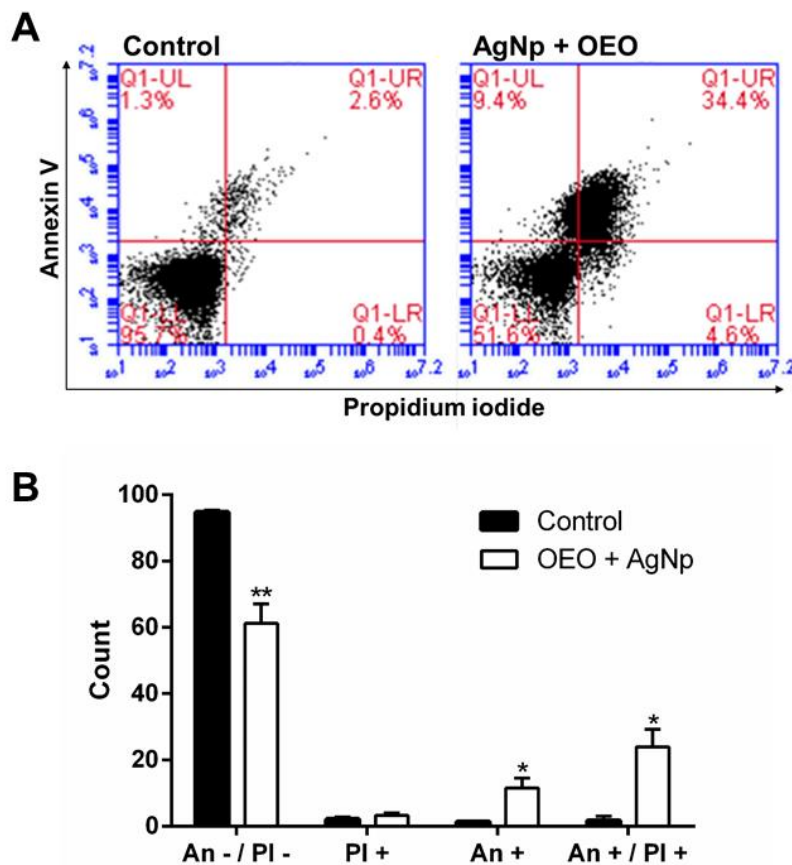
13



14

15 **Figure 5:** Biochemical targets affected by treatment with the association OEO/AgNp
16 in *L. amazonensis* promastigotes treated with the dose combination of 9.6/0.08 µg/mL
17 OEO/AgNp. (A) Mitochondrial membrane potential assay using TMRE labeling; (B)
18 Lipid storage bodies using Nile red labeling; (C) Autophagy vacuoles using MDC

1 labeling. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed
 2 in duplicate. Asterisks indicate significant difference ** compared to control *($p \leq 0.05$), **
 3 ($p \leq 0.01$), ****($p \leq 0.0001$).
 4 All of the morphological, ultrastructural and biochemical alterations induced by
 5 association observed so far, suggest cell death by apoptosis-like. Thus,
 6 phosphatidylserine exposure was assessed using annexin V/PI. Phosphatidylserine is
 7 a phospholipid naturally present in the inner plasma membrane leaflet that switches to
 8 the outer leaflet during apoptosis, and annexin V is a marker that bind in phospholipid
 9 classes (BASMACIYAN; CASANOVA, 2019). PI, a probe that binds to DNA only in
 10 ruptured membrane cells (SHUKLA; PATRA; DUBEY, 2012). Our data showed that
 11 the proportion of promastigotes that were annexin V+ was 9.4%, PI+ was 4.6% and
 12 double positive (annexin V+/ PI+) was 34.4%, after 24 h treatment with the association,
 13 indicating a predominance of the of double annexin V and PI marking (Fig. 6) indicating
 14 late apoptosis.



15

16 **Figure 6:** Phosphatidylserine exposure in promastigotes treated with the association
 17 at the chosen dose (9.6/0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OEO/AgNp) using annexin-V/FITC and PI. Data
 18 acquisition and analysis flow cytometer with total of 10,000 events. (A) Typical dot plot
 19 of three independent experiments. (B) Count of *L. amazonensis* promastigotes co-

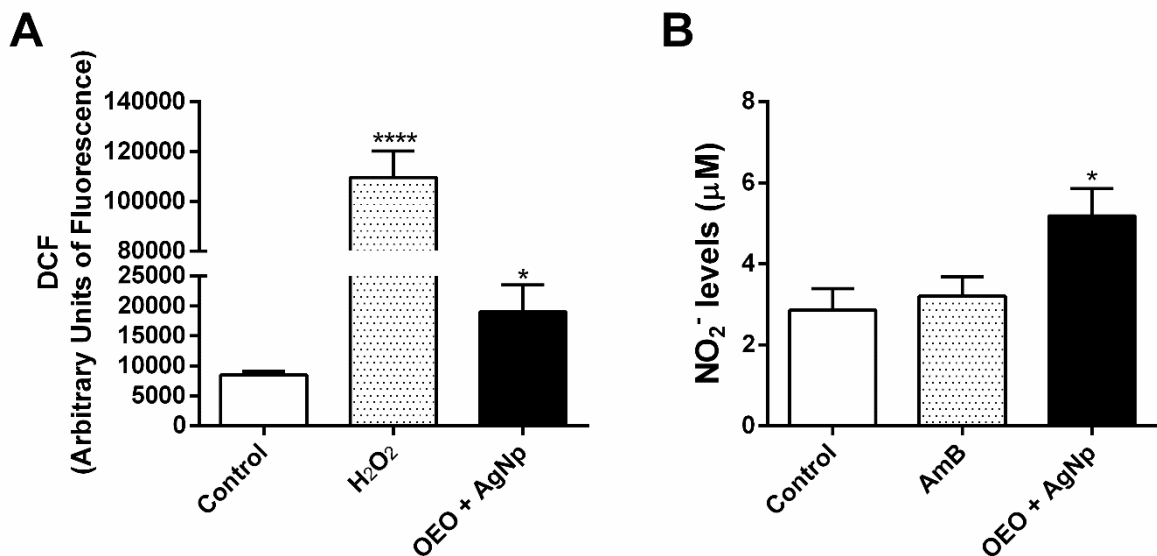
1 staining of annexin-V/FITC and PI analyzed by flow cytometry. Asterisks indicate
 2 significant difference compared to control *($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$).
 3

4 **3.4 Combination of OEO and AgNp induces NO and ROS increase in infected** 5 **macrophages e anti-amastigote activity**

6 Since amastigotes are intracellular forms, we investigated the effect of the
 7 association on infected macrophages. For this, the production of NO and ROS in these
 8 cells was evaluated. The results showed a significant increase in NO and ROS
 9 compared to the control (Fig. 7).

10 Consequently, amastigotes treated with the P2 ratio induced a significant
 11 reduction of infected macrophages in $34\% \pm 2.96$ ($p \leq 0.0001$), while with the positive
 12 control, AmB, induced a reduction of the $46\% \pm 1.39$ ($p \leq 0.0001$) in relation of control.
 13 The treatment with the association showed no significant difference in relation to the
 14 AmB. In relation of amount of amastigotes per macrophage, the association has
 15 showing similar effect to the standard drug, AmB, presenting a reduction of 30.7% ($p \leq$
 16 0.01) (Fig. 8).

17



18

19 **Figure 7:** Intramacrophagic *L. amazonensis* death by association of OEO/AgNp is
 20 dependent on NO and ROS. *L. amazonensis*-infected macrophages submitted to a 24
 21 h of treatment with OEO/AgNp (A) fluorescent probe H₂DCFDA for reactive oxygen
 22 species measurement in culture cells, (B) Griess method for nitrite levels in culture
 23 supernatant. The values represent the mean \pm SEM of three independent experiments
 24 performed in duplicate. * ($p < 0,05$), **** ($p < 0,0001$).
 25
 26

1 effects is increasing. The use of nanotechnology also has shown to be a promising
2 strategy, since, it is a delivery system that carry drugs at specific targets (FAJARDO et
3 al., 2016, ESPUELAS; SCHWARTZ; MORENO, 2016). Moreover, the association of
4 drugs are also promising methods that have stood out in the study against *Leishmania*
5 sp. (GONÇALVES-OLIVEIRA et al., 2019, PASTOR et al., 2015, TOLOUEI et al.,
6 2011, SEIFERT; CROFT, 2006).

7 In our study, an important synergistic leishmanicidal effect of the association of
8 AgNp with OEO was demonstrated, since some proportions showed CI values <1 and
9 in the isobologram some proportions were below the additivity line. Similar results
10 observed by Scandorieiro et al (2016), which showed the synergetic effect of the
11 association OEO+ AgNp in multi resistance bacteria. In addition, an antagonist effect
12 of the association was demonstrated in peritoneal macrophages, indicating a greater
13 safety in the administration of this association in relation to the isolated products.
14 Pastor et al (2015) also presented similar results using the combination of ascaridol
15 and carvacrol with CI > 1 and combinations above the additivity line in isobolograms.

16 SEM and TEM showed that the association induced several morphological and
17 ultrastructural changes in promastigotes of *L. amazonensis*. Previous studies using
18 different natural or synthetic compounds on *L. amazonensis* promastigotes reported
19 similar changes to that observed in our study. (MIRANDA-SAPLA et al.,
20 2019, TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018, BORTOLETI et al., 2018, DA SILVA et al.,
21 2013, SANTOS et al., 2011).

22 We also showed the likely mechanism by which this association exert their
23 antileishmanial effects. We initially focused our studies on investigating alterations in
24 mitochondrion. An notable characteristics of *Leishmania* spp. are its single
25 mitochondrion and the survival of this parasite depends on the perfect functioning of
26 this organelle (FIDALGO; GILLE, 2011,FRANTZ; WIPF, 2010).

27 We observed an increase in the production of ROS in treated promastigotes.
28 ROS are molecules derived from the incomplete one-electron reduction of molecular
29 oxygen, and high concentrations might induce oxidative damage (CADENAS; DAVIES,
30 2000). The association of OEO+AgNp also increase the NO, a short-lived free radical,
31 than can react with proteins and nucleic acids (ALI; HAMDY; MOHAMED, 2012).
32 Therefore, this association may be inducing an oxidative imbalance in promastigotes,
33 attributable to an increase in oxidant species. Similar results were obtained previously

1 in trypanosomatids by using another active compounds (SCARIOT et al., 2019;
2 LAZARIN-BIDÓIA et al., 2015).

3 Increases in oxidant species induce mitochondrial dysfunction, such as
4 alterations in the $\Delta\Psi_m$ (KANG; PERVAIZ, 2012). In this study, TMRE staining revealed
5 marked reductions in the $\Delta\Psi_m$. The $\Delta\Psi_m$ is essential for maintaining the physiological
6 function of the respiratory chain, and a significant loss of $\Delta\Psi_m$ depletes cells of energy,
7 with subsequent death (CROWLEY; CHRISTENSEN; WATERHOUSE, 2016). Studies
8 of leishmanicidal compounds that target *L. amazonensis* mitochondrion have been
9 published, showing changes in $\Delta\Psi_m$ (INACIO et al., 2012, CORRAL et al., 2014).

10 The association of OEO+AgNp also increased of lipid bodies formation in the
11 cytoplasm, a hallmark of cellular stress resulting from mitochondrial dysfunction,
12 revealed here by Nile red (LEE et al., 2013). ANTINARELLI et al., (2018) also found
13 characteristics of mitochondrial dysfunction associated with an increase of lipid bodies
14 when promastigotes of *L. amazonensis* were exposed to 4-88 hydrazinoquinoline
15 analog, these results being compatible with those found in our study.

16 The mitochondrial depolarization associated with the accumulation of lipid
17 bodies in the cytoplasm, are events characteristic of the occurrence of apoptose-like
18 cell death. In fact, is well described in the literature that apoptosis is characterized by
19 several morphological features among which cell rounding, cell shrinkage, chromatin
20 condensation, nuclear fragmentation, few ultrastructural modifications of cytoplasmic
21 organelles, plasma membrane modifications with maintenance of its integrity
22 membrane (BASMACIYAN; CASANOVA, 2019). In our study, we observed that
23 OEO+AgNp induced similar changes in promastigotes of *L. amazonensis*, revealed by
24 electron microscopy. Furthermore, the treatment with the association demonstrated
25 positive parasites for Annexin V/FITC and PI co-staining, indicating late apoptosis.

26 In addition, the presence of autophagy vacuoles also was observed in our study,
27 by MDC labeling. The increase in the formation of autophagic vacuoles can be mainly
28 induced by the increases in cellular ROS levels (FILOMENI; ZIO; CECCONI, 2014).
29 Autophagy, can induce apoptosis, by degrading parts of the cell after sequestration in
30 autophagosomes and degradation within lysosomes, or by activating the apoptotic
31 pathway (MARIÑO et al. 2014).

32 Amastigotes is an obligatory intracellular parasite localized in parasitophorous
33 vacuoles of phagocytic cells of the host (ARENAS et al., 2017). In our study, we
34 observed the anti-amastigote effect of the association in macrophages infected by *L.*

1 *amazonensis*, since a reduction in the percentage of infected macrophages and also
2 the number of intracellular parasites was observed. An increase of ROS and NO in
3 infected macrophages also observe after treatment with the association. Several
4 studies also describe similar results, demonstrating that the probable mechanism of
5 death of *Leishmania* spp. is through molecules such as ROS and NO released by
6 infected macrophages (MIRANDA-SAPLA et al., 2019, BORTOLETI et al., 2018,
7 GONÇALVES et al., 2018). However, the increase in ROS and NO in infected
8 macrophages with amastigotes of *L. amazonensis* was not observed by FANTI et al.
9 (2018) which used only AgNp, which leads us to believe that this increase found in our
10 study is due to the presence of OEO and/or the synergistic effect produced by the
11 association of OEO+AgNp.

12

13 **5. Conclusions**

14 In conclusion, our results demonstrate that the association of OEO and AgNp
15 has a synergistic leishmanicidal effect *in vitro* on promastigote forms of *L.*
16 *amazonensis*, through metabolic events that cause cell death by late apoptosis. In
17 addition, the association exhibited a reduction in relation to toxicity in peritoneal
18 macrophages and a leishmanicidal effect in amastigotes probably due to the action of
19 ROS and NO. These results encourage us to continue the studies, seeking to elucidate
20 the mechanisms of action involved in the death of this parasite.

21

22

23 **6. Conflict of interest**

24 The authors have no conflict of interests to declare.

25

26

27 **7. Bibliography**

28 ABBASI, E. et al. Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications
29 and properties. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 173–180, 2016.

30 ALEXANDER, WESLEY, J. History of the medical use of silver. **Surgical**
31 **Infections**, v. 10, n. 3, p. 289–294, 2009.

32 ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. Antileishmanial effect of silver nanoparticles
33 and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. **International journal**
34 **of nanomedicine**, v. 6, p. 2705–2714, 2011.

- 1 ARENAS, R. et al. Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p.
2 1–15, 2017.
- 3 ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in
4 Diagnosis and Management. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33,
5 n. 1, p. 101–117, 2019.
- 6 BAIOTTO, P. et al. Inhibitory Effect of Silver Nanoparticles on Trypanothione
7 Reductase. **Molecular Biology**, p. 230–233, 2011.
- 8 BASMACIYAN, L.; CASANOVA, M. Cell death in Leishmania . **Parasite**, v.
9 26, p. 71, 2019.
- 10 BEHRA, R. et al. Bioavailability of silver nanoparticles and ions: From a
11 chemical and biochemical perspective. **Journal of the Royal Society Interface**, v.
12 10, n. 87, 2013.
- 13 BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: Clinical, diagnostic, and
14 chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**,
15 v. 24, n. 4, p. 684–703, 1997.
- 16 BEZERRA, G. S. N. et al. Urine as a promising sample for Leishmania DNA
17 extraction in the diagnosis of visceral leishmaniasis – a review. **Brazilian Journal of**
18 **Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 111–120, 2019.
- 19 BOLLENBACH, T. Antimicrobial interactions: Mechanisms and implications for
20 drug discovery and resistance evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 27, p.
21 1–9, 2015.
- 22 BORTOLETI, B. T. DA S. et al. Grandiflorenic acid promotes death of
23 promastigotes via apoptosis-like mechanism and affects amastigotes by increasing
24 total iron bound capacity. **Phytomedicine**, v. 46, n. March, p. 11–20, 2018.
- 25 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de recomendações para**
26 **diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção**
27 **leishmania-HIV**. [s.l: s.n.].
- 28 BURT, S. Essential oils : their antibacterial properties and potential
29 applications in foods — a review. v. 94, p. 223–253, 2004.
- 30 BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v.
31 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.
- 32 CAMPOS-NETO, A. What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine
33 discovery? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p.
34 979–984, 2005.

- 1 CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the
2 treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p.
3 1251–1265, 2019.
- 4 CORRAL, M. J. et al. In Vitro synergistic effect of amphotericin B and allicin on
5 *Leishmania donovani* and *L. infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,
6 v. 58, n. 3, p. 1596–1602, 2014.
- 7 CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of
8 trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508–
9 512, 2005.
- 10 CROWLEY, L. C.; CHRISTENSEN, M. E.; WATERHOUSE, N. J. Measuring
11 mitochondrial transmembrane potential by TMRE staining. **Cold Spring Harbor**
12 **Protocols**, v. 2016, n. 12, p. 1092–1096, 2016.
- 13 DA SILVA, S. S. et al. Brazilian propolis antileishmanial and
14 immunomodulatory effects. **Evidence-based Complementary and Alternative**
15 **Medicine**, v. 2013, 2013.
- 16 DE BRITO, M. E. F. et al. Leishmaniose cutânea no nordeste do Brasil: Uma
17 avaliação crítica dos estudos realizados no estado de Pernambuco. **Revista da**
18 **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 425–429, 2012.
- 19 DE LIMA, R.; SEABRA, A. B.; DURÁN, N. Silver nanoparticles: A brief review
20 of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized
21 nanoparticles. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, n. 11, p. 867–879, 2012.
- 22 DE MEDEIROS, M. DAS G. F. et al. In vitro antileishmanial activity and
23 cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v.
24 60, n. 3, p. 237–241, 2011.
- 25 DE SOUZA, E. L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on
26 enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of
27 *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2–
28 3, p. 308–311, 2010.
- 29 DETONI, M. B. et al. Temporal and spatial distribution of american
30 tegumentary leishmaniasis in North Paraná: 2010-2015. **Revista da Sociedade**
31 **Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1–6, 2019.
- 32 DOROODGAR, M. et al. Tamoxifen induces apoptosis of *leishmania major*
33 promastigotes in vitro. **Korean Journal of Parasitology**, v. 54, n. 1, p. 9–14, 2016.
- 34 DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles

- 1 by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, p. 1–
2 7, 2005.
- 3 ESCOBAR, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of
4 Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memorias do**
5 **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184–190, 2010.
- 6 ESPUELAS, S.; SCHWARTZ, J.; MORENO, E. Nanoparticles in the Topical
7 Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: Gaps, Facts, and Perspectives.
8 **Nanoscience in Dermatology**, p. 135–155, 2016.
- 9 FAJARDO, S. et al. Crossing Biological Barriers for Leishmaniasis Therapy:
10 From Nanomedicinal Targeting Perspective. **Intech**, v. i, n. tourism, p. 13, 2016.
- 11 FANTI, J. R. et al. Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania*
12 *amazonensis* promastigote and amastigote death in vitro. **Acta Tropica**, v. 178, n.
13 October 2017, p. 46–54, 2018.
- 14 FARIAS-JUNIOR, A. P. et al. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential
15 oil from *Lippia sidoides* cham. **Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 399–402, 2012.
- 16 FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: Targets and
17 drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2758–2770, 2011.
- 18 FISCHBACH, M. A. Combination therapies for combating antimicrobial
19 resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 519–523, 2011.
- 20 FRANTZ, M. C.; WIPF, P. Mitochondria as a target in treatment.
21 **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 51, n. 5, p. 462–475, 2010.
- 22 GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines:
23 Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death**
24 **and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012.
- 25 GHAFFARIFAR, F. et al. Evaluation of apoptotic and antileishmanial activities
26 of artemisinin on promastigotes and BALB/C mice infected with *Leishmania major*.
27 **Iranian Journal of Parasitology**, v. 10, n. 2, p. 258–267, 2015.
- 28 GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine
29 therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25–40, 2018.
- 30 GONÇALVES-OLIVEIRA, L. F. et al. The combination therapy of meglumine
31 antimoniate and oxiranes (epoxy- α -lapachone and epoxy-methyl-lawsone) enhance
32 the leishmanicidal effect in mice infected by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.
33 **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 10, n.
34 August, p. 101–108, 2019.

- 1 GONÇALVES, M. D. et al. Dehydroabietic acid isolated from *Pinus elliottii*
2 exerts in vitro antileishmanial action by pro-oxidant effect, inducing ROS production
3 in promastigote and downregulating Nrf2/ferritin expression in amastigote forms of
4 *Leishmania amazonensis*. **Fitoterapia**, v. 128, n. April, p. 224–232, 2018.
- 5 HALL, M. J.; MIDDLETON, R. F.; WESTMACOTT, D. The fractional inhibitory
6 concentration (FIC) index as a measure of synergy. **Journal of Antimicrobial**
7 **Chemotherapy**, v. 11, n. 5, p. 427–433, 1983.
- 8 HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food
9 preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix
10 components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. JAN, p. 1–24, 2012.
- 11 INACIO, J. D. F. et al. Mitochondrial damage contribute to epigallocatechin-3-
12 gallate induced death in *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v.
13 132, n. 2, p. 151–155, 2012.
- 14 LEE, S. J. et al. Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets
15 as a generalized response to stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.
16 2013, 2013.
- 17 LU, M. et al. Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant
18 clinical isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, 2018.
- 19 MARIÑO, G. et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and
20 apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 81–94, 8 fev.
21 2014.
- 22 MIRANDA-SAPLA, M. M. et al. trans-Chalcone modulates *Leishmania*
23 *amazonensis* infection in vitro by Nrf2 overexpression affecting iron availability.
24 **European Journal of Pharmacology**, v. 853, n. April, p. 275–288, 2019.
- 25 MONZOTE, L. et al. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main
26 components: Activity against *Leishmania*, their mitochondria and other
27 microorganisms. **Experimental Parasitology**, v. 136, n. 1, p. 20–26, 2014.
- 28 MORALES-YUSTE, M. et al. Activity of (-)- α -bisabolol against *Leishmania*
29 *infantum* promastigotes. **Phytomedicine**, v. 17, n. 3–4, p. 279–281, 2010.
- 30 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:
31 Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological**
32 **Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- 33 MURAILLE, E.; LEO, O.; MOSER, M. Th1/Th2 paradigm extended:
34 Macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism?

- 1 **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. NOV, p. 1–12, 2014.
- 2 PASTOR, J. et al. Combinations of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene
3 oxide against Leishmania. **Acta Tropica**, v. 145, n. 601, p. 31–38, 2015.
- 4 PAVLI, F. et al. Antimicrobial Activity of Oregano Essential Oil Incorporated in
5 Sodium Alginate Edible Films: Control of *Listeria monocytogenes* and Spoilage in
6 Ham Slices Treated with High Pressure Processing. **Materials**, v. 12, n. 22, p. 3726,
7 2019.
- 8 PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in
9 leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11,
10 n. 12, p. 1–24, 2017.
- 11 REITHINGER, R. Leishmanioses cutanées. **Annales de Dermatologie et de**
12 **Vénérologie**, v. 146, n. 3, p. 232–246, mar. 2007.
- 13 ROBLEDO, S. et al. In vitro and in vivo cytotoxicities and antileishmanial
14 activities of thymol and hemisynthetic derivatives. **Antimicrobial Agents and**
15 **Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1652–1655, 2005.
- 16 RODRIGUES, A. M. et al. Factors associated with treatment failure of
17 cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. **Revista da Sociedade**
18 **Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 139–145, 2006.
- 19 ROSSI-BERGMANN, B. et al. Therapeutic potential of biogenic silver
20 nanoparticles in murine cutaneous leishmaniasis. **Journal of Nano Research**, v. 20,
21 p. 89–97, 2012.
- 22 SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial activity of basil, oregano,
23 and thyme essential oils. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 3,
24 p. 429–438, 2017.
- 25 SCANDORIEIRO, S. et al. Synergistic and additive effect of oregano essential
26 oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains.
27 **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAY, p. 1–14, 2016.
- 28 SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous
29 manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of**
30 **Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.
- 31 SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in
32 protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592,
33 2016.
- 34 SEIFERT, K.; CROFT, S. L. In vitro and in vivo interactions between

- 1 miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrobial Agents and**
2 **Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 73–79, 2006.
- 3 TOLOUEI, S. et al. Leishmanicidal activity of films containing paromomycin
4 and gentamicin sulfate both in vitro and in vivo. **Iranian Journal of Parasitology**, v.
5 6, n. 3, p. 60–65, 2011.
- 6 TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Caryocar coriaceum extracts exert
7 leishmanicidal effect acting in promastigote forms by apoptosis-like mechanism and
8 intracellular amastigotes by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron
9 depletion: Leishmanicidal effect of Caryocar coriaceum leaf ex. **Biomedicine and**
10 **Pharmacotherapy**, v. 98, n. December 2017, p. 662–672, 2018.
- 11 WHO/PAHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas N° 7 -
12 Março, 2019. **Informe de Leishmanioses N° 7 - Março, 2019**, v. 1, p. 1–27, 2019.
- 13 YOUSSEFI, M. R. et al. In Vitro and in Vivo Effectiveness of Carvacrol, Thymol
14 and Linalool against Leishmania infantum. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 1–11, 2019.
- 15 ZDROJEWICZ, Z. et al. Medical applications of nanotechnology Zastosowanie
16 nanotechnologii w medycynie. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, p.
17 1196–1204, 2015.
- 18 ZHAO, L.; WIENTJES, M. G.; AU, J. L. S. Evaluation of combination
19 chemotherapy: Integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and
20 combination index analyses. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 23, p. 7994–8004,
21 2004.
- 22
23
24
25
26
27
28

1 6 CONCLUSÕES

2

3 A associação do OEO com AgNp apresenta *in vitro* um efeito leishmanicida
4 sinérgico sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e um efeito anti-amastigota
5 através da produção de NO e ROS por macrófagos infectados.

6 A associação OEO+AgNp induz uma diminuição da citotoxicidade em
7 macrófagos peritoniais, em relação a utilização das substâncias isoladas.

8 A associação OEO+AgNp induz alterações morfológicas e ultraestruturais
9 em promastigotas, observadas por MEV e MET, como rugosidade da superfície
10 celular, arredondamento e redução do corpo celular, flagelo reduzido, extravazamento
11 de conteúdo citoplasmático, inchaço mitocondrial, acúmulo de corpos lipídicos e de
12 vacúolos autofágicos no citoplasma, desorganização do DNA nuclear e danos à
13 membrana plasmática.

14 A associação OEO+AgNp induz diversos eventos bioquímicos em
15 promastigotas, como aumento de espécies oxidantes, despolarização mitocondrial,
16 exposição da fosfatidilserina, que acarretam na morte celular por apoptose tardia.

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

1 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

2

3 O presente estudo apresentou indícios de uma possível utilização da
4 associação do OEO com AgNp como alternativa terapêutica para o tratamento de
5 portadores com leishmaniose. Estudos adicionais devem ser realizados para melhor
6 compreender esta associação e também elucidar seus efeitos *in vivo*.

7

8

1 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2 ABBASI, E. et al. Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications
3 and properties. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 173–180, 2016.
- 4 ALEXANDER, WESLEY, J. History of the medical use of silver. **Surgical**
5 **Infections**, v. 10, n. 3, p. 289–294, 2009.
- 6 ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. Antileishmanial effect of silver nanoparticles
7 and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. **International journal**
8 **of nanomedicine**, v. 6, p. 2705–2714, 2011.
- 9 ARENAS, R. et al. Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p.
10 1–15, 2017.
- 11 ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in
12 Diagnosis and Management. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33,
13 n. 1, p. 101–117, 2019.
- 14 BAIOTTO, P. et al. Inhibitory Effect of Silver Nanoparticles on Trypanothione
15 Reductase. **Molecular Biology**, p. 230–233, 2011.
- 16 BASMACIYAN, L.; CASANOVA, M. Cell death in Leishmania . **Parasite**, v.
17 26, p. 71, 2019.
- 18 BEHRA, R. et al. Bioavailability of silver nanoparticles and ions: From a
19 chemical and biochemical perspective. **Journal of the Royal Society Interface**, v.
20 10, n. 87, 2013.
- 21 BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: Clinical, diagnostic, and
22 chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**,
23 v. 24, n. 4, p. 684–703, 1997.
- 24 BEZERRA, G. S. N. et al. Urine as a promising sample for Leishmania DNA
25 extraction in the diagnosis of visceral leishmaniasis – a review. **Brazilian Journal of**
26 **Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 111–120, 2019.
- 27 BOLLENBACH, T. Antimicrobial interactions: Mechanisms and implications for
28 drug discovery and resistance evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 27, p.
29 1–9, 2015.
- 30 BORTOLETI, B. T. DA S. et al. Grandiflorencic acid promotes death of
31 promastigotes via apoptosis-like mechanism and affects amastigotes by increasing
32 total iron bound capacity. **Phytomedicine**, v. 46, n. March, p. 11–20, 2018.
- 33 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de recomendações para**

- 1 **diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção**
2 **leishmania-HIV.** [s.l: s.n.].
- 3 BURT, S. Essential oils : their antibacterial properties and potential
4 applications in foods — a review. v. 94, p. 223–253, 2004.
- 5 BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v.
6 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.
- 7 CAMPOS-NETO, A. What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine
8 discovery? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p.
9 979–984, 2005.
- 10 CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the
11 treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p.
12 1251–1265, 2019.
- 13 CORRAL, M. J. et al. In Vitro synergistic effect of amphotericin B and allicin on
14 *Leishmania donovani* and *L. infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,
15 v. 58, n. 3, p. 1596–1602, 2014.
- 16 CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of
17 trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508–
18 512, 2005.
- 19 CROWLEY, L. C.; CHRISTENSEN, M. E.; WATERHOUSE, N. J. Measuring
20 mitochondrial transmembrane potential by TMRE staining. **Cold Spring Harbor**
21 **Protocols**, v. 2016, n. 12, p. 1092–1096, 2016.
- 22 DA SILVA, S. S. et al. Brazilian propolis antileishmanial and
23 immunomodulatory effects. **Evidence-based Complementary and Alternative**
24 **Medicine**, v. 2013, 2013.
- 25 DE BRITO, M. E. F. et al. Leishmaniose cutânea no nordeste do Brasil: Uma
26 avaliação crítica dos estudos realizados no estado de Pernambuco. **Revista da**
27 **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 425–429, 2012.
- 28 DE LIMA, R.; SEABRA, A. B.; DURÁN, N. Silver nanoparticles: A brief review
29 of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized
30 nanoparticles. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, n. 11, p. 867–879, 2012.
- 31 DE MEDEIROS, M. DAS G. F. et al. In vitro antileishmanial activity and
32 cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v.
33 60, n. 3, p. 237–241, 2011.
- 34 DE SOUZA, E. L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on

- 1 enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of
2 *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2–
3 3, p. 308–311, 2010.
- 4 DETONI, M. B. et al. Temporal and spatial distribution of american
5 tegumentary leishmaniasis in North Paraná: 2010-2015. **Revista da Sociedade**
6 **Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1–6, 2019.
- 7 DOROODGAR, M. et al. Tamoxifen induces apoptosis of leishmania major
8 promastigotes in vitro. **Korean Journal of Parasitology**, v. 54, n. 1, p. 9–14, 2016.
- 9 DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles
10 by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, p. 1–
11 7, 2005.
- 12 ESCOBAR, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of
13 Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memorias do**
14 **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184–190, 2010.
- 15 ESPUELAS, S.; SCHWARTZ, J.; MORENO, E. Nanoparticles in the Topical
16 Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: Gaps, Facts, and Perspectives.
17 **Nanoscience in Dermatology**, p. 135–155, 2016.
- 18 FAJARDO, S. et al. Crossing Biological Barriers for Leishmaniasis Therapy:
19 From Nanomedicinal Targeting Perspective. **Intech**, v. i, n. tourism, p. 13, 2016.
- 20 FANTI, J. R. et al. Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania*
21 *amazonensis* promastigote and amastigote death in vitro. **Acta Tropica**, v. 178, n.
22 October 2017, p. 46–54, 2018.
- 23 FARIAS-JUNIOR, A. P. et al. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential
24 oil from *Lippia sidoides* cham. **Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 399–402, 2012.
- 25 FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: Targets and
26 drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2758–2770, 2011.
- 27 FISCHBACH, M. A. Combination therapies for combating antimicrobial
28 resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 519–523, 2011.
- 29 FRANTZ, M. C.; WIPF, P. Mitochondria as a target in treatment.
30 **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 51, n. 5, p. 462–475, 2010.
- 31 GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines:
32 Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death**
33 **and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012.
- 34 GHAFFARIFAR, F. et al. Evaluation of apoptotic and antileishmanial activities


- 1 of artemisinin on promastigotes and BALB/C mice infected with *Leishmania major*.
2 **Iranian Journal of Parasitology**, v. 10, n. 2, p. 258–267, 2015.
- 3 GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine
4 therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25–40, 2018.
- 5 GONÇALVES-OLIVEIRA, L. F. et al. The combination therapy of meglumine
6 antimoniate and oxiranes (epoxy- α -lapachone and epoxymethyl-lawsone) enhance
7 the leishmanicidal effect in mice infected by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.
8 **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 10, n.
9 August, p. 101–108, 2019.
- 10 GONÇALVES, M. D. et al. Dehydroabietic acid isolated from *Pinus elliottii*
11 exerts in vitro antileishmanial action by pro-oxidant effect, inducing ROS production
12 in promastigote and downregulating Nrf2/ferritin expression in amastigote forms of
13 *Leishmania amazonensis*. **Fitoterapia**, v. 128, n. April, p. 224–232, 2018.
- 14 HALL, M. J.; MIDDLETON, R. F.; WESTMACOTT, D. The fractional inhibitory
15 concentration (FIC) index as a measure of synergy. **Journal of Antimicrobial**
16 **Chemotherapy**, v. 11, n. 5, p. 427–433, 1983.
- 17 HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food
18 preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix
19 components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. JAN, p. 1–24, 2012.
- 20 INACIO, J. D. F. et al. Mitochondrial damage contribute to epigallocatechin-3-
21 gallate induced death in *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v.
22 132, n. 2, p. 151–155, 2012.
- 23 LEE, S. J. et al. Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets
24 as a generalized response to stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.
25 2013, 2013.
- 26 LU, M. et al. Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant
27 clinical isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, 2018.
- 28 MARIÑO, G. et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and
29 apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 81–94, 8 fev.
30 2014.
- 31 MIRANDA-SAPLA, M. M. et al. trans-Chalcone modulates *Leishmania*
32 *amazonensis* infection in vitro by Nrf2 overexpression affecting iron availability.
33 **European Journal of Pharmacology**, v. 853, n. April, p. 275–288, 2019.
- 34 MONZOTE, L. et al. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main

- 1 components: Activity against Leishmania, their mitochondria and other
2 microorganisms. **Experimental Parasitology**, v. 136, n. 1, p. 20–26, 2014.
- 3 MORALES-YUSTE, M. et al. Activity of (-) α -bisabolol against Leishmania
4 infantum promastigotes. **Phytomedicine**, v. 17, n. 3–4, p. 279–281, 2010.
- 5 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:
6 Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological**
7 **Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- 8 MURAILLE, E.; LEO, O.; MOSER, M. Th1/Th2 paradigm extended:
9 Macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism?
10 **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. NOV, p. 1–12, 2014.
- 11 PASTOR, J. et al. Combinations of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene
12 oxide against Leishmania. **Acta Tropica**, v. 145, n. 601, p. 31–38, 2015.
- 13 PAVLI, F. et al. Antimicrobial Activity of Oregano Essential Oil Incorporated in
14 Sodium Alginate Edible Films: Control of *Listeria monocytogenes* and Spoilage in
15 Ham Slices Treated with High Pressure Processing. **Materials**, v. 12, n. 22, p. 3726,
16 2019.
- 17 PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in
18 leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11,
19 n. 12, p. 1–24, 2017.
- 20 REITHINGER, R. Leishmanioses cutanées. **Annales de Dermatologie et de**
21 **Vénérologie**, v. 146, n. 3, p. 232–246, mar. 2007.
- 22 ROBLEDO, S. et al. In vitro and in vivo cytotoxicities and antileishmanial
23 activities of thymol and hemisynthetic derivatives. **Antimicrobial Agents and**
24 **Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1652–1655, 2005.
- 25 RODRIGUES, A. M. et al. Factors associated with treatment failure of
26 cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. **Revista da Sociedade**
27 **Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 139–145, 2006.
- 28 ROSSI-BERGMANN, B. et al. Therapeutic potential of biogenic silver
29 nanoparticles in murine cutaneous leishmaniasis. **Journal of Nano Research**, v. 20,
30 p. 89–97, 2012.
- 31 SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial activity of basil, oregano,
32 and thyme essential oils. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 3,
33 p. 429–438, 2017.
- 34 SCANDORIEIRO, S. et al. Synergistic and additive effect of oregano essential

- 1 oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains.
2 **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAY, p. 1–14, 2016.
- 3 SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous
4 manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of**
5 **Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.
- 6 SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in
7 protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592,
8 2016.
- 9 SEIFERT, K.; CROFT, S. L. In vitro and in vivo interactions between
10 miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrobial Agents and**
11 **Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 73–79, 2006.
- 12 TOLOUEI, S. et al. Leishmanicidal activity of films containing paromomycin
13 and gentamicin sulfate both in vitro and in vivo. **Iranian Journal of Parasitology**, v.
14 6, n. 3, p. 60–65, 2011.
- 15 TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Caryocar coriaceum extracts exert
16 leishmanicidal effect acting in promastigote forms by apoptosis-like mechanism and
17 intracellular amastigotes by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron
18 depletion: Leishmanicidal effect of Caryocar coriaceum leaf ex. **Biomedicine and**
19 **Pharmacotherapy**, v. 98, n. December 2017, p. 662–672, 2018.
- 20 WHO/PAHO. Leishmaniases: Epidemiological Report of the Americas N° 7 -
21 Março, 2019. **Informe de Leishmanioses N° 7 - Março, 2019**, v. 1, p. 1–27, 2019.
- 22 YOUSSEFI, M. R. et al. In Vitro and in Vivo Effectiveness of Carvacrol, Thymol
23 and Linalool against Leishmania infantum. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 1–11, 2019.
- 24 ZDROJEWICZ, Z. et al. Medical applications of nanotechnology Zastosowanie
25 nanotechnologii w medycynie. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, p.
26 1196–1204, 2015.
- 27 ZHAO, L.; WIENTJES, M. G.; AU, J. L. S. Evaluation of combination
28 chemotherapy: Integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and
29 combination index analyses. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 23, p. 7994–8004,
30 2004.

1 ANEXO

2 Comitê de ética em experimentação animal



Universidade
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 88/2018 **Londrina, 06 de Junho de 2018.**

Prezado (a) professor (a)

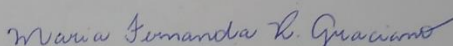
Certificamos que o projeto intitulado: “**Avaliação da utilização da nanopartícula de prata biológica e compostos naturais e sintéticos na leishmaniose *in vitro* e *in vivo*.**” Protocolo CEUA n° 8595.2018.89, sob a responsabilidade de **Ivete Conchon Costa**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) em **05/06/2018**.

O objetivo do trabalho será avaliar o efeito do tratamento com nanopartícula de Prata Biológica (NpAg) em associação com compostos naturais e sintéticos na imunomodulação em macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) amazonenses*. Grau de Invasividade : GII

Vigência do Projeto	01/06/2018 a 31/05/2021
Espécie/linhagem	Camundongo isogênico (BALB/c)
N° de animais	145
Peso/Idade	25g/ 6 a 8 semanas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério da FIOCRUZ de Curitiba
Amostras a serem coletadas	Macrófagos peritoneais, Linfonodo popliteal, Fígado, Lesão leishmaniótica e Soro/plasma

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.


 Prof. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr. (a). Ivete Conchon Costa
 Responsável pelo projeto
 Departamento de Ciências Patológicas /CCB
 C/C para a Chefia do Depto do /CCB
 C/C para a Direção do CCB
 C/C para o Biotério do CCB

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4060 PABX - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 10.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>
LONDRINA - PARANÁ - BRASIL