

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTILEISHMANIAL DA IVERMECTINA
NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR**

Camila Simões de Freitas

Belo Horizonte
2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL DA IVERMECTINA NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor pelo referido Programa.

Orientadores:

Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho – UFMG

Dra. Daniela Pagliara Lage – UFMG

Coorientador:

Dr. Myron Christodoulides – University of
Southampton – Reino Unido

Belo Horizonte

2024

F866a Freitas, Camila Simões de.
Avaliação da atividade antileishmanial da Ivermectina no tratamento da Leishmaniose Tegumentar [recurso eletrônico]. / Camila Simões de Freitas.
-- Belo Horizonte: 2024.
86f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Eduardo Antonio Ferraz Coelho; Daniela Pagliara Lage.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Ivermectina. 2. Leishmaniose Cutânea. 3. Terapêutica. 4. Reposicionamento de Medicamentos. 5. Anfotericina B. 6. Dissertação Acadêmica. I. Coelho, Eduardo Antonio Ferraz. II. Lage, Daniela Pagliara. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: SF 918.I83

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL
ATA DE DEFESA DE TESE

Aos quatro dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e quatro (04/12/2024), às 09:00 (nove) horas, por videoconferência pela plataforma GOOGLE MEET (<https://meet.google.com/may-szdx-qdx>), realizou-se a sessão pública para a 235ª defesa de tese de CAMILA SIMÕES DE FREITAS, número de registro 2020742700, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL. A presidência da sessão coube ao professor EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO - ORIENTADOR (UFMG), DRA. DANIELA PAGLIARA LAGE – ORIENTAÇÃO DUPLA (UFMG), DRA. ISABELA AMORIM GONÇALVES PEREIRA (UFMG), PROF. ALEXSANDRO SOBREIRA GALDINO (UFSJ), PROF. MARIO DA SILVA GIUSTA (UNA-BH), PROF. ROBSON RICARDO TEIXEIRA (UFV). Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de Doutorado, intitulada: *"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL DA IVERMECTINA NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR"*. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e, logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público, e decidiu considerar a tese APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata e ao público, pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão, sendo lavrada a presente ata que, depois de lida e aprovada, foi assinada eletronicamente por todos os membros titulares da Comissão Examinadora presente através do SEI (Sistema Eletrônico de Informações) do Governo Federal.

Belo Horizonte, 04 de dezembro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por Isabela Amorim Gonçalves Pereira, Usuária Externa, em 04/12/2024, às 11:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Daniela Pagliara Lage, Usuário Externo, em 04/12/2024, às 11:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Mário da Silva Giusta, Usuário Externo, em 04/12/2024, às 12:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Alessandro Sobreira Galdino, Usuário Externo, em 04/12/2024, às 12:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 04/12/2024, às 14:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Robson Ricardo Teixeira, Usuário Externo, em 04/12/2024, às 14:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3749366 e o código CRC 8F3DF5FF.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, em especial meus pais, Heron e Eliana, e irmãs, Cin e Carol, que me apoiaram a todo momento e sempre acreditaram e impulsionaram meus sonhos. Ao Paulo Henrique, que mesmo não entendendo nadinha, me escuta como se estivesse interessado no assunto.

Ao professor Eduardo, que acreditou no meu potencial e me deu todo o suporte, confiança e pelos ensinamentos ao longo do processo.

Às minhas amigas da vida, pela paciência de escutar tudo que eu tinha para falar e me ajudarem a manter a sanidade no meio de tanto caos. E às amigas que nasceram por meio desse trabalho, pelo apoio em todos os momentos.

Agradeço aos colegas do laboratório, especialmente à Dani Pagliara, por toda a paciência e ensinamentos, que me fizeram crescer e ver a pesquisa com outros olhos.

I thank all my friends in the UK, that helped me so much during my one year there, they have made my journey so much better and joyful. I am glad I met each one of you!!

E, por fim, gostaria de agradecer à todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para esse trabalho, as quais eu não citei, mas que foram essenciais para sua realização.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Este projeto faz parte de uma das linhas de pesquisa que venho desenvolvendo nos laboratórios da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a supervisão do professor Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho, com o objetivo de identificar novas moléculas para melhorar o tratamento das leishmanioses visceral e tegumentar.

Sou integrante ativa do grupo de pesquisa “Tecnologias Inovadoras para o Controle das Doenças Infecciosas e Tropicais”, registrado na plataforma Carlos Chagas e no Diretório de Grupos de Pesquisa do CNPq. Os projetos nos quais estou envolvida têm como meta melhorar as condições de diagnóstico, prognóstico, tratamento e prevenção de doenças tropicais negligenciadas, especialmente as leishmanioses.

Sou bióloga e nutricionista, realizei o mestrado e agora finalizo o doutorado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, na Universidade Federal de Minas Gerais. Durante meu doutorado, fui selecionada para uma bolsa de doutorado sanduíche do CNPq que me possibilitou desenvolver 1 ano de pesquisa na Inglaterra com foco no desenvolvimento de um teste diagnóstico para as leishmanioses, no laboratório coordenado pelo Professor Myron Christodoulides da University of Southampton.

Toda a minha trajetória possibilitou meu desenvolvimento como pesquisadora, adquirindo experiência nas áreas de Biologia Molecular, Imunologia, Parasitologia e Biotecnologia, tendo publicado mais de 49 artigos científicos em revistas internacionais de alto impacto, além de ter depositado 4 patentes nacionais visando a criação de produtos biotecnológicos que possam contribuir para as grandes questões sociais, econômicas e de saúde pública.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar (LT) é um complexo de doenças parasitárias negligenciadas que afetam milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. O tratamento contra a doença pode estar associado à toxicidade, resistência parasitária e custo elevado, tornando-se urgente o desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras. A Ivermectina (IVE) é um agente antiparasitário que apresenta perfil de segurança estabelecido em uso humano. O medicamento possui propriedades imunomoduladoras que podem ser vantajosas no contexto das leishmanioses, pois é capaz de estimular o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1. Neste contexto, no presente trabalho, a IVE foi usada na forma livre ou incorporada em um sistema de micelas poliméricas baseadas em Poloxâmero P407 (IVE/M), e sua atividade antileishmanial foi avaliada *in vitro* e *in vivo* em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania* (L.) *amazonensis*, importante espécie causadora de LT nas Américas. A anfotericina B (AmpB) foi utilizada como controle. Avaliações parasitológicas e imunológicas foram realizadas um e 30 dias após o tratamento. Resultados mostraram que o tratamento com IVE e, principalmente, IVE/M reduziu o diâmetro médio das lesões causadas por *L. amazonensis* e a carga parasitária na lesão, fígado, baço e linfonodos drenantes; quando comparados aos grupos controle. Tais animais desenvolveram uma resposta imune do tipo Th1 específica aos parasitos, com níveis elevados de IFN-gama, IL-12, GM-CSF e óxido nítrico, além de anticorpos IgG2a, associados a baixos níveis IL-4, IL-10 e anticorpos IgG1. Esses animais também apresentaram baixa toxicidade orgânica pela avaliação de marcadores de dano hepático e renal, quando comparado aos demais grupos. A IVE/M foi mais efetiva que a molécula livre na resposta terapêutica contra a infecção nos animais, em ambos os períodos de tempo avaliados após o tratamento. Desta forma, a composição micelar poderia ser considerada como candidata terapêutica contra a LT.

Palavras-chave: Ivermectina; Leishmaniose tegumentar; tratamento; reposicionamento de fármacos; toxicidade; anfotericina B.

ABSTRACT

Tegumentary leishmaniasis (TL) is a neglected parasitic disease complex that affects millions of people worldwide, mainly in tropical and subtropical regions. Treatment is associated with toxicity, parasite resistance and high cost; making urgent the development of more effective and safer therapies. Ivermectin (IVE) is an antiparasitic agent with an established safety profile in humans. The drug has immunomodulatory properties that may be advantageous in the context of leishmaniasis, since it is capable of stimulating the development of a Th1-type immune response. In this context, in the present study, IVE was used in free form or incorporated into a polymeric micelle system based on Poloxamer P407 (IVE/M), and its antileishmanial activity was *in vivo* evaluated in BALB/c mice infected with *Leishmania (L.) amazonensis*, an important parasite species that causes TL in the Americas. Amphotericin B (AmpB) was used as control. Parasitological and immunological evaluations were performed one and 30 days after treatment. Results showed that IVE and, mainly, IVE/M reduced the mean diameter of lesions caused by *L. amazonensis* and the parasite load in the infected tissue, liver, spleen and draining lymph nodes, when compared to the control groups. These animals developed a Th1-type response specific to the parasites, with high levels of IFN-gamma, IL-12, GM-CSF and nitrite, in addition to IgG2a antibodies, associated with low levels of IL-4, IL-10 and IgG1 antibodies. These animals presented also low organ toxicity by the evaluation of hepatic and renal damage markers, when compared to the other groups. IVE/M was more effective than the free IVE in the therapeutic response against infection in the animals, in both periods of time. In conclusion, the micellar composition could be considered a therapeutic candidate against TL.

Keywords: Ivermectin; Cutaneous leishmaniasis; treatment; drug repositioning; toxicity; amphotericin B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Cytokine response evaluated after treatments</i>	49
Figura 2. <i>IFN-γ mRNA expression in the parasite-stimulated spleen cell cultures...</i>	50
Figura 3. <i>Nitrite secretion investigated evaluated treatments.....</i>	51
Figura 4. <i>Antibody response measured after therapeutic regimens.....</i>	53
Figura 5. <i>Evaluation of parasitological response induced after the therapeutics.....</i>	54
Figura 6. <i>Organic toxicity measured after treatments</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Treatment of the infected macrophages</i>	46
Tabela 2. <i>Cytokine production after in vitro treatment of L. amazonensis-infected macrophages</i>	47
Tabela 3. <i>Cytokine production after in vitro treatment of L. donovani-infected macrophages</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AmpB	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
B/Mic	Branco da micela
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
dLN	Linfonodo drenante
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent</i>
FBS	Soro fetal bovino
IFN-γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IVE	Ivermectina
IVE/M	Ivermectina micelar
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutâneo-difusa
LM	Leishmaniose mucosa
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
mRNA	RNA mensageiro
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade ótica
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
p/p	peso/peso
qPCR	PCR quantitativo
ROS	Espécies reativas de oxigênio

RT-qPCR	PCR quantitativo em tempo real
SLA	Extrato proteico solúvel de <i>Leishmania</i>
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
Th1	T <i>helper</i> tipo 1
Th2	T <i>helper</i> tipo 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1. Epidemiologia das leishmanioses	17
2.2. Etiologia e ciclo biológico do parasito <i>Leishmania spp.</i>	17
2.3. Manifestações clínicas das leishmanioses	19
2.4. Imunologia das leishmanioses	20
2.5. Medidas de controle das leishmanioses	21
2.6. Tratamentos das leishmanioses	23
2.7. Sistemas de delivery	24
2.8. Ivermectina	25
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo geral	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
4. METODOLOGIA.....	28
4.1. Animais de experimentação e parasitos	28
4.2. Obtenção das moléculas	28
4.3. Desenvolvimento das formulações micelares	28
4.4. Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> contra a infecção experimental	29
4.5. Avaliação da carga parasitária	30
4.6. Parasitismo avaliado por qPCR.....	30
4.7. Expressão de mRNA de IFN- γ	31
4.8. Avaliação da resposta celular e humoral.....	32
4.9. Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i>	33
4.10. Análise estatística	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. Artigo: estudo envolvendo a Ivermectina contra <i>L. amazonensis</i>	34
6. CONCLUSÃO	67
7. PERSPECTIVAS	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	75
APÊNDICES	77
Artigos de primeira autoria	77
Demais trabalhos publicados durante o doutorado	79

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são um complexo de doenças tropicais causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania* consideradas negligenciadas, uma vez que ocorrem em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento e atingem populações mais vulneráveis e com difícil acesso aos serviços de saúde (PAHO, 2019; CROFT; COOMBS, 2003). Essas doenças são antroponozoonóticas e causam amplo espectro de manifestações clínicas no homem, que podem comprometer a pele, mucosas e vísceras, dependendo da espécie infectante, do tropismo do parasito e da imunidade do hospedeiro (OPAS, 2019).

Os parasitos são transmitidos aos mamíferos, incluindo humanos, através da picada de vetores fêmeas de flebotomíneos infectadas, que são pequenos dípteros da família *Psychodidae*, que se alimentam de sangue e são de grande importância na saúde pública devido ao seu papel como vetores da doença (OPAS, 2019). No Brasil, cerca de sete espécies do parasito podem causar a doença no homem, sendo que seis destas (*Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. lansoni*, *L. shawii* e *L. naiffi*) são responsáveis pelos casos de leishmaniose tegumentar (LT) e a espécie *L. infantum* é responsável pelos casos de LV (ALVAR *et al.*, 2012).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, existem três formas clínicas principais de leishmanioses: leishmaniose visceral (LV), que é a forma mais grave por ser fatal se aguda e não tratada; a leishmaniose cutânea (LC), que é a forma mais comum, geralmente, causando úlceras na pele; e a leishmaniose a mucosa (LM), que afeta boca, nariz e garganta (WHO, 2023).

Apesar da classificação, o Ministério da Saúde do Brasil considera válidas duas grandes classificações: LV e LT. Esta, por sua vez, pode apresentar diferentes sinais clínicos, incluindo lesões na pele e/ou mucosas. As lesões de pele podem ser únicas, múltiplas, disseminadas ou difusas. Elas apresentam aspecto de úlceras, com bordas elevadas e fundo granuloso, geralmente indolor (Ministério da Saúde, 2017).

Além da evolução clínica da doença ser influenciada pelas espécies patogênicas, ela pode também estar ligada ao estado imunológico do hospedeiro. Se o sistema imune for capaz de combater a infecção, o perfil de resistência à

reinfeção pode ser gerado e mantido ao longo da vida (SACKS *et al.*, 2002). No caso de falha da imunidade, a doença torna-se crônica, levando à progressão da infecção (CHEUKA *et al.*, 2017).

Medidas de controle são importantes para prevenir a infecção por *Leishmania*, como controle dos reservatórios e vetores da doença, a detecção precoce de cães e indivíduos infectados e o tratamento dos casos humanos (WHO, 2010). Em relação ao tratamento contra as leishmanioses, o mesmo deve ser realizado visando reduzir a morbidade provocada pelas lesões desfigurantes causadas na LT e evitar a mortalidade causada pela LV, sendo os antimoniais pentavalentes os medicamentos de primeira escolha (MINODIER; PAROLA, 2007; CROFT; COOMBS, 2003).

Há uma gama de medicamentos disponíveis para uso, mas algumas das limitações do uso de determinados fármacos incluem: resistência do paciente a medicamentos, efeitos adversos graves, duração prolongada do tratamento, perfis de toxicidade desfavoráveis e procedimentos complicados de administração do medicamento, além do custo elevado (CHEUKA *et al.*, 2017). Em consequência, é comum a descontinuidade do tratamento, o que pode levar a um aumento da resistência dos parasitos aos fármacos utilizados (VÉLEZ *et al.*, 2009).

As formulações lipídicas apresentam vantagens em relação à formulação convencional, incluindo maior concentração nos órgãos primários, tais como baço, fígado e pulmões; menor concentração nos rins, com marcante redução da nefrotoxicidade, além de diminuição dos efeitos adversos relacionados à infusão (VYAS *et al.*, 2006). Apesar da melhoria do índice terapêutico para as formulações lipídicas, a sua utilização permanece limitada, principalmente, pelo alto custo dos produtos (EGGER *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2014).

Como visto, apesar da gravidade da doença, os tratamentos disponíveis para as leishmanioses ainda apresentam limitações significativas, havendo uma necessidade urgente de desenvolvimento de novas terapias ou reposicionamento de fármacos já conhecidos. O reposicionamento de fármacos, ou seja, a reutilização de medicamentos já aprovados para outras indicações, tem ganhado relevância na pesquisa de leishmanioses por seu potencial de acelerar o processo de desenvolvimento de novos tratamentos.

Nesse contexto, a IVE, um agente antiparasitário utilizado no tratamento de doenças como oncocercose e filariose, tem surgido como uma alternativa

promissora no combate às leishmanioses. A IVE possui um perfil de segurança bem estabelecido em humanos e demonstrou potencial imunomodulador, o que pode ser benéfico no tratamento das leishmanioses ao induzir uma resposta imune protetora do tipo Th1 (CRUMP & ÔMURA, 2011).

O potencial uso da IVE no tratamento das leishmanioses é relevante porque pode oferecer uma opção terapêutica de baixo custo e acessível, especialmente em regiões endêmicas de baixa renda. Estudos iniciais do nosso grupo de pesquisa indicaram que a IVE, quando utilizada em modelo murino de LV, foi eficaz em reduzir a carga parasitária e promover uma resposta imune adequada (REIS *et al.*, 2020). Além disso, a possibilidade de incorporar a IVE em sistemas de *delivery*, como micelas poliméricas, pode melhorar sua biodisponibilidade e reduzir seus efeitos adversos, aumentando assim a sua eficácia terapêutica (VYAS & GUPTA, 2006).

Portanto, a avaliação do reposicionamento da IVE para o tratamento das leishmanioses, incluindo a LT, proposta neste estudo, tem o potencial de oferecer uma alternativa mais segura e acessível aos tratamentos atuais. Além disso, a combinação de IVE com tecnologias avançadas de liberação de fármacos pode representar um avanço significativo no tratamento dessa doença, reduzindo a morbimortalidade associada e melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças tropicais negligenciadas causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, que ocorrem em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento e atingem populações vulneráveis e com difícil acesso aos serviços de saúde (PAHO, 2019; CROFT; COOMBS, 2003). A doença afeta principalmente populações na África, Ásia e América Latina, e está associada à desnutrição, deslocamento populacional, moradia precária, sistema imunológico fraco e falta de recursos. Dos 200 países e territórios que reportaram à OMS, 99 países e territórios são endêmicos para leishmaniose em 2022. Isso inclui 71 países que são endêmicos para VL e CL, 9 países que são endêmicos apenas para VL e 19 países que são endêmicos apenas para CL (WHO, 2022).

Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para as leishmanioses e estão sob risco de infecção. Estima-se que 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de novos casos de LT ocorram anualmente (OPAS, 2021). Ainda de acordo com o relatório da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), no ano de 2020, foram registrados 39.705 de casos de LT, podendo este número ser subestimado uma vez que houve interrupção total ou parcial das atividades de vigilância e assistência decorrência da pandemia causada pela Covid-19 em algumas regiões, sendo o Brasil responsável por cerca de 41% dos casos de LT nas Américas (OPAS, 2021).

2.2. Etiologia e ciclo biológico do parasito *Leishmania*

A etiologia das leishmanioses está relacionada à infecção por protozoários do gênero *Leishmania*, que pertencem à família *Trypanosomatidae*. Existem mais de 20 espécies de *Leishmania* capazes de infectar humanos, sendo que as principais espécies patogênicas incluem *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* (sinônimo de *L. chagasi* na América Latina), *Leishmania major*, *Leishmania tropica* e *L. braziliensis* (Murray et al., 2005).

Durante seu ciclo biológico, o parasito é encontrado em duas formas ou estágios: promastigota, extracelular, que apresenta morfologia alongada e possui um flagelo que permite a mobilidade no intestino do inseto vetor; e a forma amastigota, que possui flagelo rudimentar, morfologia arredondada, é intracelular obrigatória e se multiplica nas células do sistema fagocítico-mononuclear do hospedeiro mamífero. Ambas as formas do parasito se reproduzem por divisão binária e possuem uma única mitocôndria modificada, conhecida como cinetoplasto (DEBRAY *et al.*, 2015).

O ciclo biológico de *Leishmania* é complexo e envolve dois hospedeiros principais: o flebotomíneo (vetor invertebrado) e o hospedeiro vertebrado, que pode ser humano ou outros mamíferos, como cães e roedores. No vetor, o ciclo inicia-se quando o flebotomíneo fêmea realiza o repasto sanguíneo e se alimenta do sangue de um hospedeiro infectado, ingerindo formas amastigotas de *Leishmania*, que estão livres no sangue ou presentes nas células fagocíticas do hospedeiro. No intestino do inseto, essas amastigotas se transformam em formas promastigotas (KILLICK-KENDRICK, 1999). As promastigotas se multiplicam ativamente no trato digestivo do flebotomíneo e migram para a probóscide (parte bucal) do inseto, onde ficam prontas para serem inoculadas no próximo hospedeiro vertebrado durante a alimentação.

No hospedeiro vertebrado, o ciclo biológico continua quando o flebotomíneo infectado realiza o repasto sanguíneo e inocula as formas promastigotas metacíclicas no local da picada. Essas promastigotas são rapidamente fagocitadas por macrófagos, células dendríticas e outras células do sistema imune inato. Dentro dos macrófagos, no interior de fagolisossomos, as promastigotas se transformam nas formas amastigotas e se multiplicam (HANDMAN, 2001). As amastigotas se replicam no interior dos macrófagos, ocasionando o rompimento dessas células e, posteriormente infectando novas células fagocíticas, o que dará continuidade à infecção e ao desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero. Este ciclo intracelular é o principal responsável pelos sintomas clínicos da doença, uma vez que a replicação descontrolada do parasito dentro dos macrófagos leva a uma resposta inflamatória e imunológica inadequada, causando os danos teciduais característicos das leishmanioses (DEBRAY *et al.*, 2015).

A capacidade do parasito sobreviver e se replicar dentro dos macrófagos está diretamente relacionada à sua habilidade de evadir o sistema imunológico do hospedeiro. O parasito inibe a capacidade dos macrófagos de apresentar antígenos e de ativar uma resposta imune eficiente, permitindo sua proliferação contínua (ALEXANDER *et al.*, 1999). Além disso, a infecção por *Leishmania* modula a produção de citocinas, favorecendo uma resposta imune do tipo Th2 em alguns casos, o que suprime a ativação adequada de células T e promove a sobrevivência do parasito (NYLEN & SACKS, 2007). Essa característica de evasão imunológica contribui para a cronicidade da infecção e a dificuldade em erradicar o parasito, mesmo após o tratamento, tornando o ciclo biológico da *Leishmania* um alvo importante para o desenvolvimento de novas terapias.

2.3. Manifestações clínicas das leishmanioses

As manifestações clínicas das leishmanioses variam de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida e a resposta imunológica do hospedeiro, resultando em diferentes formas clínicas, cada uma com características clínicas específicas que impactam significativamente a qualidade de vida e o prognóstico dos pacientes (WHO, 2023).

A LV, também conhecida como calazar, é a forma mais grave da doença e, afeta órgãos internos, como o fígado, baço e a medula óssea, e apresenta sintomas inespecíficos como febre prolongada, perda de peso, anemia, hepatomegalia e esplenomegalia (ALVAR *et al.*, 2012). Se não tratada, a LV pode ser fatal em mais de 90% dos casos. A gravidade da leishmaniose visceral está diretamente relacionada à resposta imunológica inadequada do hospedeiro, que permite a proliferação descontrolada dos parasitos nos órgãos internos, levando à falência orgânica progressiva.

A LC é a forma mais comum da doença e é geralmente caracterizada pela presença de lesões ulcerativas na pele. As lesões começam como pápulas eritematosas que evoluem para úlceras indolores com bordas elevadas. Essas lesões podem se resolver espontaneamente ao longo de meses ou persistir por períodos prolongados, deixando cicatrizes desfigurantes (REITHINGER *et al.*, 2007).

Em áreas endêmicas, a LC está frequentemente associada a fatores ambientais e ocupacionais, afetando populações vulneráveis e economicamente desfavorecidas.

A LM é uma forma mais grave e invasiva da doença, ocorrendo principalmente em infecções causadas por *Leishmania braziliensis*. Esta forma da doença começa com lesões cutâneas semelhantes às da LC, mas, em uma pequena porcentagem dos casos, a infecção progride para o envolvimento das mucosas, especialmente do nariz, boca e garganta. As lesões mucosas podem causar deformidades graves, destruição dos tecidos faciais e dificuldades respiratórias, o que impacta diretamente a qualidade de vida e a capacidade de socialização dos pacientes (LESSA *et al.*, 2007). O tratamento da LM é complexo e prolongado, com altas taxas de recaída.

Portanto, as manifestações clínicas das leishmanioses variam amplamente, desde lesões cutâneas autolimitadas até formas sistêmicas potencialmente letais. O conhecimento detalhado dessas manifestações é crucial para o diagnóstico e manejo adequado da doença. A classificação correta da forma clínica da leishmaniose permite intervenções terapêuticas mais precisas e aumenta as chances de sucesso no tratamento. Contudo, a identificação precoce e o tratamento eficaz ainda são desafios, especialmente em regiões endêmicas com recursos limitados, o que reforça a necessidade contínua de pesquisas para melhorar as abordagens diagnósticas e terapêuticas.

2.4. Imunologia das leishmanioses

A resposta imunológica nas leishmanioses é um fator determinante para o curso da infecção e as manifestações clínicas da doença. Os parasitos intracelulares do gênero *Leishmania* infectam principalmente macrófagos e outras células fagocíticas, sendo essa interação complexa entre o sistema imunológico do hospedeiro e o parasito, envolvendo múltiplos mecanismos celulares e moleculares que podem resultar em diferentes desfechos clínicos, desde infecções assintomáticas até formas graves da doença (MURRAY *et al.*, 2005).

A resposta imune inicial à infecção por *Leishmania* é mediada principalmente pela imunidade inata, que é responsável pelo reconhecimento do parasito e ativação das células fagocíticas, como macrófagos e células dendríticas. Estas células

reconhecem componentes da parede celular do parasito através de receptores de padrão de reconhecimento (PRRs), como os Toll-like receptors (TLRs), e iniciam a produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-12 (Liese et al., 2008). A IL-12, por sua vez, é crucial para a diferenciação de células T auxiliares (Th) em células Th1, que são fundamentais para a eliminação do parasito, uma vez que estimulam a produção de interferon-gama (IFN- γ), que ativa os macrófagos a matarem os parasitos intracelulares (RODRIGUES *et al.*, 2016).

A ativação de uma resposta imune do tipo Th1 é essencial para a resistência à infecção por *Leishmania*, pois o IFN- γ induz a produção de óxido nítrico (NO) nos macrófagos, o qual é letal para os parasitos (MOUGNEAU *et al.*, 2011). Entretanto, a resposta imunológica pode variar dependendo da espécie de *Leishmania* e da suscetibilidade genética do hospedeiro. Enquanto uma resposta do tipo Th1 está associada à proteção e ao controle da infecção, uma resposta do tipo Th2, caracterizada pela produção de citocinas como IL-4 e IL-10, favorece a sobrevivência do parasito ao inibir a ativação adequada dos macrófagos. Isso ocorre porque a IL-10, em particular, tem um papel imunossupressor, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e inibindo a ação do IFN- γ nos macrófagos infectados (GOMES *et al.*, 2014).

A compreensão detalhada da imunologia das leishmanioses é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e vacinas. O controle da infecção depende de uma resposta imune balanceada, capaz de eliminar o parasito sem causar danos excessivos ao tecido hospedeiro. Estratégias imunomoduladoras que possam promover a resposta Th1 e suprimir a ação de citocinas imunossupressoras como a IL-10 são áreas promissoras de pesquisa no tratamento da doença. A importância desse paradigma Th1/Th2 na patogênese das leishmanioses tem sido uma área de intensa investigação (VON STEBUT; UDEY, 2004).

2.5. Medidas de controle das leishmanioses

As leishmanioses representam um grande desafio de saúde pública, exigindo uma abordagem de controle que vá além do manejo de vetores e da melhoria das condições ambientais, contemplando também o desenvolvimento de novos

tratamentos mais eficazes. Embora as medidas de controle, como o uso de inseticidas, mosquiteiros e manejo ambiental, busquem interromper o ciclo biológico do parasito, essas estratégias enfrentam desafios devido ao caráter zoonótico da doença e à manutenção do ciclo silvestre do *Leishmania* (BARBIÉRI, 2006). Tornando essencial o desenvolvimento de tratamentos inovadores que possam combater a doença de maneira mais direta e efetiva.

Atualmente, o controle vetorial é uma das principais formas de prevenção da transmissão, mas enfrenta limitações. Métodos como a aplicação de inseticidas e o uso de repelentes são importantes, porém insuficientes para conter a doença de forma abrangente. A identificação e o tratamento ou eutanásia de reservatórios animais, como cães, ainda são as medidas adotadas, mas não apresentam resultados satisfatórios na redução dos casos de leishmaniose e levantam questões éticas e ecológicas (GRAMICCIA & GRADONI, 2005).

Outro aspecto crítico no combate à leishmaniose é o diagnóstico precoce, que pode evitar complicações graves e facilitar o acesso a terapias mais eficazes e menos invasivas. Métodos diagnósticos mais precisos, que utilizam técnicas moleculares e imunológicas, estão em desenvolvimento e têm o potencial de transformar a forma como a doença é gerenciada, promovendo intervenções mais rápidas e eficazes (REITHIGER & DUJARDIN, 2017). Ferramentas avançadas de diagnóstico também são essenciais para monitorar a eficácia dos tratamentos e ajudar na identificação de novas cepas resistentes aos fármacos.

No contexto do desenvolvimento de novas terapias, a pesquisa para vacinas contra a leishmaniose tem mostrado avanços promissores, embora ainda não existam vacinas amplamente disponíveis para humanos. A vacinação de animais reservatórios, como cães, é uma estratégia em investigação para reduzir a transmissão zoonótica (KHAMESIPOUR *et al.*, 2006). No entanto, além das vacinas, é crucial o desenvolvimento de novos medicamentos ou a reformulação de tratamentos existentes para torná-los mais acessíveis, seguros e eficientes, principalmente em regiões endêmicas e de difícil acesso.

Portanto, para um controle efetivo das leishmanioses, é fundamental continuar investindo em pesquisas que aprimorem os tratamentos disponíveis, desenvolvam vacinas e testes diagnósticos mais precisos. O estabelecimento de novas estratégias terapêuticas e preventivas pode, a longo prazo, reduzir

significativamente a morbi-mortalidade associada à doença, melhorando os desfechos clínicos e contribuindo para a diminuição da carga da leishmaniose no mundo, sendo urgente a busca por novos fármacos que não apenas ofereçam maior eficácia, mas que também diminuam a toxicidade e os efeitos adversos associados aos tratamentos atuais.

2.6. Tratamento das leishmanioses

Atualmente, os fármacos mais utilizados no tratamento das leishmanioses incluem os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B (em suas várias formulações), a miltefosina e a paramomicina (ALVAR *et al.*, 2012).

Os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, são os medicamentos de primeira escolha em muitas regiões, inclusive no Brasil. Eles têm sido amplamente usados por décadas, mas estão associados a graves efeitos colaterais, incluindo toxicidade cardíaca, hepática e renal, o que muitas vezes limita sua aplicação, especialmente em pacientes com comorbidades (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012). Além disso, a administração intravenosa prolongada desses medicamentos é um desafio logístico em áreas endêmicas de difícil acesso.

A anfotericina B, em suas formas convencionais e lipossomais, é outro medicamento amplamente utilizado, especialmente para a LV. Sua formulação lipossomal (Ambisome®) apresenta uma toxicidade significativamente menor em comparação à anfotericina B convencional, mas o custo elevado dessa formulação dificulta seu uso em larga escala em regiões endêmicas (MURRAY *et al.*, 2005). A anfotericina B convencional, apesar de ser mais acessível, também apresenta efeitos adversos graves, como nefrotoxicidade, febre e calafrios, o que pode comprometer a adesão ao tratamento.

A miltefosina é o único medicamento disponível para o tratamento oral da leishmaniose visceral, o que a torna uma opção terapêutica atrativa em áreas remotas. No entanto, a droga tem sido associada a efeitos colaterais gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreia, além de ser contraindicada para gestantes devido ao seu efeito teratogênico (SUNDAR & CHAKRAVARTY, 2013). Além disso, o surgimento de cepas de *Leishmania* resistentes à miltefosina em algumas regiões tem comprometido sua eficácia a longo prazo (RIJAL *et al.*, 2013).

A paramomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, é uma opção terapêutica complementar, muitas vezes usada em combinação com outros fármacos, mas seu uso prolongado pode causar ototoxicidade e nefrotoxicidade (MURRAY *et al.*, 2005).

Como o tratamento apresenta várias limitações, é necessário o desenvolvimento de novos medicamentos que possam substituir ou complementar as alternativas terapêuticas atualmente disponíveis (TIUMAN *et al.*, 2011). No entanto, a descoberta e o desenvolvimento de medicamentos para doenças negligenciadas enfrentam uma série de desafios. Um ponto importante é que o investimento nessas áreas terapêuticas por grandes empresas farmacêuticas não é financeiramente atraente devido à perspectiva de baixos retornos financeiros (CHEUKA *et al.*, 2017). O que aumenta a necessidade de estímulos a estudos em universidades e instituições públicas que visem o desenvolvimento de novos fármacos.

Portanto, diante de toda a problemática em torno dos fármacos disponíveis no mercado para o tratamento desse complexo de doenças, a estratégia conhecida como reposicionamento de fármacos pode representar uma forma de desenvolvimento mais barato e rápido de novos tratamentos. O reposicionamento de fármacos consiste em averiguar e comprovar a possibilidade de novas indicações para medicamentos já existentes, disponíveis no mercado, mas que tenham indicação para outras doenças e/ou alvos terapêuticos (ASHBURN; THOR, 2004).

Essa estratégia tornou-se interessante nos últimos anos devido ao fato de ser eficiente, mais econômico e sem grandes riscos, oferecendo oportunidade para muitos países desenvolverem fármacos com menores custos (XUE *et al.*, 2018). Recentemente, registrou-se um interesse considerável no reposicionamento de medicamentos para doenças tropicais negligenciadas, já havendo alguns exemplos aplicados no tratamento contra as leishmanioses, como a AmpB (antifúngico), a miltefosina (anticâncer) e a paramomicina (antibacteriano) (CHÁVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2019).

2.7. Sistemas de delivery: Polôxamero P407

Em paralelo ao reposicionamento de fármacos, a veiculação de tais produtos em carreadores capazes de prolongar sua estabilidade promoverem sua liberação controlada e gradual e aumentarem sua biodisponibilidade, têm-se tornado também

importante objeto de estudo (VYAS *et al.*, 2006). Nos últimos anos, um dos focos de pesquisa tem sido associar o reposicionamento farmacológico a sistemas de *delivery* para reduzir a toxicidade e aumentar a efetividade dos mesmos, mas sem perda de ação biológica (RIBEIRO *et al.*, 2014; DUARTE *et al.*, 2016; MENDONÇA *et al.*, 2016).

Nesse sentido, sistemas micelares à base de Polôxamero 407 (P407) têm sido usados na veiculação de diferentes produtos (CABANA *et al.*, 1997; PISAL *et al.*, 2004; MENDONÇA *et al.*, 2016). Ao contrário das formulações disponíveis no mercado, que são baseadas em lipídeos, o P407 é um agente formador de micelas que permite a liberação gradual de produtos a ele agregados. É formado por óxido de etileno (OE) nas extremidades e óxido de propileno (OP) na parte central da molécula (OE95-105–OP54-60–OE95-105), sendo comercializado sob os nomes Pluronic® F-127, Lutrol® F127, Synperonic™ PE/F127, Tetronic® 908, dentre outros.

Já foi demonstrado que micelas contendo AmpB à base de P407 são eficazes em potencializar a sua ação para o tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* (MARTINS *et al.*, 2016; MENDONÇA *et al.*, 2016; TAVARES *et al.*, 2019; MENDONÇA *et al.*, 2019). Portanto, a associação de sistemas de administração de medicamentos para o tratamento das leishmanioses é relevante, sendo micelas compostas por P407, uma opção promissora (RIBEIRO *et al.*, 2014).

2.8. Ivermectina

Diante das limitações citadas, é essencial identificar novas moléculas ou produtos que sejam eficazes contra o parasito em mamíferos, apresentem baixa toxicidade, sejam acessíveis economicamente e possam ser administrados de forma menos invasiva. Os desafios das terapias atuais para as leishmanioses justificam a intensificação de pesquisas em novas opções terapêuticas, incluindo o desenvolvimento de formulações mais seguras e o reposicionamento de fármacos usados em outras doenças, além de novas combinações de protocolos terapêuticos.

Neste contexto, a Ivermectina (IVE), objeto de estudo desta tese, é um agente antiparasitário de amplo espectro que vem sendo usado em tratamentos veterinário e humano (CRUMP, 2017). Desde sua descoberta, seus benefícios em termos de Saúde Pública e bem-estar socioeconômico são numerosos e continuam a se acumular (ÔMURA, 2016). A IVE tem sido usada para o tratamento da filariose

linfática (OTTESEN *et al.*, 2008; WOLSTENHOLME *et al.*, 2016; YATES; WOLSTENHOLME, 2004), oncocercose (NANA-DJEUNGA *et al.*, 2014; OTTESEN, 2006; TRAORE *et al.*, 2012), estrogiloidíase (SALLUH *et al.*, 2005; SATOU *et al.*, 2001; TARR *et al.*, 2003), triquinelose (também chamada triquinose) (SHOHEIB *et al.*, 2013; SOLIMAN; TAHER; MAHMOUD, 2011), infestação de ectoparasitas, como pediculose (FOUCAULF *et al.*, 2006; NOFAL, 2010; PARISER; MEINKING; RYAN, 2013; STRYCHARZ *et al.*, 2011), sarna (HUFFAM; CURRIE, 1998; NOFAL, 2009) e miíase (OSORIO *et al.*, 2006; PANDEY *et al.*, 2016; SHINOHARA *et al.*, 2004), sendo que poucos eventos adversos foram relatados em humanos (CRUMP; OMURA, 2011). Estudos têm mostrado a ação da IVE sobre a resposta imune dos hospedeiros mamíferos, podendo ser considerada imunoestimuladora em doses terapêuticas (LÓPEZ-OLVERA *et al.*, 2006; SAJID *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrada a atividade antileishmanial da IVE por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo* em camundongos BALB/c para o tratamento contra a LV utilizando a infecção experimental por *L. infantum* (REIS *et al.*, 2020).

Nesse contexto e diante das dificuldades inerentes ao tratamento da LT, o propósito deste trabalho foi avaliar a atividade *in vivo* da IVE no tratamento da LT causada em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, sendo a mesma incorporada ou não em micelas poliméricas de Poloxâmero P407 para o tratamento contra a doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antileishmanial da Ivermectina (IVE) nas suas formas livre e associada a sistema de *delivery* no tratamento de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver formulações micelares incorporando a IVE.
- Avaliar o uso da Ivermectina micelar (IVE/M) e na forma livre no tratamento da infecção experimental em camundongos BALB/c causada pela espécie *L. amazonensis*.
- Quantificar a carga parasitária na lesão, no baço, no fígado e nos linfonodos drenantes dos animais infectados e tratados.
- Avaliar a resposta imune celular pela produção das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12 e GM-CSF, além de avaliar a produção de óxido nítrico.
- Avaliar a resposta imune humoral pela determinação dos níveis de IgG1 e IgG2a específicos aos parasitos após o protocolo de tratamento.
- Analisar a toxicidade orgânica induzida pelo fármaco por meio da avaliação de níveis de enzimas hepáticas e renais nos soros dos animais.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais de experimentação e parasitos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMG (protocolo 056/2022). Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, de 8 semanas de idade, adquiridos junto ao Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia Clínica do COLTEC, sob as devidas condições de manejo. A cepa IFLA/BR/1967/PH-8 de *L. amazonensis* foi utilizada. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider's completo (Sigma-Aldrich, EUA), composto por meio acrescido de 20% de soro fetal bovino inativado (FBS; Sigma-Aldrich, EUA) e L-glutamina 20 mM (m.mol/L), penicilina 200 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e gentamicina 50 µg/mL pH 7,4, a 24°C, de acordo com protocolo previamente descrito (COELHO *et al.*, 2003).

4.2. Obtenção dos produtos

IVE (C25H43NO18) e Poloxâmero P407 (Pluronic® F127) foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich (números de catálogo 70288-86-7 e 16758, respectivamente; St. Louis, EUA), bem como a Anfotericina B (AmpB) (1397-89-3) que foi utilizada como controle.

4.3. Desenvolvimento das formulações micelares

O processo para a obtenção do sistema micelar foi desenvolvido conforme descrito previamente (BARICHELO *et al.*, 1999), compreendendo as seguintes etapas:

- a) adicionar o P407, para uma concentração final de 18% m/m, a uma solução tampão pH 7,4, adicionando 1mL de metanol PA, sob agitação e em banho de gelo até dissolução completa do P407 e homogeneização da solução;
- b) manter a solução a 4°C por um período de 12 a 24 horas;
- c) solubilizar a molécula de interesse (1 mg/mL) a ser incorporada nas

micelas usando diclorometano PA;

- d) adicionar essa solução diluída àquela preparada na etapa “b” e manter sob agitação moderada até a formação de um gel límpido e em temperatura entre 4 a 8°C;
- e) eliminar o solvente orgânico da mistura preparada na etapa “d” por evaporação rotatória sob vácuo sendo obtida a composição IVE/M como um gel transparente.
- f) filtrar as micelas em membrana filtrante de 0,45 µm e mantidas a 4°C, até o uso.

Micelas vazias (B/mic) (18% m/m) foram preparadas usando o mesmo protocolo descrito para a preparação de IVE/M, mas sem a adição de IVE.

4.4. Avaliação da eficácia *in vivo* contra a infecção experimental

Camundongos BALB/c foram infectados pela via subcutânea no dorso com 10^7 formas promastigotas estacionárias de *L. amazonensis*. Após o desenvolvimento da lesão (cerca de 50 a 60 dias), o tratamento foi iniciado. Os animais receberam o tratamento uma vez ao dia a cada 2 dias, durante 10 dias, recebendo injeções subcutâneas na base da cauda divididos nos seguintes grupos:

- A) Grupo salina - 50 µL de PBS.
- B) Grupo branco micelar (B/Mic) – 50 µL de micelas vazias (10 mg/kg de peso corporal).
- C) Grupo controle de tratamento (anfotericina B) – 50 µL de AmpB (2 mg/ kg de peso corporal).
- D) Grupo Ivermectina – 50 µL de IVE (5 mg/kg de peso corporal).
- E) Grupo Ivermectina micelar (IVE/Mic) – 50 µL de micelas contendo IVE (5 mg/kg de peso corporal).

O desenvolvimento de nódulos, metástases e outros sinais clínicos foram acompanhados durante e após o tratamento. O diâmetro médio da lesão foi monitorado semanalmente com paquímetro eletrônico (modelo 799-6/150, Starrett®, Brasil). Os animais foram eutanasiados um e trinta dias após o fim do tratamento.

4.5. Avaliação da carga parasitária

O parasitismo de órgãos foi avaliado no sítio de infecção (tecido infectado), baço, fígado e linfonodos drenantes de animais infectados e tratados, um e 30 dias após o tratamento (n=8 por grupo em cada etapa), utilizando uma técnica de diluição limitante (MARTINS *et al.*, 2013). Para isso, tecidos e órgãos foram coletados, pesados e homogeneizados em um triturador de tecidos de vidro em PBS estéril. Detritos de tecidos foram removidos por centrifugação a $150 \times g$ e as células foram concentradas por centrifugação a $2.000 \times g$. O pellet foi ressuspensão em 1 mL de meio de Schneider completo quando 20 μ L da ressuspensão foram plaqueados em placas de microtitulação de fundo plano de 96 poços (Nunc). As diluições foram realizadas de forma seriada em meio Schneider completo começando de 10^{-1} até 10^{-12} . As ponteiros foram descartadas após cada diluição para evitar o transporte de parasitos aderidos de um poço para outro. Cada amostra foi plaqueada em triplicata e incubada a 24°C, sendo analisadas 7 dias após o início da cultura. Os resultados foram expressos como o log negativo do título, ou seja, a diluição correspondente ao último poço positivo, que foi ajustado por miligrama de tecido ou órgão.

4.6. Parasitismo avaliado por qPCR

O parasitismo no baço dos animais foi também avaliado pela técnica de PCR quantitativo (qPCR), conforme descrito (DUARTE *et al.*, 2016), 30 dias após o fim do tratamento. Resumidamente, o DNA do baço foi extraído usando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corporation) e ressuspensão em 100 μ L água milli-Q. A carga parasitária foi estimada utilizando os primers para amplificar o kDNA de *L. amazonensis*: Forward (CCTATTTTACACCAACCCCCAGT) e Reverse (GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA). O gene da β -actina de camundongo (Forward: CAGAGCAAGAGAGGTATCC; Reverse: TCATTGTAGAAGGTGTGGTGC) foi usado como controle. Curvas-padrão foram obtidas a partir de DNA extraído de 10^8 parasitos para kDNA e 10^8 macrófagos peritoneais para β -actina, nas mesmas condições utilizadas para extrair as amostras do presente estudo. A PCR foi realizada no StepOne™ (placa de 48 poços; Life Technologies) usando 2x SYBR® Green PCR master mix (5 μ L, Applied Biosystems) com 2 mM de cada iniciador (1

μL) e 4 μL de DNA (5 ng/μL). As amostras foram incubadas a 95°C por 10 minutos e submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os resultados foram convertidos em número de parasitos por célula nucleada (multiplicados por 1.000 para facilitar a visualização).

4.7. Expressão de mRNA de IFN- γ

Um ensaio de RT-qPCR foi realizado para avaliar a expressão de mRNA de IFN- γ no baço dos animais infectados e tratados 30 dias após o tratamento. Para isso, o RNA foi extraído dos baços dos animais (n=8 por grupo) utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi ressuspensão em água destilada UltraPure™ livre de DNase/RNase (Invitrogen, EUA) e sua concentração foi medida em um espectrofotômetro NanoDrop LITE (Thermo Scientific, EUA), com razões de absorbância de 260/280 nm. A qualidade da amostra foi avaliada em gel de eletroforese de agarose (1,5% p/v). O RNA extraído foi tratado por 15 min em temperatura ambiente com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), quando a enzima foi desativada usando EDTA 25 mM por 10 min a 65°C. O RNA total (2 μg) foi transcrito reversamente usando um kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade da *Applied Biosystems* (Thermo Scientific, EUA), DNA complementar (cDNA) pelos seguintes parâmetros: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min. O ensaio de RT-qPCR foi realizado em um Thermocycler 7900HT (Applied Biosystems) usando um master mix PowerUp™ SYBRTM Green PCR da Applied Biosystems (Thermo Scientific, EUA) e primers específicos para IFN- γ : Forward 5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3' e 5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3' reverso. As transcrições foram normalizadas empregando os genes controle β - actina e GAPDH. O procedimento foi otimizado ajustando as concentrações do primer para 5, 10 e 15 pmol para obter a melhor eficiência. A pureza do produto foi avaliada por meio de curvas de fusão e eletroforese em gel. Os seguintes parâmetros foram empregados: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto, seguido de um estágio de dissociação para registro da curva de fusão. Os resultados foram mostrados graficamente como alterações na expressão do gene usando a média $\pm$ desvio padrão de um gene alvo.

Os dados foram analisados de acordo com a expressão relativa usando o método 2- $\Delta\Delta CT$.

4.8. Avaliação da resposta celular e humoral

Para avaliar a resposta celular desenvolvida no final do tratamento, culturas de esplenócitos e ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a dosagem de citocinas, foram realizados como descrito previamente (MARTINS *et al.*, 2015). Para isto, suspensões de células esplênicas (5×10^6 células por poço) foram plaqueadas em duplicata em placas de 24 poços (Nunc) e incubadas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich) suplementado com soro fetal bovino a 20% e L-glutamina 20 μM , pH 7,4. As células foram estimuladas com SLA de *L. amazonensis* (25 $\mu g / mL$) ou não estimuladas (meio), durante 48 h a 37°C e 5% de CO₂. Os níveis de IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12 e GM-CSF foram avaliados nos sobrenadantes das culturas pela metodologia ELISA de captura usando kits comerciais (BD Pharmingen[®], San Diego, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A produção de nitrito, como indicador de óxido nítrico, também foi avaliada usando os sobrenadantes celulares, por meio do método de Griess (GREEN *et al.*, 1982).

Para a avaliação da resposta imune humoral os níveis de anticorpos do isotipo IgG1 ou IgG2a específicos contra o parasito foram dosados pela técnica de ELISA direta, como descrito previamente (COELHO *et al.*, 2003). Resumidamente, após uma titulação, utilizou-se SLA de *L. amazonensis* a uma concentração de 1,0 μg por poço, como antígeno de sensibilização, incubado por 16 horas a 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com solução PBS-T (PBS 1x mais 0,05% Tween 20), e sem seguida bloqueadas com solução de caseína 2% (diluída em PBS 1x) por uma hora a 37°C. Após o bloqueio, as placas foram novamente lavadas 3 vezes com PBS-T e as amostras de soro foram diluídas a 1:100 em tampão PBS-T e incubadas por 1h a 37°C. As placas foram mais uma vez lavadas 3 vezes com PBS-T e os anticorpos anti-mouse IgG1 e IgG2a marcados com peroxidase (Sigma-Aldrich) utilizados numa diluição de 1: 10.000 (diluídos em PBS-T) foram adicionados nas placas e incubados por 1 hora a 37°C. Após o fim da incubação com os anticorpos, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e as reações colorimétricas foram desenvolvidas por

incubação com uma solução composta por 2 µL de H₂O₂, 2 mg de orto-fenilenodiamina e 10 mL de tampão citrato-fosfato a pH 5,0, durante 30 min no escuro na temperatura ambiente, e foram paradas pela adição de 20 µL de H₂SO₄ 4 mol/L. A densidade óptica foi determinada utilizando-se um espectrofotômetro (*Molecular Devices, Spectra Max Plus*, Canadá), a 492 nm.

4.9. Avaliação da toxicidade *in vivo*

Foram colhidas amostras de soro dos animais infectados e tratados para realização de dosagens bioquímicas. Utilizou-se amostras de camundongos *naive* (não tratados e não infectados) como controle. A função hepática foi analisada por dosagem de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), enquanto que a nefrotoxicidade foi avaliada através do exame dos níveis dos marcadores ureia e creatinina. As análises bioquímicas foram desenvolvidas por meio de kits comerciais (Labtest Diagnostica®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e um aparelho auto-analisador (analisador Thermo Plate TP), de acordo com as instruções do fabricante.

4.10. Análise estatística

Os resultados foram inseridos em planilhas do Microsoft Excel (versão 10.0, Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) e analisados pelo GraphPad Prism, versão 9.4.1 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Para a análise dos dados obtidos das medidas das lesões no dorso, o grupo IVE/Micelar foi selecionado como controle para evitar acúmulo de erros em testes de comparação múltipla. Nesse contexto, foi utilizado o teste two-way ANOVA, enquanto para as demais análises foi empregado o teste one-way ANOVA seguido do teste múltiplo de Dunnett. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tópico de Resultados e Discussão desta tese será apresentado sob a forma de artigo científico, conforme as normas gerais do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, segundo a resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013.

Artigo: estudo envolvendo a Ivermectina contra *L. amazonensis*

O artigo foi publicado no periódico *Cytokine*: “Freitas CS, Lage DP, Machado AS, Vale DL, Martins VT, Cardoso JMO, Oliveira-da-Silva JA, Reis TAR, Tavares GSV, Ramos FF, Ludolf F, Pereira IAG, Bandeira RS, Fujiwara RT, Bueno LL, Roatt BM, Chávez-Fumagalli MA, Coelho EAF. Exploring drug repositioning for leishmaniasis treatment: Ivermectin plus polymeric micelles induce immunological response and protection against tegumentary leishmaniasis. *Cytokine*. 2023 Apr;164:156143. doi: 10.1016/j.cyto.2023.156143. Epub 2023 Feb 10.”

Cytokine 164 (2023) 156143



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytokine



Exploring drug repositioning for leishmaniasis treatment: Ivermectin plus polymeric micelles induce immunological response and protection against tegumentary leishmaniasis



Camila S. Freitas^a, Daniela P. Lage^a, Amanda S. Machado^a, Danniele L. Vale^a, Vivian T. Martins^a, Jamille M.O. Cardoso^b, João A. Oliveira-da-Silva^a, Thiago A.R. Reis^a, Grasielle S.V. Tavares^a, Fernanda F. Ramos^a, Fernanda Ludolf^a, Isabela A.G. Pereira^a, Raquel S. Bandeira^a, Ricardo T. Fujiwara^c, Lílían L. Bueno^c, Bruno M. Roatt^b, Miguel A. Chávez-Fumagalli^d, Eduardo A.F. Coelho^{a,e,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-100, Minas Gerais, Brazil

^b Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto 35400-000, Minas Gerais, Brazil

^c Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil

^d Computational Biology and Chemistry Research Group, Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa 04000, Peru

^e Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Exploring drug repositioning for leishmaniasis treatment: ivermectin plus polymeric micelles induce immunological response and protection against tegumentary leishmaniasis

Authors

Camila S. Freitas^a, Daniela P. Lage^a, Amanda S. Machado^a, Danniele L. Vale^a, Vívian T. Martins^a, Jamille M.O. Cardoso^b, João A. Oliveira-da-Silva^a, Thiago A.R. Reis^a, Grasielle S.V. Tavares^a, Fernanda F. Ramos^a, Fernanda Ludolf^a, Isabela A.G. Pereira^a, Raquel S. Bandeira^a, Ricardo T. Fujiwara^c, Lílian L. Bueno^c, Bruno M. Roatt^b, Miguel A. Chávez-Fumagalli^d, Eduardo A.F. Coelho^{a,e,*}

Affiliations

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil.

^b Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 35400-000, Minas Gerais, Brazil.

^c Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil

^d Computational Biology and Chemistry Research Group, Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, 04000, Peru.

^e Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author

Adress: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho. Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, sala 143, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30.130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br

Abstract

Leishmania amazonensis can cause a wide spectrum of the clinical manifestations of leishmaniasis in humans. The development of new therapeutics is a long and expensive task; in this context, drug repositioning could be considered a strategy to identify new biological actions of known products. In the present study, ivermectin (IVE) was tested against distinct *Leishmania* species able to cause disease in humans. *In vitro* experiments showed that IVE was effective to reduce the infection degree and parasite load in *Leishmania donovani*- and *L. amazonensis*-infected macrophages that were treated with it. In addition, using the culture supernatant of treated macrophages, higher production of IFN- γ and IL-12 and lower levels of IL-4 and IL-10 were found. Then, IVE was used in a pure form or incorporated into Poloxamer 407-based polymeric micelles (IVE/M) for the treatment of *L. amazonensis*-infected BALB/c mice. Animals (n = 16 per group) were infected and later received saline, empty micelles, amphotericin B (AmpB), IVE, or IVE/M. They were euthanized at one (n = 8 per group) and 30 (n = 8 per group) days after treatment and, in both endpoints, immunological, parasitological, and biochemical evaluations were performed. Results showed that both IVE and IVE/M induced higher levels of IFN- γ , IL-12, GM-CSF, nitrite, and IgG2a antibodies, as well as higher IFN- γ expression evaluated by RT-qPCR in spleen cell cultures. Such animals showed low organic toxicity, as well as significant reductions in the lesion's average diameter and parasite load in their infected tissue, spleen, liver, and draining lymph node. The efficacy was maintained 30 days post-therapy, while control mice developed a polarized Th2-type response and high parasite load. In this context, IVE could be considered as a new candidate to be applied in future studies for the treatment against distinct *Leishmania* species.

Keywords: Tegumentary leishmaniasis; treatment; ivermectin; drug repositioning; Amphotericin B.

1. Introduction

Leishmaniasis is a tropical disease complex caused by parasites of the *Leishmania* genus [1] and afflicts approximately two million people each year, with more than 380 million at risk of contracting the infection in nearly 98 countries worldwide. There are more than 20 parasite species able to cause the disease in humans, and the development of infection primarily depends on the infecting species and the immune status of the mammalian host [2]. The main clinical manifestations consist of visceral (VL) and tegumentary leishmaniasis (TL), in which VL is the most severe form of disease and can be fatal if acute and left untreated. In other cases, TL is comprised of the cutaneous (CL), diffuse (DCL), and mucosal (ML) forms of disease, and can cause from self-limiting single lesions to the destruction of mucosal tissues and patient morbidity [3,4].

TL is caused by *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, and *L. braziliensis* species, among others, whereas VL is caused by *L. infantum* and *L. donovani* species [5]. *L. amazonensis* causes distinct clinical manifestations of disease in humans, leading to the development of nodular lesions of variable size, which erupt at various locations and progress to mucosal destruction [6,7]. Treatment against leishmaniasis includes pentavalent antimonials, which are first-line drugs, even if they cause toxicity in the patients and the parasite resistance has been registered. Other alternative therapeutic agents, such as amphotericin B (AmpB), miltefosine, paramomycin, pentamidine, among others, can also cause toxicity and teratogenicity, present high costs and/or lead to parasite resistance [8,9].

AmpB is a polyene macrolide antibiotic that acts by binding to membrane ergosterol, causing cell instability [10]. This drug presents known antifungal properties, as well as antileishmanial activity, which has been demonstrated in several parasite species [11,12]. However, although AmpB is efficacious against *Leishmania*, it is also toxic to the patients [13]. AmpB-based liposomal formulations have shown a lower toxicity and have maintained drug efficacy, but they present high costs, which represent a hindrance to their use, especially in endemic countries [14,15]. In this context, the identification of new products to be used in a safer and more effective treatment against leishmaniasis should be considered. Nevertheless,

drug discovery is a long and expensive process, requiring an investment of more than \$1.0 billion and an average working time of 10 to 20 years to identify key characteristics and develop a new product [16,17]. In the case of leishmaniasis, few new antileishmanial drugs are under development, and drug resistance is increasing.

In this aspect, works have highlighted drug repositioning as an alternative for treatment against tropical and neglected diseases, such as leishmaniasis [18]. In fact, in a previous study, hydroxyurea, a known anti-tumor agent, was evaluated with antileishmanial action against *L. mexicana*. Results showed that this drug induced alterations in the parasite cell cycle and reduced the infection in murine macrophages [19]. Cisplatin, another anti-tumor agent, also proved to be effective against *L. donovani* species, causing an increase in the levels of thiols and reactive oxygen species in the parasites, thus leading to their death [20]. In another recent study, ivermectin (IVM), an antiparasitic agent that presents good tolerance and safety profile, was both *in vitro* and *in vivo* evaluated against *L. infantum* species. Results showed that IVE presented better selectivity than did AmpB and was more effective in reducing the infection degree in treated macrophages, besides presenting prophylactic action when parasites were pre-incubated with it. This study showed that IVE, when administered in its pure form or when incorporated in Poloxamer 407-based polymeric micelles, was also effective in the treatment of *L. infantum*-infected mice, obtaining better parasitological and immunological results when compared to miltefosine [21].

Following the rationale to identify new antileishmanial targets able to act against distinct *Leishmania* sp., and in an attempt to reduce the costs to acquire such products, in the present work, drug repositioning was employed with IVE, which was evaluated for the first time as a therapeutic agent against *L. amazonensis* species. Immunological, parasitological, and toxicological evaluations were performed at two endpoints after the treatment of the infected mice in order to investigate the long-term therapeutic response of the compounds. Results showed that IVE containing micelles (IVE/M) was the most effective in inducing the development of a specific antileishmanial Th1-type immune response in the treated animals, which was based on high levels of IFN- γ , IL-12, GM-CSF, nitrite, and IgG2a isotype antibodies. Such findings correlated with significant reductions in the parasite load in the infection site (infected footpads), spleens, livers, and draining lymph nodes (dLNs) of the treated

animals, when compared to data obtained in the controls. The evaluations performed 30 days post-therapy corroborated with data obtained one day after treatment, with the IVE/M composition presenting better therapeutic results in the treated animals.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

IVE (C₂₅H₄₃NO₁₈), AmpB, and Poloxamer 407 (Pluronic® F127) were purchased from Sigma-Aldrich (catalog numbers 70288-86-7, 1397-89-3, and 16758, respectively, St. Louis, USA). AmpB was resuspended in a methanol/DMSO (9:1 v/v) solution and maintained at - 70 °C until use.

2.2. Parasites

L. amazonensis (IFLA/BR/1967/PH-8), *L. infantum* (MHOM/BR/ 1970/BH46) and *L. donovani* (LD1S/MHOM/SD/00) stationary promastigotes were grown in complete Schneider's medium (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), which was comprised of the medium plus 20 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, USA), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 50 µg/mL gentamicin pH 7.4, at 24 °C. The soluble *Leishmania* antigenic (SLA) extract was prepared as described [22].

2.3. Animals

The study was approved by the UFMG Committee for the Ethical Handling of Research Animals (logged under protocol number 085/ 2017). Female BALB/c mice (8 weeks old) were obtained from the Institute of Biological Sciences of the Federal University of Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) and were maintained under pathogen-free conditions.

2.4. Treatment of infected macrophages

To evaluate the *in vitro* efficacy of IVE in treat infected macrophages, cells (5×10^5) obtained from BALB/c mice were plated on round glass coverslips inside the wells of 24-well culture plates (Nunc) for cell attachment, using RPMI 1640 medium added with 20 % FBS, 2 mM L-glutamine at pH 7.4. After 24 h of incubation at 37 °C in 5 % CO₂, *L. donovani* and *L. amazonensis* stationary promastigotes were added (5×10^6 cells each; in a ratio of 10 parasites per one macrophage), and cultures were maintained for 24 h at 37 °C in 5 % CO₂. Next, free parasites were removed by washing with RPMI 1640 medium, and infected macrophages were treated with IVE (1.0, 5.0 and 10.0 µg/mL) or AmpB (1.0, 2.0 and 5.0 µg/mL), for 48 h at 24 °C in 5 % CO₂. Cells were washed in RPMI 1640 and incubated with 4 % paraformaldehyde for 15 min, at which time they were treated with 70 % ethanol in an ice bath for 4 h, and again washed three times with sterile PBS 1×. After, macrophages were stained with Giemsa, and the infection percentage after treatment and the number of recovered amastigotes were determined by counting 200 cells, in triplicate, using an optical microscope [23].

2.5. Evaluation of *in vitro* cytokine production

The culture supernatants of macrophages that were infected with *L. donovani* or *L. amazonensis* promastigotes and later treated with IVE (1.0, 5.0 and 10.0 µg/mL) or AmpB (1.0, 2.0 and 5.0 µg/mL) were collected and levels of IFN-γ, IL-4, IL-10 and IL-12 cytokines were measured by a capture ELISA using commercial kits (BD OptEIA™ set mouse, Pharmingen®, San Diego, CA, USA), according to manufacturer instruction.

2.6. Preparation of IVE/M

IVE/M was prepared by self-assembly using a solvent evaporation method [24]. Briefly, 15 mg of Poloxamer 407 were dissolved in phosphate buffered saline 1× pH 7.4 (PBS), adding 1 mL of methanol PA under moderate magnetic agitation and in an ice bath for 6 h, at room temperature. The residual solvent was removed by vacuum evaporation and the IVE (8.0 mg) was added to a microtube

containing 500 μL dichloromethane PA. This was then solubilized, using a vortex-mixing system. The solution was added to the Poloxamer P407, using vigorous magnetic agitation and in ice bath, until a viscous emulsion was obtained. The solvent was removed by vacuum evaporation, and the IVE/M composition was obtained as a transparent gel. Micelles were filtered in a 0.45 μm filtration membrane and maintained at 4 $^{\circ}\text{C}$, until use. Drug content was evaluated spectrophotometrically, using an ultraviolet method as described [25]. Briefly, IVE/M was diluted in methanol PA, and the absorbance was measured in an UV/Vis spectrophotometer (Double beam AJX-6100 PC; Micronal, S~ao Paulo, Brazil), at a wavelength of 380 nm. IVE concentration was calculated using a standard curve (0 to 18 μM), and analyses were carried out in triplicate. To evaluate the physical-chemical properties of IVE/M, dynamic light scattering (DLS) was used in a Zetasizer Nano ZSP system to evaluate the average particle size and zeta potential (Malvern Instruments, UK). In addition, the composition morphology was evaluated by transmission electron microscopy (TEM; Tecnai G20, FEI Company, USA). Empty micelles (18 % w/w) were prepared using the same protocol described for the preparation of IVE/M, but without the addition of IVE.

2.7. *In vivo* infection and therapeutic schedules

For the *in vivo* experiments, *L. amazonensis* stationary-phase promastigotes (107 parasites per animal) were used to infect BALB/c mice ($n = 16$ per group) through subcutaneous injection in their right hind footpad. After the development of ulcerated lesions (between 50 and 60 days post-infection), animals were divided into groups according to lesion size (2 to 3 mm), aiming to ensure a similar diameter between them. Then, mice ($n = 16$ per group) were treated with one of the following regimens: (a) saline group: mice received 50 μL of PBS; (b) micelle group: mice received 50 μL of empty micelles (10 mg/kg body weight); (c) AmpB group: mice received 50 μL of AmpB (2 mg/kg body weight); (d) IVE group: mice received 50 μL of IVE (5 mg/kg body weight); and (e) IVE/Mic group: mice received 50 μL of IVE/M (5 mg/kg body weight). In all therapeutic regimens, mice were treated by subcutaneous route, every-two days for 10 days. The development of nodules, metastasis, and other clinical signs in the animals were followed up during and after

treatments. The lesion's average diameter was monitored weekly by using an electronic caliper (799–6/150 model, Starrett®, Brazil).

2.8. Cytokine production and nitrite secretion

At one and 30 days after treatment, mice ($n = 8$ per group in each step) were euthanized and their spleens were collected, at which time splenocytes (5×10^6 cells per well) were cultured in 24-well plates (Nunc) in duplicate. Cells were incubated in DMEM plus 20 % FBS and 20 mM L-glutamine, at pH 7.4, and were non-stimulated (medium) or stimulated with SLA (25.0 $\mu\text{g/mL}$), for 48 h at 37 °C in 5 % CO₂. IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12, and GM-CSF levels were measured in the culture supernatant by capture ELISA using commercial kits (BD Pharmingen®, San Diego, CA, USA), according to manufacturer instructions. The nitrite secretion was also evaluated in the cell supernatant by Griess reaction [26].

2.9. IFN- γ mRNA expression

A RT-qPCR assay was performed to evaluate the IFN- γ mRNA expression in SLA-stimulated splenocyte cultures 30 days after treatment. For this, RNA was extracted from animals' spleens ($n = 8$ per group) using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following manufacturer instructions. It was resuspended in UltraPure™ DNase/ RNase-free distilled water (Invitrogen, USA), and its concentration was measured in a NanoDrop LITE spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), with absorbance ratios of 260/280 nm. The sample quality was evaluated in an agarose electrophoresis gel (1.5 % w/v). The extracted RNA was treated for 15 min at room temperature with DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), when the enzyme was deactivated using 25 mM EDTA for 10 min at 65 °C. Total RNA (2 μg) was reverse transcribed using an Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific, USA), forming complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) by the following parameters: 25 °C for 10 min, 37 °C for 120 min, and 85 °C for 5 min. The RT-qPCR assay was performed in a 7900HT Thermocycler (Applied Biosystems) using an Applied Biosystems PowerUp™ SYBR™ Green PCR master mix (Thermo Scientific, USA) and gene-

specific primers for IFN- γ : *Forward* 5' - TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3' and *Reverse* 5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3' . Transcripts were normalized employing ACTB and GAPDH housekeeping genes [27]. The procedure was optimized by adjusting the primer concentrations to 5, 10, and 15 pmol in order to obtain the best efficiency. The product purity was evaluated using melting curves and gel electrophoresis. The following parameters were employed: initial denaturation at 95 °C for 10 min, 40 cycles at 95 °C for 15 s, and annealing/extension at 60 °C for 1 min, followed by a dissociation stage to record the melting curve. Results were shown graphically as fold changes in the gene expression by using the mean $\pm$ standard deviation of a target gene. Data were analyzed according to the relative expression by using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

2.10. Antibody production

SLA-specific IgG1 and IgG2a isotype antibodies levels were evaluated in sera samples from treated and infected animals, one and 30 days after treatment (n = 8 per group in each step). SLA was used as an antigen (1.0 μ g per well) and sera samples were 1:100 diluted in PBS-T (PBS plus 0.05 % Tween 20), with incubation occurring for 1 h at 37 °C. After washing the plates five times, anti-mouse IgG1 and IgG2a horseradish-peroxidase conjugated antibodies (Sigma-Aldrich) were added (both 1:10,000 diluted in PBS-T), and reactions were developed by incubation with 2 μ L H₂O₂, 2 mg *ortho*-phenylenediamine and 10 mL citrate–phosphate buffer at pH 5.0, for 30 min and in the dark. They were then stopped by adding 20 μ L H₂SO₄ 2 N, and the optical density (OD) values were obtained by using an ELISA microplate spectrophotometer (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada) at 492 nm.

2.11. Parasite load evaluated by a limiting dilution technique

The organ parasitism was evaluated in the infection site (infected tissue), spleens, livers, and draining lymph nodes from treated and infected animals, one and 30 days after treatment (n = 8 per group in each step), using a limiting dilution technique [28]. For this, tissue and organs were collected, weighed, and homogenized in a glass tissue grinder in sterile PBS. Tissue debris were removed by

centrifugation at $150 \times g$, and cells were concentrated by centrifugation at $2,000 \times g$. The pellet was resuspended in 1 mL of complete Schneider's medium, when 220 μL of the resuspension were plated onto 96-well flat-bottom microtiter plates (Nunc) and diluted in logfold serial dilutions in complete Schneider's medium (10^{-1} – 10^{-12} dilution). Each sample was plated in triplicate and read 7 days after the beginning of the culture at 24°C . Results were expressed as the negative log of the titer (*i.e.*, the dilution corresponding to the last positive well), which was adjusted per milligram of tissue or organ.

2.12. Splenic parasitism evaluated by qPCR

The splenic parasitism was also evaluated by qPCR technique [29], 30 days after treatment. For this, infected tissue and spleen fragments were collected ($n = 8$ per group), and DNA was extracted using a phenol–chloroform method. Five hundred microliters of lysis solution [50 mM Tris, 50 mM NaCl, and 10 mM EDTA (pH 8.0)], 1 % Triton X-100 and 20 μL of proteinase K solution (20 mg/mL, Promega) were added to each fragment (20 mg). The mixture was incubated for 16 h at 37°C , and 500 μL of phenol (Sigma-Aldrich) were added, at which time the material was homogenized for 10 min and centrifuged for 5 min at $10,000 \times g$. The supernatant was transferred to a new tube, and this step was repeated. Five hundred microliters of chloroform-isoamyl alcohol (24:1; Sigma-Aldrich) were added, and the solution was homogenized and centrifuged for 5 min at $10,000 \times g$. The sample was then transferred to a new tube, and 500 μL of ethanol PA were added, at which time the material was incubated for 10 min in an ice bath for DNA precipitation. This was then centrifuged for 10 min at $14,000 \times g$, and 500 μL ethanol 70 % (v/v) were added to the pellet, which was resuspended and centrifuged in the same conditions. The supernatant was removed, and the sample was dried at room temperature. The resulting DNA was resuspended in 100 μL milli-Q water and amplified using *Forward* (CCTATTTTACACCAACCCCGAGT) and *Reverse* (GGGTAGGGGCGT TCTGCGAAA) primers. The mouse β -actin gene (*Forward*: CAGAGCAAGAGAGGTATCC and *Reverse*: TCATTGTAGAAGGTGTGGTGC) was used as an endogenous control to verify sample integrity. Standard curves were obtained from DNA extracted from 108 parasites for kDNA and 108 peritoneal

macrophages for β -actin, under the same conditions used to extract the other samples. PCR was performed on StepOne™ Instrument (48 wells-plate; Life Technologies) using 2× SYBR® Green PCR master mix (5 μ L, Applied Biosystems), with 2 mM of each primer (1 μ L) and 4 μ L DNA (5 ng/ μ L). Samples were incubated at 95 °C for 10 min and submitted to 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Results were converted into a number of parasites per nucleated cell (multiplied by one thousand to facilitate visualization).

2.13. Organic toxicity

The *in vivo* toxicity was evaluated by dosage of urea nitrogen and creatinine as renal damage markers and from alanine transaminase (*ALT*) and aspartate transaminase (*AST*) as hepatic damage markers [25]. For this, sera samples were collected from treated and infected animals (n=8 per group in each step), and evaluations were performed using commercial kits (Labtest Diagnostica®, Belo Horizonte), according to manufacturer instructions. As a control, sera samples from non-treated and non-infected mice (n=4) were used.

2.14. Statistical analysis

Results were entered into Microsoft Excel (version 10.0, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) spreadsheets and analyzed by GraphPad Prism, version 9.4.1 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). For the data analysis obtained in the footpad swellings, the IVE/M group was selected as a control to avoid error accumulation in multiple comparison tests. In this context, the two-way ANOVA test was used, while for the other analyses, the ordinary-one-way ANOVA test followed by Dunnett's multiple test were employed. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$. Data shown in this study are representative of one from experiments.

3. Results

3.1. Treatment of infected macrophages and *in vitro* cytokine production

The *in vitro* therapeutic action of IVE was also evaluated in treated and *L. donovani* or *L. amazonensis*-infected murine macrophages. Results showed that, when cells were infected with *L. donovani* and treated with IVE (10.0 µg/mL) or AmpB (5.0 µg/mL), the infection degree was 38.5 % and 65.6 %, respectively, while the number of recovered amastigotes after treatment was 1.3 and 3.7, respectively (Table 1). Cells infected and untreated presented infection degree of 90.3 % and a number of recovered amastigotes of 14.3. When macrophages were infected with *L. amazonensis* and treated with IVE or AmpB, the infection degree was 60.5 % and 77.5 %, respectively, while the number of recovered amastigotes after treatment was 2.0 and 4.5, respectively. Cells infected and untreated presented infection degree of 99.8 % and a number of recovered amastigotes of 17.5 (Table 1).

The cell culture supernatant from treated and infected macrophages was collected and used to quantify cytokine levels by a capture ELISA. Results showed that the *L. amazonensis*- and *L. donovani*-infected macrophages, which were treated with IVE (10.0 µg/mL), presented higher IFN-γ and IL-12 production, as compared to levels obtained of IL-4 and IL-10 (Tables 2 and 3, respectively). Otherwise, when AmpB (5.0 µg/mL) was used for the treatment of infected cells, low and similar levels of all cytokines were found in the culture supernatants, suggesting a direct effect of drug in the parasites, while IVE seems to also activate immune cells to produce Th1-type cytokines.

Table 1. Treatment of the infected macrophages. Murine macrophages were infected with *L. amazonensis* or *L. donovani* and later treated with ivermectin (1.0, 5.0 and 10.0 µg/mL) or amphotericin B (1.0, 2.0 and 5.0 µg/mL). The percentage of infected macrophages after treatment and the number of recovered amastigotes were calculated by counting 200 cells, in triplicate. Results are showed as mean ± standard deviation of the groups.

Compound	Concentration (µg/mL)	Percentage of infection after treatment		Number of recovered amastigotes	
		<i>L. donovani</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. amazonensis</i>
Ivermectin	10.0	38.5 ± 2.5	60.5 ± 3.3	1.3 ± 0.4	2.0 ± 0.5
	5.0	57.6 ± 4.2	76.5 ± 4.0	3.2 ± 0.9	5.5 ± 0.9
	1.0	78.7 ± 3.9	83.3 ± 3.4	5.9 ± 1.2	8.9 ± 1.2
	(-)	90.3 ± 3.6	99.8 ± 4.5	14.2 ± 2.3	17.5 ± 2.2
Amphotericin B	5.0	65.6 ± 4.0	77.5 ± 4.4	3.7 ± 0.8	4.5 ± 1.0
	2.0	79.8 ± 3.8	86.6 ± 3.8	6.5 ± 1.1	7.4 ± 1.5
	1.0	83.2 ± 2.8	90.2 ± 2.5	8.9 ± 1.6	10.1 ± 1.7
	(-)	90.3 ± 3.6	99.8 ± 4.5	14.2 ± 2.3	17.5 ± 2.2

Table 2. Cytokine production after *in vitro* treatment of *L. amazonensis*-infected macrophages.

Murine cells were infected with *L. amazonensis* promastigotes and later were untreated (control) or treated with IVE or AmpB for 48 h at 24 °C in 5 % CO₂. The cell culture supernatant was collected and IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-12 levels were measured using commercial kits. Results are showed as mean $\pm$ standard deviation of the groups.

Compound	Cytokine levels after treatment of <i>L. amazonensis</i> -infected macrophages (pg/mL)				
	Concentration (μ g/mL)	IFN- γ	IL-4	IL-10	IL-12
Ivermectin	10.0	132.2 $\pm$	37.6 $\pm$	35.8 $\pm$	87.7 $\pm$
		10.9	2.7	2.0	4.4
	5.0	78.8 $\pm$	34.5 $\pm$	33.4 $\pm$	50.6 $\pm$
		6.7	3.3	2.6	3.5
	1.0	50.6 $\pm$	30.4 $\pm$	29.8 $\pm$	37.6 $\pm$
		4.3	2.3	3.2	3.3
	(-)	35.4 $\pm$	27.8 $\pm$	30.4 $\pm$	26.5 $\pm$
		2.5	3.2	2.2	3.7
Amphotericin B	5.0	50.8 $\pm$	56.5 $\pm$	60.5 $\pm$	53.4 $\pm$
		2.7	4.5	3.9	3.8
	2.0	45.4 $\pm$	49.8 $\pm$	56.7 $\pm$	40.8 $\pm$
		3.6	4.0	2.6	3.6
	1.0	40.4 $\pm$	30.4 $\pm$	42.2 $\pm$	33.7 $\pm$
		2.2	3.3	3.3	2.6
	(-)	35.4 $\pm$	27.8 $\pm$	30.4 $\pm$	26.5 $\pm$
		2.5	3.2	2.2	3.7

Table 3. Cytokine production after *in vitro* treatment of *L. donovani*-infected macrophages.

Murine cells were infected with *L. donovani* promastigotes and later were untreated (control) or treated with IVE or AmpB for 48 h at 24 °C in 5 % CO₂. The cell culture supernatant was collected and IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-12 levels were measured using commercial kits. Results are showed as mean $\pm$ standard deviation of the groups.

Compound	Cytokine levels after treatment of <i>L. donovani</i> -infected macrophages (pg/mL)				
	Concentration (μ g/mL)	IFN- γ	IL-4	IL-10	IL-12
Ivermectin	10.0	145.3	49.6	43.5	132.2
		$\pm$ 6.7	$\pm$ 3.4	$\pm$ 3.2	$\pm$ 5.5
	5.0	84.5 $\pm$	44.3	39.8	79.8 $\pm$
		4.3	$\pm$ 2.8	$\pm$ 3.0	4.0
	1.0	60.5 $\pm$	39.5	30.2	56.5 $\pm$
		3.5	$\pm$ 3.0	$\pm$ 2.6	2.9
	(-)	29.8 $\pm$	33.2	25.4	30.4 $\pm$
		3.0	$\pm$ 2.5	$\pm$ 1.7	2.9
Amphotericin B	5.0	60.4 $\pm$	58.7	55.6	65.5 $\pm$
		4.3	$\pm$ 3.6	$\pm$ 3.6	3.7
	2.0	54.3 $\pm$	50.6	45.6	51.2 $\pm$
		4.3	$\pm$ 3.7	$\pm$ 4.8	3.6
	1.0	37.6 $\pm$	40.7	33.4	40.5 $\pm$
		3.0	$\pm$ 2.9	$\pm$ 2.7	5.4
	(-)	29.8 $\pm$	33.2	25.4	30.4 $\pm$
		3.0	$\pm$ 2.5	$\pm$ 1.7	2.9

3.2. Characterization of IVE/Mic and evaluation of immune response

IVE/M composition was prepared and a physical–chemical characterization was performed. Results showed that it presents a mean particle size of 98.45 ± 5.37 nm, a narrow distribution of 0.245 ± 0.044 and zeta potential of -9.01 ± 0.98 mV. IVE/M presents also homogeneous spherical shape and smooth surface, besides polydispersity index of 0.19. After the *in vivo* procedures in the animals, the immune response derived from stimulated spleen cell cultures was evaluated by means of the dosage of Th1- and Th2-type cytokines, at one and 30 days post-therapy. Results showed that SLA-stimulated cell cultures derived from IVE or IVE/M groups produced significantly higher levels of IFN- γ , IL-12, and GM-CSF, when compared to data found in control mice (saline, micelle, and AmpB groups), one and 30 days after treatment (Fig. 1). By contrast, control groups mice produced significantly higher levels of antileishmanial IL-4 and IL-10 at both post-therapy endpoints. Moreover, an RT-qPCR assay showed that IVE or IVE/M-treated mice presented higher IFN- γ expression in their stimulated cell cultures 30 days after treatment, when compared to data obtained in control mice, corroborating with the Th1-type response profile found in the treated animals (Fig. 2).

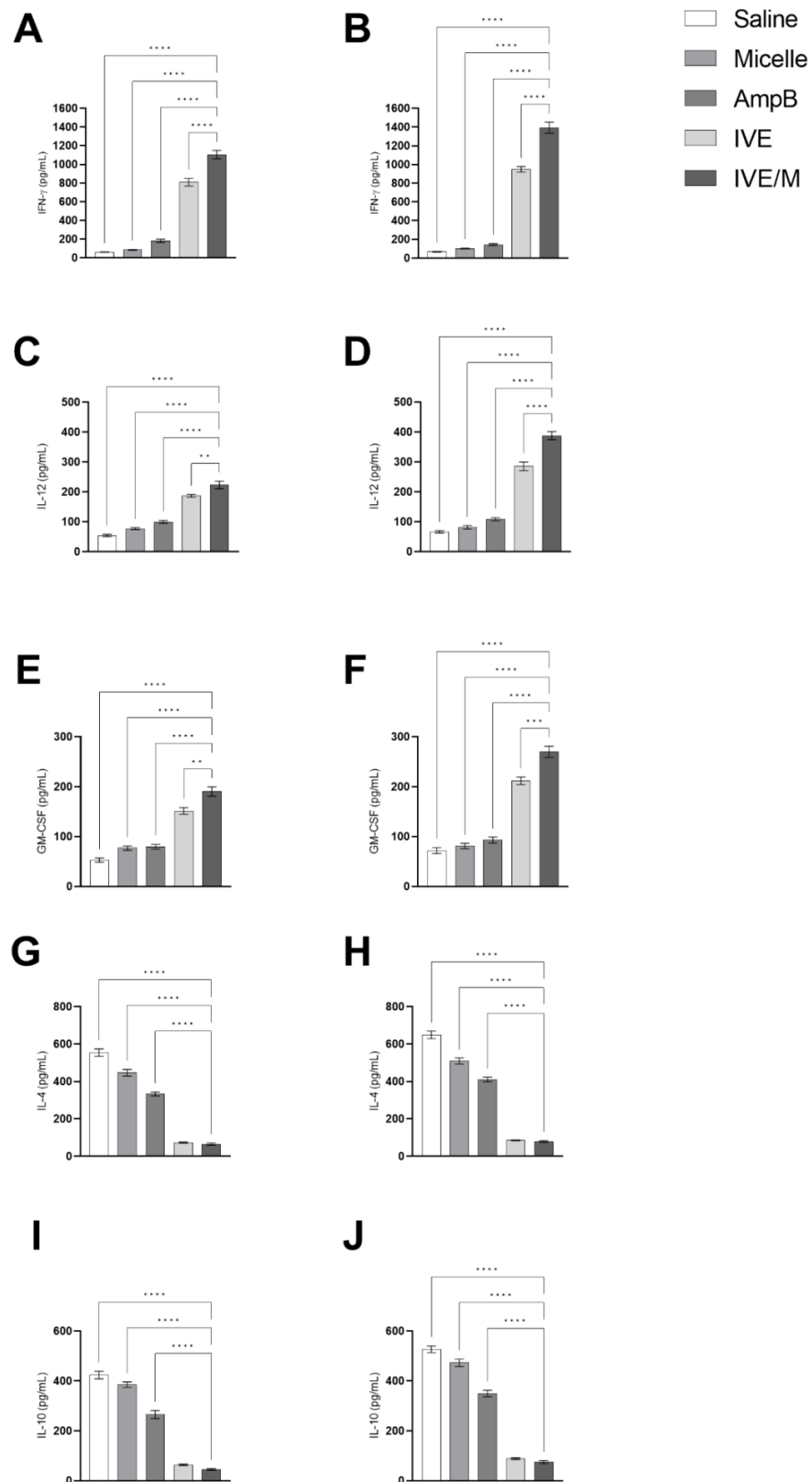


Fig. 1. Cytokine response evaluated after treatments. BALB/c mice (n=16 per group) were infected with 10^6 *L. amazonensis* stationary promastigotes and later received saline, micelle, amphotericin B (AmpB), pure ivermectin (IVE), or IVE incorporated into polymeric micelles (IVE/M). Animals were euthanized, at one and 30 days after their treatments (n=8

per group in each step), at which time their splenocytes (5×10^6 cells per mL) were collected and cultured in medium (control) or stimulated with *L. amazonensis* SLA (25.0 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h at 37°C in 5% CO₂. IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12, and GM-CSF levels were measured in the culture supernatant by a capture ELISA using commercial kits. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups, one (panels A, C, E, G, and I) and 30 (panels B, D, F, H, and J) days after treatment. (**), (***), and (****) indicate statistically significant differences between the groups, with $P < 0.01$, $P < 0.001$, and $P < 0.0001$, respectively.

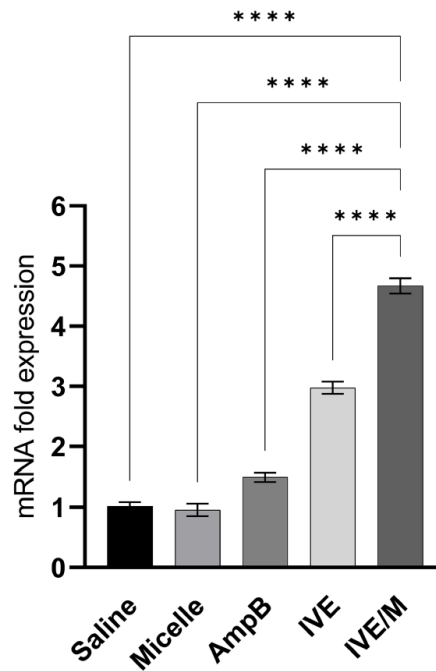


Fig. 2. IFN- γ mRNA expression in the parasite-stimulated spleen cell cultures. Mice ($n = 16$ per group) were infected with *L. amazonensis* promastigotes and later received saline, micelle, amphotericin B (AmpB), pure ivermectin (IVE), or IVE incorporated into polymeric micelles (IVE/M). Thirty days post-therapy, their spleen cells (5×10^6 per well) were cultured in medium (control) or stimulated with SLA (25.0 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h at 37 °C in 5 % CO₂. The mRNA was obtained and used to evaluate the IFN- γ expression by a RT-qPCR technique. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. (**) indicates a statistically significant difference in relation to the saline, micelle, and AmpB groups ($P < 0.0001$). (***) indicates a statistically significant difference in relation to the saline, micelle, AmpB, and IVE groups ($P < 0.0001$).

It is known that *Leishmania*-parasitized macrophages, after stimulation with IFN- γ , are able to activate nitric oxide (NO) synthesis and kill the parasites. In this context, and to evaluate the microbicidal activation of these phagocytic cells in the treated groups, the nitrite secretion was assayed as an indicator of NO production in the SLA-stimulated cell supernatants. Results showed that splenocytes from IVE and IVE/M-receiving mice groups produced significantly higher levels of nitrite at both

endpoints after treatment, when compared to data obtained in the control mice (Fig. 3).

Then, the humoral response was evaluated in the treated and infected mice at one and 30 days post-therapy. Results showed that IVE or IVE/M-treated mice produced significantly higher levels of SLA-specific IgG2a isotype antibodies, when compared to values found in control (saline, micelle, and AmpB) mice, which presented higher IgG1 isotype levels at both endpoints after treatment (Fig. 4). In general, AmpB induced better cell and humoral response than did the saline and micelle groups. However, IVE and IVE/M showed a more polarized Th1-type profile. Between these groups, mice receiving IVE/M produced higher IFN- γ , IL-12, GM-CSF, and nitrite levels, which were associated with lower IL-4 and IL-10 levels, as compared to values obtained in IVE-treated animals (Figs. 1, 3 and 4).

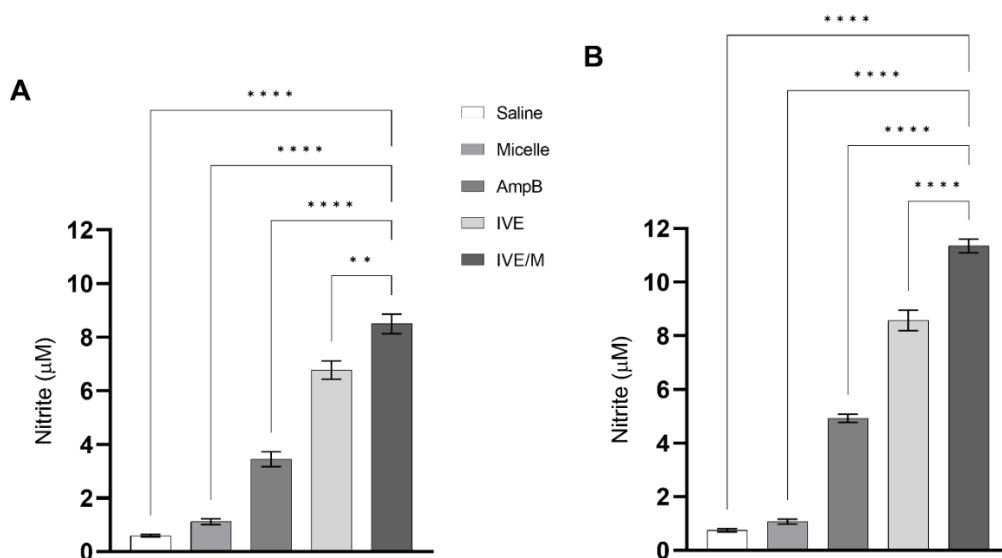


Fig. 3. Nitrite secretion investigated evaluated treatments. Mice (n=16 per group) were infected with *L. amazonensis* promastigotes and later received saline, micelle, amphotericin B (AmpB), pure ivermectin (IVE), or IVE incorporated into polymeric micelles (IVE/M). At one and 30 days after their treatment, the animals were euthanized (n=8 per group in each step), and their splenocytes (5×10^6 cells per mL) were cultured in medium (control) or stimulated with SLA (25.0 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h at 37°C in 5% CO₂. The cell supernatant was collected and used to evaluate the nitrite production by Griess reaction. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups, one (panel A) and 30 (panel B) days after treatments. (**) and (****) indicate a statistically significant difference between the groups, with $P < 0.01$ and $P < 0.0001$, respectively.

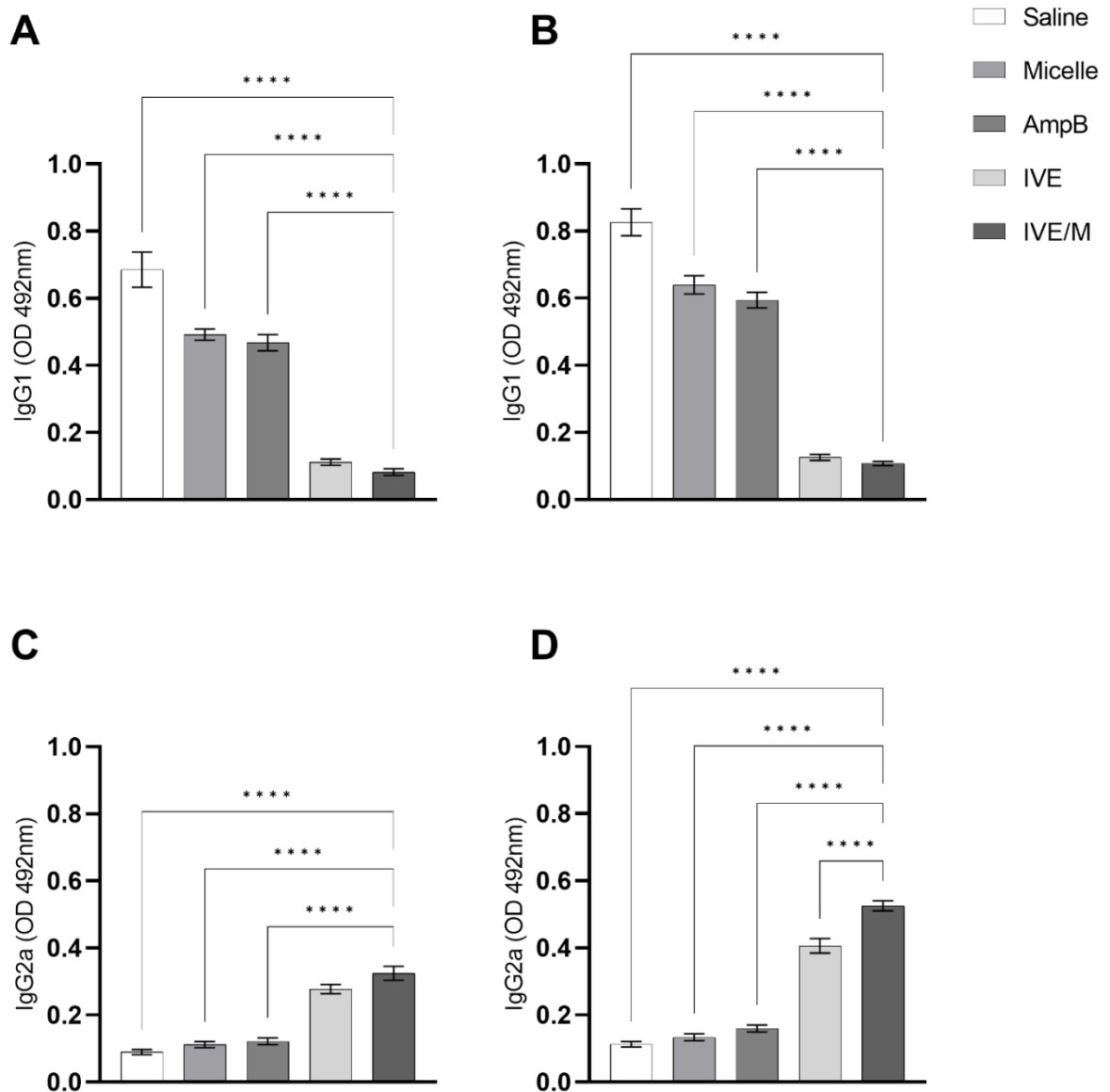


Fig. 4. Antibody response measured after therapeutic regimens. Mice (n=16 per group) were infected with *L. amazonensis* stationary promastigotes and later received saline, micelle, amphotericin B (AmpB), pure ivermectin (IVE), or IVE incorporated into polymeric micelles (IVE/M). At one and 30 days after their treatments, the animals were euthanized (n=8 per group in each step), and their sera samples were collected and used to evaluate the production of anti-SLA IgG1 and IgG2a isotype antibodies. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups, one (panels A and C) and 30 (panels B and D) days after treatment. (****) indicate a statistically significant difference between the groups ($P < 0.0001$).

3.2. Parasite burden evaluated in the treated and *L. amazonensis*-infected animals

The *in vivo* therapeutic efficacy against *L. amazonensis* infection was evaluated in treated mice, at one and 30 days after therapy. Analyzing the lesion's

average diameter in the infected footpads, IVE or IVE/Mic-receiving animals showed significant reductions in the edema in the infected tissue, when compared to data obtained in the saline, micelle, and AmpB groups, at both endpoints (Fig. 5A). Additionally, IVE/M-treated mice presented the most significant reductions in the average lesion diameter, when compared to the others. The parasite load was evaluated then through a limiting dilution technique, and results showed that IVE or IVE/M-receiving mice presented the most significant reductions in parasitism in their infected footpad, spleen, liver, and dLN, as compared to values obtained in the saline, micelle, and AmpB groups at both endpoints (Fig. 5B). A qPCR assay performed in the infected footpad and spleen of the animals, 30 days after treatment, showed also that IVE and IVE/M groups mice presented the most significant reductions in splenic parasitism, when compared to the control groups (Fig. 5C). The AmpB group also presented a lower parasite load as compared to the saline and micelle groups; however, parasitism found in AmpB-treated mice was higher than that found in IVE or IVE/M-receiving mice. Additionally, IVE/M-treated animals presented the best therapeutic response reflected by a lower lesion mean diameter and parasite burden, as compared to values found in the IVE group.

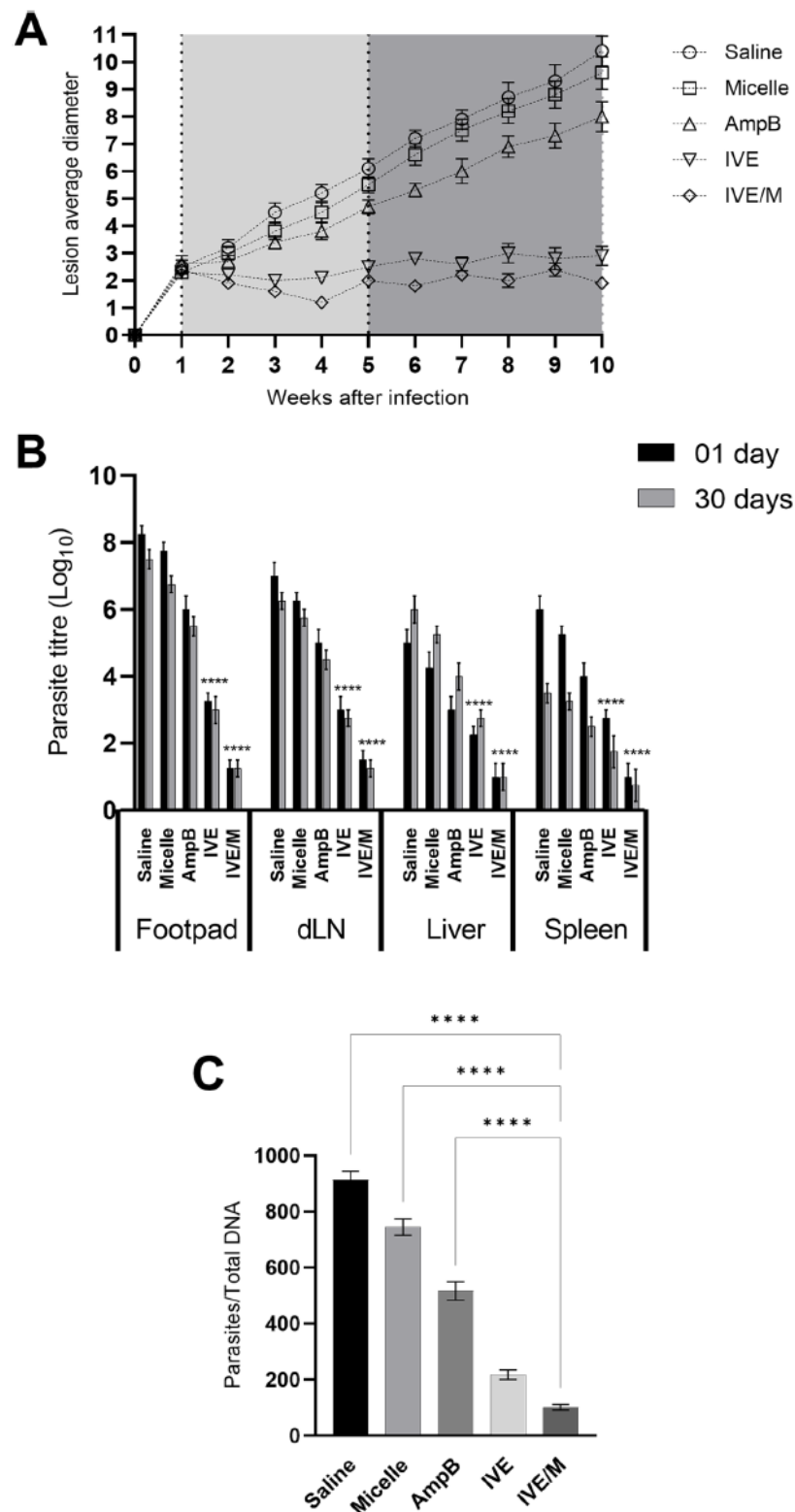


Fig. 5. Evaluation of parasitological response induced after the therapeutics. Mice ($n = 16$ per group) were infected with *L. amazonensis* stationary promastigotes and later they received saline, micelle, amphotericin B (AmpB), pure ivermectin (IVE), or IVE incorporated into polymeric micelles (IVE/M). The lesion's average diameter was monitored weekly during and after treatment by using an electronic caliper. Lines indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups, with measurements occurring before the first (weeks 1 to 5) and

second (weeks 5 to 10) euthanasia ($n = 8$ animals per group per step) (A). At one and 30 days after treatment, eight animals per group (each time) were euthanized and the parasite load was estimated by a limiting dilution technique. Results obtained using the infected footpad, draining lymph node (dLN), spleen and liver of the animals are shown (B). In addition, the splenic parasite load was also estimated by a qPCR technique, at 30 days after treatment and results are also shown (C). Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. (****) indicates statistically significant difference in relation to the saline, micelle and AmpB groups ($P < 0.0001$).

3.3. Organic toxicity evaluated in the treated and infected animals

The *in vivo* toxicity was evaluated in sera samples from treated and infected animals, at one and 30 days post-therapy. Results showed that the mice from the saline, micelle, and AmpB groups presented higher levels of renal (urea and creatinine) and hepatic (ALT and AST) damage markers, when compared to data found in IVE or IVE/Mic-receiving animals, at both endpoints after treatment (Fig. 6). Results found in the sera of these mice suggest a low presence of renal and hepatic damage markers, which was possibly caused by infection by *Leishmania* parasites.

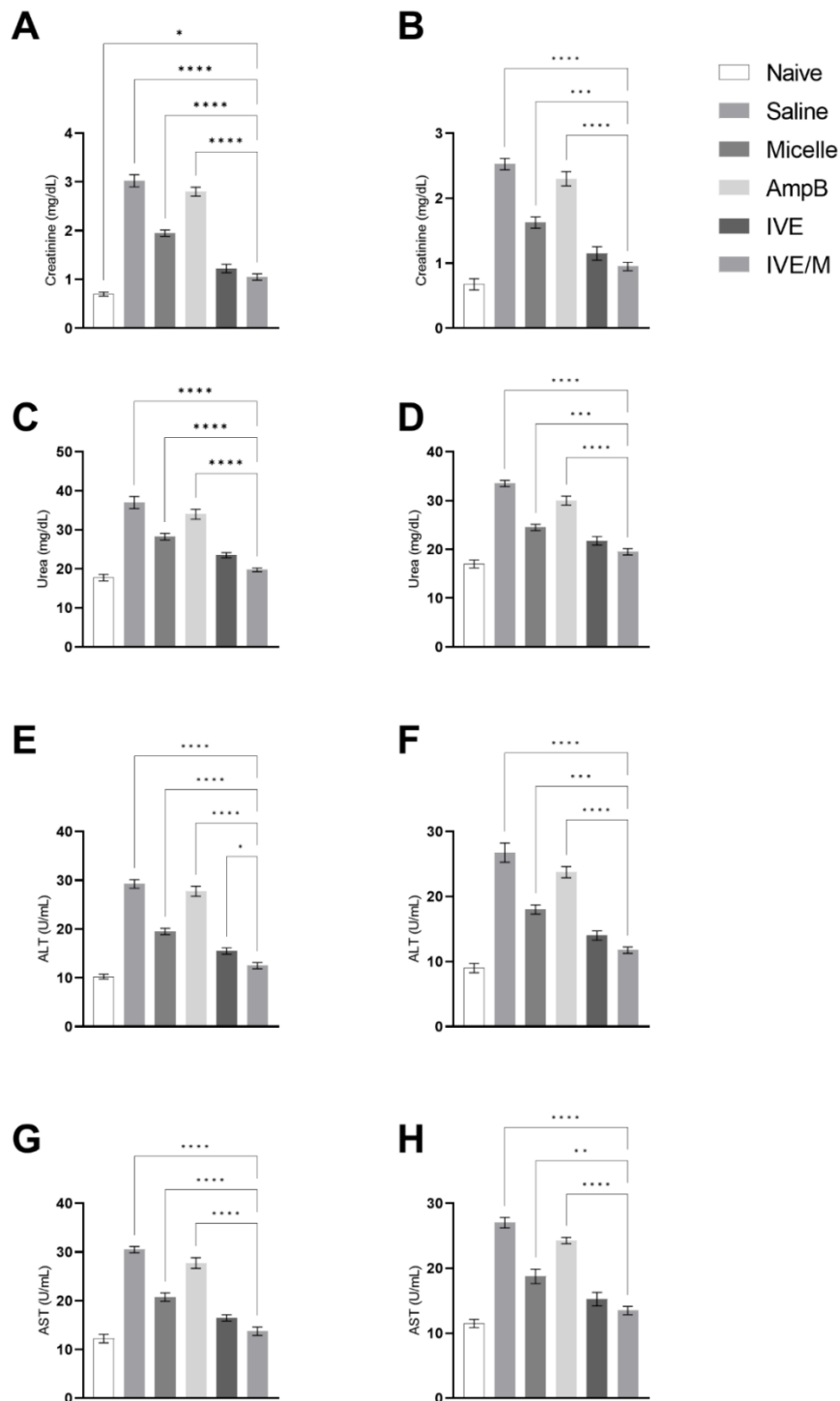


Fig. 6. Organic toxicity measured after treatments. The animals (n=16 per group) were infected with *L. amazonensis* promastigotes and later received saline, micelle, amphotericin B (AmpB), pure ivermectin (IVE), or IVE incorporated into polymeric micelles (IVE/M). At one and 30 days after treatment, the mice (n=8 in each time) were euthanized, and their sera samples were collected and used to evaluate the levels of creatinine, urea, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST), using commercial kits. Samples were also collected of non-infected and non-treated mice (naïve animals, n=6), which were used as controls. Bars indicate the mean ± standard deviation of the groups, one

(panels A, C, E, and G) and 30 (panels B, D, F and H) days after treatment. (*), (**), (***) and (****) indicate a statistically significant difference between the groups, with $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, and $P < 0.0001$, respectively.

4. Discussion

IVE has been used for the treatment against infection caused by intestinal helminths and ectoparasites [30,31]. However, its myriad alternative use continues to be underestimated, since this drug presents good tolerance and proven safety for the patients [32]. In this context, the present study employed drug repurposing with IVE in order to evaluate its *in vivo* antileishmanial activity against *L. amazonensis* infection, which is an important parasite species responsible for American TL cases. IVE was applied in its pure form or incorporated into polymeric micelles as a delivery system to treat chronically infected mice. Experimental results showed that both IVE and IVE/M induced the development of a specific Th1-type immunological response in the treated animals, which reflected in significant reductions in the lesion's average size and parasite load in their infected tissues, spleens, livers, and draining lymph nodes. In addition, these compositions caused low organic toxicity in the animals, possibly reflected by infection by the parasites in the animals. The therapeutic action was maintained 30 days after therapy, while control groups presented a worsening of the infection. Overall, IVE/M induced better immunological, parasitological and toxicological results, as compared to data obtained using the pure form of IVE.

Drug repositioning has provided a therapeutic option for distinct pathologies, such as leishmaniasis [18,33,34], since the search for new pharmaceutical targets is a resource-intensive, expensive, and time-consuming task. This procedure has a number of advantages, since it consists of finding new uses for existing drugs, and thus allows for the simplification of regulatory procedures to introduce the previously approved products on the market, but with a new biological action [35–37]. Some aspects, such as drug safety and toxicity, have been previously analyzed and approved, which make the initial process of development for a repositioned drug faster, consequently increasing the chances of introducing it on the market [38,39]. In this context, in a recent study published, IVE was tested as an antileishmanial agent against *L. infantum* infection in mice. Immunological and parasitological evaluations were performed, and results showed that *in vivo* IVE-treatment significantly reduced

the parasite load in all tested organs, as well as induced the development of an anti-parasite Th1-type cellular and humoral immune response, at both one and 15 days after therapy, suggesting that IVE could provide therapeutic efficacy against *L. infantum* infection [21]. In this context, in order to continue to evaluate the drug repositioning with IVE against other *Leishmania* species, the present study tested this against infection caused by *L. amazonensis*, which causes TL in humans.

The immune control against *Leishmania* infection requires the balance between pro-inflammatory and regulatory cytokines, with those stimulating the Th1-type response being more necessary to induce protection in the hosts against infection [40]. In the development of the Th1-type response, CD4⁺ T cells produce IFN- γ , which activates parasitized macrophages to kill parasites [41]. In addition, these cells secrete cytokines, such as IL-2, TNF- α , among others, which are important for the recruitment, proliferation, and maintenance of phagocytes at the site of infection, creating an environment relevant to the intracellular death of *Leishmania* [42]. Other cytokines, such as IL-12, GM-CSF, among others, are also produced and important in the development of Th1-type responses and to combat the parasites. On the other hand, Th2-type cytokines, such as IL-4, IL-10, IL-13, among others, downregulate the Th1-type response, and contribute to parasite growth and development [43]. In this context, immunotherapeutic candidates should be able to stimulate the Th1-type immune profile in the treated hosts.

We have performed preliminary assays to evaluate if IVE could presents an *in vitro* action against other *Leishmania* species. In this context, murine macrophages were first infected with *L. amazonensis* or *L. donovani* stationary promastigotes and later treated with IVE. AmpB was used as a drug control. Results showed that IVE was more effective for the treatment of infected cells, since higher reductions in the parasite load was found in the treated macrophages, reflected by lower infection degree and number of amastigotes recovered after treatment, when compared to values found using AmpB. Additionally, how also a preliminary analysis of immune response stimulated by IVE; we used the culture supernatant from treated macrophages and evaluated the cytokine production. Results showed that it induced higher production of IFN- γ and IL-12, when compared to IL-4 and IL-10 levels, opening then the possibility to evaluate this compound as therapeutic candidates in *in vivo* studies.

Immunological analyses were also performed using spleen cell cultures from treated mice, and results showed that the treatment using IVE or IVE/M induced the development of specific antileishmanial Th1-type immunity in the treated animals, with the predominance of IFN- γ , GM-CSF, and IL-12, associated with low IL-4 and IL-10 levels; thus denoting the polarized Th-1-type response found in these animals. By contrast, and as expected, control group mice produced higher levels of IL-4 and IL-10, and developed a polarized Th2-type response. Similar immunological results were also described by others, in which distinct antileishmanial candidates were evaluated against *Leishmania* infection [44,45]. In this context, and based on the *in vitro* analyses performed here, we could postulate that IVE is an activating of the mammalian host immune response and could be used against distinct parasite species able to cause VL and TL in the world.

Furthermore, to identify new therapeutics against leishmaniasis; delivery systems have also been tested so as to improve the quality and duration of therapeutic responses by increasing the efficacy of the drug [46,47]. These products can reduce the possibility of drug resistance, improve its specificity and efficacy, and contribute to a more selective and less toxic action in the mammalian hosts [48]. In this aspect, Poloxamer 407-based micelles have been used for this purpose and have proven to be promising drug carrier candidates, filling a number of requirements in terms of structure and size [49]. Studies have shown that polymeric micelles present adjuvant action and could be used associated with antileishmanial drugs against infection by *Leishmania* parasites [50–52]. The present work tested IVE associated with such micelles, and immunological and parasitological results proved to be better when compared to the use of molecules in their pure forms, thus suggesting the possibility of optimizing the drug's use, in turn reducing its concentration, as well as its treatment time and toxicity for the patients.

There are a number of drugs used for the treatment against leishmaniasis, such as pentavalent antimonials, AmpB, miltefosine, pentamidine, paromomycin, among others. However, these products, in spite of their own organic changes caused by the infection, cause toxicity in the hosts and/or present high costs [9,53]. These limitations represent underlying reasons for new studies to be conducted in order to identify less toxic alternative compounds. In fact, AmpB has proven to be an effective antileishmanial activity against distinct *Leishmania* species, such as *L.*

infantum, *L. braziliensis*, and *L. amazonensis* [11]. However, the clinical use of this drug has been limited, mainly due to high toxicity, which can cause hepatic and renal toxicity, cardiac alterations, hemolysis, liver damage, nausea, and fever in the patients [54]. Here, AmpB-treated mice presented high levels of hepatic and renal damage markers, thereby demonstrating the toxic profile caused by this drug after treatment. By contrast, IVE or IVE/M-receiving animals presented low levels of these enzymatic markers, suggesting a protective effect of IVE in the organic system of the mammalian host. Similar results were also found in other studies using AmpB for the *in vivo* treatment against *Leishmania* infection [55–57].

In our study, parasitological and immunological evaluations were performed one and 30 days after treatment in order to evaluate the long-term therapeutic efficacy of the products. Results showed that both IVE- and IVE/M-treated mice presented significant reductions in their lesions' average diameters and parasite loads in the infection sites and organs, when compared to results found in the control groups, which showed a progressive infection caused by the parasites. AmpB-treated animals showed lower levels of parasitism when compared to the controls; however, they were higher when compared to IVE- or IVE/M-receiving mice. Limitations of this study include the application of a lower concentration and number of doses of the therapeutics, in addition to the inclusion of other antileishmanial molecules as additional controls. Nevertheless, data presented here can be considered as a proof-of-concept of drug repositioning using IVE for treatment against distinct *Leishmania* species able to cause leishmaniasis in the world.

Authors' contribution

Conceived and designed the experiments: EAFC CSF. Performed the experiments: CSF DPL ASM DLV VTM JMOC JAOS TARR GSVT FFR FL IAGP RSB BMR. Analyzed the data: EAFC CSF MACF. Contributed reagents/materials/analysis tools: BMR. Wrote the paper: EAFC.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgments

This work was supported by grant APQ-02167-21 from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and by grant APQ-408675/2018-7 from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. The authors also thank the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FAPEMIG and CNPq for the student scholarships.

References

- [1] G. Jr, R.B.T. Grimaldi, Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research, *Clin. Microbiol. Rev.* 6 (1993) 230–250.
- [2] World Health Organization, Leishmaniasis, 2022, <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>, Visited at 01/18/2022.
- [3] I. Kevric, M.A. Cappel, J.H. Keeling, New World and Old World *Leishmania* infections: a practical review, *Dermatologic. Clin.* 33 (2015) 579–593.
- [4] S. Burza, S.L. Croft, M. Boelaert, Leishmaniasis, *Lancet* 392 (2018) 951–970.
- [5] M. Akhoundi, T. Downing, J. Votýpka, K. Kuhls, J. Lukeš, A. Cannel, C. Ravel, P. Marty, P. Delaunay, M. Kasbari, B. Granouillac, L. Gradoni, D. Sereno, Leishmania infections: molecular targets and diagnosis, *Mol. Aspects Med.* 57 (2017) 1–29.
- [6] R.N.R. Sampaio, M.F. Ferreira, S.S. Martins, J.O.C.D. Motta, Successful treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*, *An. Bras. Dermatol.* 96 (2021) 602–604.
- [7] T.F. Silva, F. Tomiotto-Pellissier, A.K.S. Pasquali, F. Pinto-Ferreira, W.R. Pavanelli, I. Conchon-Costa, I.T. Navarro, E.T. Caldart, Phenotypical and genotypical differences among *Leishmania (Leishmania) amazonensis* isolates that caused different clinical frames in humans and dogs: a systematic review, *Acta Trop.* 221 (2021), 106018.

- [8] E.K. Elmahallawy, A. Agil, Treatment of leishmaniasis: a review and assessment of recent research, *Curr. Pharm. Des.* 21 (2015) 2259–2275.
- [9] A. Ponte-Sucré, F. Gamarro, J.C. Dujardin, M.P. Barrett, R. López-Vélez, R. García-Hernández, A.W. Pountain, R. Mwenechanya, B. Papadopolou, Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: a 21st century challenge, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017) e0006052.
- [10] D.W. Warnock, Amphotericin B: an introduction, *J. Antimicrob. Chemother.* 28 (1991) 27–38.
- [11] M.A. Ch´avez-Fumagalli, T.G. Ribeiro, R.O. Castilho, S.O. Fernandes, V.N. Cardoso, C.S. Coelho, D.V. Mendonça, M. Soto, C.A. Tavares, A.A. Faraco, E.A. Coelho, New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48 (2015) 235–242.
- [12] C. Rodrigo, P. Weeratunga, S.D. Fernando, S. Rajapakse, Amphotericin B for treatment of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of prospective comparative clinical studies including dose-ranging studies, *Clin. Microbiol. Infect.* 24 (2018) 591–598.
- [13] J.S. Lanza, S. Pomel, P.M. Loiseau, F. Fr´ezard, Recent advances in amphotericin B delivery strategies for the treatment of leishmaniasis, *Expert Opin. Drug Deliv.* 16 (2019) 1063–1079.
- [14] P. Minodier, K. Retornaz, A. Horelt, J.M. Garnier, Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients, *Fund. Clin. Pharmacol.* 17 (2003) 183–188.
- [15] M.R. Shirzadi, Liposomal amphotericin B: a review of its properties, function, and use for treatment of cutaneous leishmaniasis, *Res. Rep. Trop. Med.* 10 (2019) 11–18.
- [16] K.H. Bleicher, H.-J. Böhm, K. Müller, A.I. Alanine, Hit and lead generation: beyond high-throughput screening, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (2003) 369–378.
- [17] J.P. Hughes, S.S. Rees, S.B. Kalindjian, K.L. Philpott, Principles of early drug discovery, *Br. J. Pharmacol.* 162 (2011) 1239–1249.
- [18] V.V. Andrade-Neto, E.F. Cunha-Junior, V. Santos-Faioes, T.M. Pereira, R.L. Silva, L. L. Leon, E.C. Torres-Santos, Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing, *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 23 (2018) 967–996.
- [19] H. Martinez-Rojano, J. Mancilla-Ramirez, L. Quiñonez-Díaz, N. Galindo-Sevilla, Activity of hydroxyurea against *Leishmania mexicana*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) 3642–3647.
- [20] S. Kaur, H. Sachdeva, S. Dhuria, M. Sharma, T. Kaur, Antileishmanial effect of cisplatin against murine visceral leishmaniasis, *Parasitol. Int.* 59 (2010) 62–69.
- [21] T.A.R. Reis, J.A. Oliveira-da-Silva, G.S.V. Tavares, D.V.C. Mendonça, C.S. Freitas, R.R. Costa, D.P. Lage, V.T. Martins, A.S. Machado, F.F. Ramos, A.M. Silva, F.

- Ludolf, L.M.R. Antinarelli, R.C.F. Brito, M.A. Ch'avez-Fumagalli, M.V. Humbert, B.M. Roatt, E.S. Coimbra, E.A.F. Coelho, Ivermectin presents effective and selective antileishmanial activity in vitro and in vivo against *Leishmania infantum* and is therapeutic against visceral leishmaniasis, *Exp. Parasitol.* 221 (2020), 108059.
- [22] E.A. Coelho, C.A.P. Tavares, F.A.A. Carvalho, K.F. Chaves, K.N. Teixeira, R. C. Rodrigues, H. Charest, G. Matlashewski, R.T. Gazzinelli, A.P. Fernandes, Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection, *Infect. Immun.* 71 (2003) 3988–3994.
- [23] D.V.C. Mendonça, V.T. Martins, D.P. Lage, D.S. Dias, P.A.F. Ribeiro, A.M.R. S. Carvalho, A.L.T. Dias, C.K. Miyazaki, D. Menezes-Souza, B.M. Roatt, C.A. P. Tavares, J.M. Barichello, M.C. Duarte, E.A.F. Coelho, Comparing the therapeutic efficacy of different amphotericin B-carrying delivery systems against visceral leishmaniasis, *Exp. Parasitol.* 186 (2018) 24–35.
- [24] D.V.C. Mendonça, G.S.V. Tavares, D.P. Lage, T.G. Soyer, L.M. Carvalho, D.S. Dias, P.A.F. Ribeiro, F.M. Ottoni, L.M.R. Antinarelli, D.L. Vale, F. Ludolf, M.C. Duarte, E. S. Coimbra, M.A. Ch'avez-Fumagalli, B.M. Roatt, D. Menezes-Souza, J. M. Barichello, R.J. Alves, E.A.F. Coelho, In vivo antileishmanial efficacy of a naphthoquinone derivate incorporated into a Pluronic® F127-based polymeric micelle system against *Leishmania amazonensis* infection, *Biom. Pharmacol.* 109 (2019) 779–787.
- [25] J.M. Barichello, M. Morishita, K. Takayama, T. Nagai, Absorption of insulin from pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats, *Int. J. Pharm.* 184 (1999) 189–198.
- [26] G.S.V. Tavares, D.V.C. Mendonça, C.K. Miyazaki, D.P. Lage, T.G. Soyer, L. M. Carvalho, F.M. Ottoni, D.S. Dias, P.A.F. Ribeiro, L.M.R. Antinarelli, F. Ludolf, M. C. Duarte, E.S. Coimbra, M.A. Ch'avez-Fumagalli, B.M. Roatt, D. Menezes-Souza, J. M. Barichello, R.J. Alves, E.A.F. Coelho, A Pluronic® F127-based polymeric micelle system containing an antileishmanial molecule is immunotherapeutic and effective in the treatment against *Leishmania amazonensis* infection, *Parasitol. Int.* 68 (2019) 63–72.
- [27] A. Giulietti, L. Overbergh, D. Valckx, B. Decallonne, R. Bouillon, C. Mathieu, An overview of Real-Time Quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression, *Methods* 25 (2001) 386–401.
- [28] D.P. Lage, D.L. Vale, F.P. Linhares, C.S. Freitas, A.S. Machado, J.M.O. Cardoso, D. Oliveira, N.C. Galvani, M.P. Oliveira, J.A. Oliveira-da-Silva, F.F. Ramos, G.S. V. Tavares, F. Ludolf, R.S. Bandeira, I.A.G. Pereira, M.A. Ch'avez-Fumagalli, B. M. Roatt, R.A. Machado-de-Avila, M. Christodoulides, E.A.F. Coelho, V.T. Martins, A recombinant chimeric protein-based vaccine containing T-cell epitopes from amastigote proteins and combined with distinct adjuvants, induces immunogenicity and protection against *Leishmania infantum* infection, *Vaccines (Basel)*. 10 (2022) 1146.

- [29] A.S. Machado, D.P. Lage, D.L. Vale, C.S. Freitas, F.P. Linhares, J.M.O. Cardoso, J. A. Oliveira-da-Silva, I.A.G. Pereira, F.F. Ramos, G.S.V. Tavares, F. Ludolf, R. S. Bandeira, L.G.N. Maia, D. Menezes-Souza, M.C. Duarte, M.A. Ch´avez-Fumagalli, B.M. Roatt, M. Christodoulides, V.T. Martins, E.A.F. Coelho, Leishmania LiHyC protein is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis, *Parasite Immunol.* 44 (2022) e12921.
- [30] E.O. Omondi, T.O. Orwa, F. Nyabadza, Application of optimal control to the onchocerciasis transmission model with treatment, *Math. Biosci.* 297 (2018) 43–57.
- [31] S.A. Repetto, P. Ruybal, E. Batalla, C. L´opez, V. Fridman, M. Sierra, M. Radisic, P. M. Bravo, M.G. Risso, S.M.G. Cappa, C.D.A. Soto, Strongyloidiasis outside endemic areas: long-term parasitological and clinical follow-up after ivermectin treatment, *Clin. Infect. Dis.* 66 (2018) 1558–1565.
- [32] R. Speare, D. Durrheim, Mass treatment with ivermectin: an underutilized public health strategy, *Bull. World Health Organ.* 82 (2004) 562.
- [33] R.R. Costa, J.A. Oliveira-da-Silva, T.A.R. Reis, G.S.V. Tavares, D.V.C. Mendonça, C. S. Freitas, D.P. Lage, V.T. Martins, L.M.R. Antinarelli, A.S. Machado, R.S. Bandeira, F. Ludolf, T.T.O. Santos, R.C.F. Brito, M.V. Humbert, D. Menezes-Souza, M. C. Duarte, M.A. Ch´avez-Fumagalli, B.M. Roatt, E.S. Coimbra, E.A.F. Coelho, Acarbose presents in vitro and in vivo antileishmanial activity against *Leishmania infantum* and is a promising therapeutic candidate against visceral leishmaniasis, *Med. Microbiol. Immunol.* 210 (2021) 133–147.
- [34] T.G. Ribeiro, J.R. Franca, L.L. Fuscaldi, M.L. Santos, M.C. Duarte, P.S. Lage, V. T. Martins, L.E. Costa, S.O. Fernandes, V.N. Cardoso, R.O. Castilho, M. Soto, C. A. Tavares, A.A. Faraco, E.A. Coelho, M.A. Ch´avez-Fumagalli, An optimized nanoparticle delivery system based on chitosan and chondroitin sulfate molecules reduces the toxicity of amphotericin B and is effective in treating tegumentary leishmaniasis, *Int. J. Nanomedicine.* 9 (2014) 5341–5353.
- [35] J. Langedijk, A.K. Mantel-Teeuwisse, D.S. Slijkerman, M.H. Schutjens, Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature, *Drug Discov. Today.* 20 (2015) 1027–1034.
- [36] S. Pushpakom, F. Iorio, P.A. Eyers, K.J. Escott, S. Hopper, A. Wells, A. Doig, T. Guilleams, J. Latimer, C. Mc Namee, A. Norris, P. Sanseau, D. Cavalla, M. Pirmohamed, Drug repurposing: progress, challenges and recommendations, *Nat. Rev. Drug Discov.* 18 (2019) 41–58.
- [37] J.P. Jourdan, R. Bureau, C. Rochais, P. Dallemagne, Drug repositioning: a brief overview, *J. Pharm. Pharmacol.* 72 (2020) 1145–1151.
- [38] V. Parvathaneni, N.S. Kulkarni, A. Muth, V. Gupta, Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process, *Drug Discov. Today.* 24 (2019) 2076–208
- [39] N. Nosengo, Can you teach old drugs new tricks? *Nature* 534 (2016) 314–316.

- [40] A.J. Toepp, C.A. Petersen, The balancing act: immunology of leishmaniosis, *Res. Vet. Sci.* 130 (2020) 19–25.
- [41] P. Mansueto, G. Vitale, G. Di Lorenzo, G.B. Rini, S. Mansueto, E. Cillari, Immunopathology of leishmaniasis: an update, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 20 (2007) 435–445.
- [42] M. Podinovskaia, A. Descoteaux, Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction, *Fut. Microbiol.* 10 (2015) 111–129. [43] A. Kharazmi, K. Kemp, A. Ismail, S. Gasim, A. Gaafar, J.A. Kurtzhals, A.M. El Hassan, T.G. Theander, M. Kemp, T-cell response in human leishmaniasis, *Immunol. Lett.* 65 (1999) 105–108.
- [44] G. Chouhan, M. Islamuddin, M.Y. Want, H.A. Ozbak, H.A. Hemeg, D. Sahal, F. Afrin, Leishmanicidal activity of *Piper nigrum* bioactive fractions is interceded via apoptosis *in vitro* and substantiated by Th1 immunostimulatory potential *in vivo*, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 1368.
- [45] L.M.R. Antinarelli, N. Glanzmann, D.V.C. Mendonça, D.P. Lage, J.A. Oliveira-da-Silva, G.S.V. Tavares, A.M.R.S. Carvalho, C.S. Freitas, V.T. Martins, M.C. Duarte, D. Menezes-Souza, A.D. Silva, E.A.F. Coelho, E.S. Coimbra, Parasitological and immunological evaluation of a quinoline derivative salt incorporated into a polymeric micelle formulation against *Leishmania infantum* infection, *Parasitol. Res.* 121 (2022) 2129–2140.
- [46] T.G. Nascimento, P.F. Silva, L.F. Azevedo, L.G. Rocha, I.C.M. Porto, E. Lima, T. F. Moura, I.D. Basílio-Júnior, L.A. Grillo, C.B. Dornelas, E.J. Fonseca, E.J. Oliveira, A.T. Zhang, D.G. Watson, Polymeric nanoparticles of brazilian red propolis extract: preparation, characterization, antioxidant and leishmanicidal activity, *Nanoscale Res. Lett.* 11 (2016) 301.
- [47] A. Riezk, K. Van Bocxlaer, V. Yardley, S. Murdan, S.L. Croft, Activity of amphotericin B-loaded chitosan nanoparticles against experimental cutaneous leishmaniasis, *Molecules* 25 (2020) 4002.
- [48] N. Bruni, B. Stella, L. Giraudo, C. Della Pepa, D. Gastaldi, F. Dosio, Nanostructured delivery systems with improved leishmanicidal activity: a critical review, *Int. J. Nanomed.* 12 (2017) 5289–5311.
- [49] J. Puig-Rigall, C. Fern´andez-Rubio, J. Gonz´alez-Benito, J.E. Houston, A. Radulescu, P. Nguewa, G. Gonz´alez-Gaitano, Structural characterization by scattering and spectroscopic methods and biological evaluation of polymeric micelles of poloxamines and TPGS as nanocarriers for miltefosine delivery, *Int. J. Pharm.* 30 (2020), 119057.
- [50] L.M. Lage, J.M. Barichello, D.P. Lage, D.V. Mendonça, A.M. Carvalho, M. R. Rodrigues, D. Menezes-Souza, B.M. Roatt, R.J. Alves, C.A. Tavares, E.A. Coelho, M.C. Duarte, An 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system is effective for the treatment of murine tegumentary leishmaniasis, *Parasitol. Res.* 115 (2016) 4083–4095.

- [51] D.V. Mendonça, L.M. Lage, D.P. Lage, M.A. Ch'avez-Fumagalli, F. Ludolf, B. M. Roatt, D. Menezes-Souza, A.A. Faraco, R.O. Castilho, C.A. Tavares, J. M. Barichello, M.C. Duarte, E.A. Coelho, Poloxamer 407 (Pluronic®) F127)-based polymeric micelles for amphotericin B: in vitro biological activity, toxicity and in vivo therapeutic efficacy against murine tegumentary leishmaniasis, *Exp. Parasitol.* 169 (2016) 34–42.
- [52] D.V.C. Mendonça, G.S.V. Tavares, I.A.G. Pereira, J.A. Oliveira-da-Silva, F. F. Ramos, D.P. Lage, A.S. Machado, L.M. Carvalho, T.A.R. Reis, A.M.R.S. Carvalho, F.M. Ottoni, F. Ludolf, C.S. Freitas, V.T. Martins, M.A. Ch'avez-Fumagalli, M. C. Duarte, M.V. Humbert, B.M. Roatt, D. Menezes-Souza, R.J. Alves, E.A.F. Coelho, Flau-A, a naphthoquinone derivative, is a promising therapeutic candidate against visceral leishmaniasis: a preliminary study, *Exp. Parasitol.* 233 (2022), 108205.
- [53] S. Sundar, A. Singh, Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments, *Parasitology* 145 (2018) 481–489.
- [54] S. Sundar, M. Rai, Advances in the treatment of leishmaniasis, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15 (2002) 593–598.
- [55] J.K.T. Sousa, L.M.R. Antinarelli, D.V.C. Mendonça, D.P. Lage, G.S.V. Tavares, D. S. Dias, P.A.F. Ribeiro, F. Ludolf, V.T.S. Coelho, J.A. Oliveira-da-Silva, L. Perin, B. A. Oliveira, D.F. Alvarenga, M.A. Ch'avez-Fumagalli, G.C. Brandão, V. Nobre, G. R. Pereira, E.S. Coimbra, E.A.F. Coelho, A chloroquinoline derivate presents effective in vitro and in vivo antileishmanial activity against *Leishmania* species that cause tegumentary and visceral leishmaniasis, *Parasitol. Int.* 73 (2019), 101966.
- [56] M.R. Gedda, P. Madhukar, A.K. Vishwakarma, V. Verma, A.K. Kushwaha, G. Yadagiri, S.L. Mudavath, O.P. Singh, O.N. Srivastava, S. Sundar, Evaluation of safety and antileishmanial efficacy of amine functionalized carbon-based composite nanoparticle appended with amphotericin B: an in vitro and preclinical study, *Front. Chem.* 8 (2020) 510.
- [57] S. Parvez, G. Yadagiri, M.R. Gedda, A. Singh, O.P. Singh, A. Verma, S. Sundar, S. L. Mudavath, Modified solid lipid nanoparticles encapsulated with amphotericin B and paromomycin: an effective oral combination against experimental murine visceral leishmaniasis, *Sci. Rep.* 10 (2020) 12243.

6. CONCLUSÃO

Os resultados descritos neste trabalho demonstram que a Ivermectina apresenta ação *in vivo* contra o parasito *L. amazonensis*, quando administrada sob a forma livre e, principalmente, quando incorporada em sistema de *delivery* composto por micelas poliméricas de Poloxâmero P407.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar outros sistemas de *delivery* contendo IVE e comparar sua eficácia na proteção contra a LT com a composição apresentada neste trabalho.
- Realizar estudos para avaliar a eficácia terapêutica das composições micelares contendo IVE em outros modelos de mamíferos, como o hamster.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, J., Satoskar, A. R., & Russell, D. G. (1999). Leishmania species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, 112(18), 2993-3002.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DE BOER, M. *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence*. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 5, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0035671.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. *Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs*. **Nature reviews. Drug discovery**, England, v. 3, n. 8, p. 673–683, 2004. DOI: 10.1038/nrd1468.
- BARBIERI, J. S., Fuchs, B. D., Fishman, N., Cutilli, C. C., Umscheid, C. A., Kean, C., ... Kelz, R. R. (2013). The Mortality Review Committee: a novel and scalable approach to reducing inpatient mortality. **Joint Commission Journal on Quality and Patient Safety**, 39(9), 387–395.
- BARICHELO, J. M.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. *Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats*. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 184, n. 2, p. 189–198, 1999. DOI:10.1016/S0378-5173(99)00119-2.
- CABANA, A.; AT-KADI, A.; JUHÁSZ, J. *Study of the Gelation Process of Polyethylene Oxide–Polypropylene Oxide–Polyethylene Oxide Copolymer (Poloxamer 407) Aqueous Solutions*. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 190, n. 2, p. 307–312, 1997. DOI: 10.1006/jcis.1997.4880.
- CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. *et al.* *New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 235–242, 2015. DOI: 10.1590/0037-8682-0138-2015.
- CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. *et al.* *In silico Leishmania proteome mining applied to identify drug target potential to be used to treat against visceral and tegumentary leishmaniasis*. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, [S. l.], v. 87, p. 89–97, 2019. DOI: 10.1016/j.jmgm.2018.11.014.
- CHEUKA, P. M.; MAYOKA, G.; MUTAI, P.; CHIBALE, K. *The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases*. **Molecules**, [S. l.], v. 22, n. 1, 2017. DOI: 10.3390/molecules22010058.
- COELHO, E. A. F. *et al.* *Immune responses induced by the Leishmania (Leishmania) donovani A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental Leishmania (Leishmania) amazonensis infection*. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 71, n. 7, p. 3988–3994, 2003. DOI: 10.1128/IAI.71.7.3988.
- CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. *Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs*. **Trends in parasitology**, [S. l.], v. 19, n. 11, p. 502–8, 2003. DOI: 10.1016/j.pt.2003.09.008.

CRUMP, Andy; OMURA, Satoshi. Ivermectin, ‘Wonder drug’ from Japan: the human use perspective. **Proceedings of the Japan Academy**, Series B, [S. l.], v. 87, n. 2, p. 13–28, 2011.

CRUMP, Andy. Ivermectin: enigmatic multifaceted ‘wonder’ drug continues to surprise and exceed expectations. **The Journal of Antibiotics**, [S. l.], v. 70, n. 5, p. 495–505, 2017.

DEBRAY, L.; FAUCHER, G.; DELAUNE, D.; BERTRAND, D.; RICHECOEUR, L.; MURA, M. **Parasitologie**. [s.l: s.n.]. v. 2015 DOI: 10.1016/S1773-035X(15)30165-9.

DUARTE, M. C. *et al.* Treatment of murine visceral leishmaniasis using an 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system. **Parasitology International**, [S. l.], v. 65, n. 6, p. 728–736, 2016. DOI: 10.1016/J.PARINT.2016.07.005.

DUTHIE M.S., LISON A., COURTENAY O. (2018). Advances toward diagnostic tools for managing zoonotic visceral leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, 34 (10) (2018), pp. 881-890.

EGGER, S. S.; MEIER, S.; LEU, C.; CHRISTEN, S.; GRATWOHL, A.; KRÄHENBÜHL, S.; HASCHKE, M. *Drug interactions and adverse events associated with antimycotic drugs used for invasive aspergillosis in hematopoietic SCT*. **Bone Marrow Transplantation**, [S. l.], v. 45, n. 7, p. 1197–1203, 2010. DOI: 10.1038/bmt.2009.325.

FOUCAULF, C.; RANQUE, S.; BADIAGA, S.; ROVERY, C.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Oral ivermectin in the treatment of body lice. **Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 193, n. 3, p. 474–476, 2006.

FREITAS-JUNIOR, L. H., CHATELAIN, E., KIM, H. A., & SIQUEIRA-NETO, J. L. (2012). Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 2, 11-19.

GOMES, C. M., PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L., & GUIMARÃES, F. S. (2014). IL-10 production by T lymphocytes from patients with cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Parasite Immunology**, 36(4), 161-169.

GRAMICCIA, M., & GRADONI, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, 35(11–12), 1169–1180.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. *Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids*. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90118-X.

HANDMAN, E. (2001). Cell biology of *Leishmania*. **Journal of Cell Science**, 114(1), 15-24.

HERWALDT, B. L. *Leishmaniasis*. **Lancet (London, England)**, [S. l.], v. 354, n. 9185, p. 1191–9, 1999. DOI: 10.1016/S0140-6736(98)10178-2.

HUFFAM, Sarah E.; CURRIE, Bart J. Ivermectin for *Sarcoptes scabiei* hyperinfestation. **International Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 152–154, 1998.

KILLICK-KENDRICK, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, 17(3), 279-289.

- KHAMESJPOUR, A., RAFATI, S., DAVOUDI, N., MABOUDI, F., & MODABBER, F. (2006). Leishmaniasis vaccine development: to where? **Human Vaccines**, 2(4), 156-162.
- LESSA, H. A., LESSA, M. M., GUIMARÃES, L. H., LIMA, C. M., ARRUDA, S., & MACHADO, P. R. (2007). Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, 73(6), 843-847.
- LIESE, J., SCHLEICHER, U., & BOGDAN, C. (2008). The innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunobiology**, 213(3-4), 377-387.
- LÓPEZ-OLVERA, J. R.; HÖFLE, U.; VICENTE, J.; FERNÁNDEZ-DE-MERA, I. G.; GORTÁZAR, C.. Effects of parasitic helminths and ivermectin treatment on clinical parameters in the European wild boar (*Sus scrofa*). **Parasitology Research**, [S. l.], v. 98, n. 6, p. 582–587, 2006.
- MARTINS, V. T. *et al.* *Antigenicity and Protective Efficacy of a Leishmania Amastigote-specific Protein, Member of the Super-oxygenase Family, against Visceral Leishmaniasis.* **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. e2148, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002148.
- MARTINS, V. T. *et al.* *Correction: Antigenicity, Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in the Promastigote and Amastigote Stages of Leishmania infantum against Visceral Leishmaniasis.* **PLOS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. e0141496, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0141496.
- MARTINS, L. *et al.* *An 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system is effective for the treatment of murine tegumentary leishmaniasis.* **Parasitology Research**, [S. l.], p. 4083–4095, 2016. DOI: 10.1007/s00436-016-5181-4.
- MENDONÇA, D. V. C. *et al.* *Poloxamer 407 (Pluronic® F127)-based polymeric micelles for amphotericin B: In vitro biological activity, toxicity and in vivo therapeutic efficacy against murine tegumentary leishmaniasis.* **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 169, p. 34–42, 2016. DOI: 10.1016/J.EXPPARA.2016.07.005.
- MENDONÇA, D. V. C. *et al.* *Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of Leishmania infantum and Leishmania amazonensis and its mechanism of action against L. amazonensis species.* **Parasitology research**, Germany, v. 117, n. 2, p. 391–403, 2019. DOI: 10.1007/s00436-017-5713-6.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar. Brasília-DF (2017) Disponível em: <http://vigilancia.saude.mg.gov.br/index.php/download/manual-de-vigilancia-da-leishmaniose-tegumentar/> . Acesso em: 30 set. 2024.
- MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 150–158, 2007.
- MOUGNEAU, E., BIHL, F., & GLAICHENHAUS, N. (2011). Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunological Reviews**, 240(1), 286-296.
- MURRAY, H. W., BERMAN, J. D., DAVIES, C. R., & SARAIVA, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, 366(9496), 1561-1577.
- NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. a O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. *Atividade antileishmania do extrato*

hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de Piper regnellii (Miq.) C. DC. var. pallescens (C. DC.) Yunck. Revista Brasileira de Farmacognosia, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 61–66, 2006. DOI: 10.1590/s0102-695x2006000100011.

NANA-DJEUNGA, Hugues C. et al. Reproductive Status of *Onchocerca volvulus* after Ivermectin Treatment in an Ivermectin-Naïve and a Frequently Treated Population from Cameroon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. e2824, 2014.

NOFAL, A. Variable response of crusted scabies to oral ivermectin: report on eight Egyptian patients. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [S. l.], v. 23, n. 7, p. 793–797, 2009.

NOFAL, Ahmad. Orales Ivermectin gegen Kopfläuse: ein Vergleich mit 0,5% topischer Malathionlotion. JDDG: **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. 985–989, 2010.

NYLEN, S., & SACKS, D. (2007). Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, 28(9), 378-384.

OMURA, 2016

OPAS. 57º Conselho Diretor. 71º Sessão do Comitê Regional da OMS para as Américas. Resolução CD57.R7, de 01 de outubro de 2019. Iniciativa da OPAS de Eliminação de Doenças: Política para um enfoque integrado e sustentável visando as doenças transmissíveis nas Américas. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, 2019.

OPAS, Organización Panamericana de la Salud, 2019. **Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: www.paho.org. Acesso em: 30 set. 2023.

OPAS, Organización Panamericana de la Salud, 2021. **Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas, Nº10** (December 2021). [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55368> . Acesso em: 30 set. 2023.

OSORIO, J.; MONCADA, L.; MOLANO, A.; VALDERRAMA, S.; GUALTERO, S.; FRANCO-PAREDES, C. Role of Ivermectin in the Treatment of Severe Orbital Myiasis Due to *Cochliomyia hominivorax*. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 43, n. 6, p. e57–e59, 2006.

OTTESEN, E. A.; HOOPER, P. J.; BRADLEY, M.; BISWAS, G. The Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: Health Impact after 8 Years. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 2, n. 10, p. e317, 2008.

PAHO. *Epidemiological Report of the Americas. Report Leishmaniasis*, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 2–5, 2019. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50505%0Ahttp://new.paho.org/leishmaniasis>.

PANDEY, Triptesh Raj; SHRESTHA, Gulshan Bahadur; SITAULA, Ranju Kharel; SHAH, Dev Narayan. A Case of Orbital Myiasis in Recurrent Eyelid Basal Cell Carcinoma Invasive into the Orbit. **Case reports in ophthalmological medicine**, [S. l.], v. 2016, p. 2904346, 2016.

PARISER, D. M.; MEINKING, T. L.; RYAN, W. G. The authors reply. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 368, n. 10, p. 967, 2013.

PISAL, Sambhaji S.; PARADKAR, Anant R.; MAHADIK, Kakasaheb R.; KADAM, Shivajirao S. Pluronic gels for nasal delivery of Vitamin B12. Part I: Preformulation study. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 270, n. 1–2, p. 37–45, 2004.

REIS, Thiago A.R. *et al.* Ivermectin presents effective and selective antileishmanial activity in vitro and in vivo against *Leishmania infantum* and is therapeutic against visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 221, n. July 2020.

REITHINGER, R., & DUJARDIN, J. C. (2007). Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, 45(1), 21–25.

REITHINGER, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, 7(9), 581–596.

RIBEIRO, T. G.; *et al.*; *Novel targeting using nanoparticles: an approach to the development of an effective anti-leishmanial drug-delivery system.* **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v.9, p. 877–890, 2014. DOI: 10.2147/IJN.SS5678.

RIJAL, S., OSTYN, B., URANW, S., RAJ, K., BHATTARAI, N. R., DORLO, T. P. C., ... & KOIRALA, S. Increasing failure of miltefosine in the treatment of kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. **Clinical Infectious Diseases**, 56(11), (2013), 1530–1538.

RODRIGUES, V.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; LAFORGE, M.; SILVESTRE, R.; ESTAQUIER, J.. *Regulation of immunity during visceral Leishmania infection.* **Parasites and Vectors**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–13, 2016. DOI: 10.1186/s13071-016-1412-x.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N.. *The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice.* **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 2, n. 11, p. 845–858, 2002. DOI: 10.1038/nri933.

SAJID, M. S.; IQBAL, Z.; MUHAMMAD, G.; SANDHU, M. A.; KHAN, M. N.; SAQIB, M.; IQBAL, M. U. Effect of ivermectin on the cellular and humoral immune responses of rabbits. **Life Sciences**, [S. l.], v. 80, n. 21, p. 1966–1970, 2007.

SALLUH, J. I. F.; FERES, G. A.; VELASCO, E.; HOLANDA, G. S.; TOSCANO, L.; SOARES, M. Successful use of parenteral ivermectin in an immunosuppressed patient with disseminated strongyloidiasis and septic shock. **Intensive Care Medicine**, [S. l.], v. 31, n. 9, p. 1292, 2005.

SATOU, T.; KOGA, M.; KOIKE, K.; TADA, I.; NIKAIDO, T. Nematocidal activities of thiabendazole and ivermectin against the larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 99, n. 4, p. 311–322, 2001.

SHINOHARA, E. H.; MARTINI, M. Z.; OLIVEIRA NETO, H. G.; TAKAHASHI, A. Oral myiasis treated with ivermectin: case report. **Brazilian Dental Journal**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 79–81, 2004.

SHOHEIB, Z.; ASHOUR, D.; SOLIMAN, N.; SHAFIK, N. Infectivity of Ivermectin-Treated *Trichinella spiralis* Larvae: A New Challenge for Control. **Parasitologists United Journal**, [S. l.], v. 6, p. 193–204, 2013.

SOLIMAN, G. A.; TAHER, E. S.; MAHMOUD, M. A. Therapeutic efficacy of Ivermectin, Ivermectin and Levamisole against different stages of *Trichinella spiralis* in rats. **Türkiye**

parazitolojii dergisi / Türkiye Parazitoloji Derneği = Acta parasitologica Turcica / Turkish Society for Parasitology, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 86–91, 2011.

STRYCHARZ, J. P.; BERGE, N. M.; ALVES, A. M.; CLARK, J. M. Ivermectin acts as a posteclosion nymphicide by reducing blood feeding of human head lice (Anoplura: Pediculidae) that hatched from treated eggs. **Journal of Medical Entomology**, [S. l.], v. 48, n. 6, p. 1174–1182, 2011.

SUNDAR, S., & CHAKRAVARTY, J. (2013). An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, 14(1), 53-63.

TARR, P. E.; MIELE, P. S.; PEREGOY, K. S.; SMITH, M. A.; NEVA, F. A.; LUCEY, D. R. Case report: Rectal administration of ivermectin to a patient with Strongyloides hyperinfection syndrome. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 68, n. 4, p. 453–455, 2003.

TAVARES, G. S. V. *et al.* Parasitology International A Pluronic® F127-based polymeric micelle system containing an antileishmanial molecule is immunotherapeutic and effective in the treatment against Leishmania amazonensis infection. **Parasitology International**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 63–72, 2019. DOI: 10.1016/j.parint.2018.10.005.

TIUMAN, Tatiana S. *et al.* Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. e525–e532, 2011.

TRAORE, M. O. *et al.* Proof-of-Principle of Onchocerciasis Elimination with Ivermectin Treatment in Endemic Foci in Africa: Final Results of a Study in Mali and Senegal. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 6, n. 9, p. e1825, 2012.

VÉLEZ, I. D.; COLMENARES, L. M.; MUÑOZ, C. A. *Two cases of visceral leishmaniasis in Colombia resistant to meglumine antimonial treatment.* **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S. l.], v. 51, n. 4, p. 231–236, 2009. DOI: 10.1590/S0036-46652009000400011.

VON STEBUT, E.; UDEY, M. C. *Requirements for Th1-dependent immunity against infection with Leishmania major.* **Microbes and Infection**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. 1102–1109, 2004. DOI: 10.1016/J.MICINF.2004.05.024.

VYAS, S.; GUPTA, S. *Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification.* **International journal of nanomedicine**, [S. l.], v. 1, p. 417–432, 2006. DOI: 10.2147/nano.2006.1.4.417.

VYAS, S. P., & GUPTA, S.. Implication of nanoparticles/microparticles in drug delivery to leishmaniasis. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, 2(3), 235-258, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010. Control of the Leishmaniasis: **WHO TRS N°949**. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-TRS-949> . Acesso em: 6 fev. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018. **Leishmaniasis. Overview**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1 . Acesso em: 30 set. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023. **Leishmaniasis. Key Facts**, 375. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> .Acesso em: 30 set. 2023.

WOLSTENHOLME, A. J.; MACLEAN, M. J.; COATES, R.; MCCOY, C. J.; REAVES, Barbara J. How do the macrocyclic lactones kill filarial nematode larvae? **Invertebrate Neuroscience**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 7, 2016.

XUE, H.; LI, J.; XIE, H.; WANG, Y. *Review of Drug Repositioning Approaches and Resources*. **International Journal of Biological Sciences**. [S. l.], v. 14, 2018. DOI: 10.7150/ijbs.24612.

YATES, D. M.; WOLSTENHOLME, A. J. An ivermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel subunit from *Dirofilaria immitis*. **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 34, n. 9, p. 1075–1081, 2004.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação de agentes imunoterápicos in vitro e in vivo contra leishmanioses", protocolo do CEUA: 56/2022 sob a responsabilidade de Eduardo Antonio Ferraz Coelho que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 27/06/2022.

Vigência da Autorização	27/06/2022 a 26/06/2027
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do ICB/ UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do ICB/ UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do ICB/ UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do ICB/ UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)

Sexo	feminino
Origem	Biotéiro do ICB/ UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotéiro do ICB/ UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotéiro do ICB/ UFMG

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	64
Idade	8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotéiro do ICB/ UFMG

Considerações posteriores:

27/06/2022	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 27/06/2022. Validade: 27/06/2022 à 26/06/2027.
------------	---

Belo Horizonte, 18/10/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br

APÊNDICES

Artigos de primeira autoria

Publicação do artigo científico intitulado “*In vitro* evaluation of antileishmanial activity, mode of action and cellular response induced by vanillin synthetic derivatives against *Leishmania* species able to cause cutaneous and visceral leishmaniasis”

Experimental Parasitology 251 (2023) 108555



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr



In vitro evaluation of antileishmanial activity, mode of action and cellular response induced by vanillin synthetic derivatives against *Leishmania* species able to cause cutaneous and visceral leishmaniasis

Camila S. Freitas^a, Samira S. Santiago^b, Daniela P. Lage^a, Luciana M.R. Antinarelli^c, Fabrício M. Oliveira^d, Danniele L. Vale^a, Vivian T. Martins^a, Lícia N.D. Magalhaes^a, Raquel S. Bandeira^a, Fernanda F. Ramos^a, Isabela A.G. Pereira^a, Marcelo M. de Jesus^a, Fernanda Ludolf^a, Grasielle S.V. Tavares^a, Adilson V. Costa^e, Rafaela S. Ferreira^f, Elaine S. Coimbra^c, Róbson R. Teixeira^{b,1}, Eduardo A.F. Coelho^{a,g,*,1}

^a Programa de Pós-Graduação Em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos, Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs S/N, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^c Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

^d Instituto Federal de Educação de Minas Gerais, Rua Afonso Sardinha 90, Bairro Pioneiros, 36420-000, Ouro Branco, Minas Gerais, Brazil

^e Departamento de Química e Física, Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/n Guararema, 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brazil

^f Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^g Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Leishmaniasis
Treatment
Vanillin
Amphotericin B
Toxicity
Immune response

ABSTRACT

The treatment against leishmaniasis presents problems, mainly due to their toxicity of the drugs, high cost and/or by the emergence of parasite resistant strains. In this context, new therapeutics should be searched. In this study, two novel synthetic derivatives from vanillin: [4-(2-hydroxy-3-(4-octyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propoxy)-3-methoxybenzaldehyde] or 3s and [4-(3-(4-decyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-hydroxypropoxy)-3-methoxybenzaldehyde] or 3t, were evaluated regarding their antileishmanial activity against distinct parasite species able to cause cutaneous and visceral leishmaniasis. Results showed that compounds 3s and 3t were effective against *Leishmania infantum*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis* promastigote and amastigote-like forms, showing selectivity index (SI) of 25.1, 18.2 and 22.9, respectively, when 3s was used against promastigotes, and of 45.2, 7.5 and 15.0, respectively, against amastigote-like stage. Using the compound 3t, SI values were 45.2, 53.0 and 80.0, respectively, against promastigotes, and of 35.9, 46.0 and 58.4, respectively, against amastigote-like forms. Amphotericin B (AmpB) showed SI values of 5.0, 7.5 and 15.0, respectively, against promastigotes, and of 3.8, 5.0 and 7.5, respectively, against amastigote-like stage. The treatment of infected macrophages and inhibition of the infection upon pre-incubation with the molecules showed that they were effective in reducing the infection degree and inhibiting the infection in pre-incubated parasites, respectively, as compared to data obtained using AmpB. The mechanism of action of 3s and 3t was evaluated in *L. infantum*, revealing that both 3s and 3t altered the parasite mitochondrial membrane potential leading to reactive oxygen species production, increase in lipid corps and changes in the cell cycle, causing the parasite' death. A preliminary assay using the cell culture supernatant from treated and infected macrophages showed that 3s and 3t induced higher IL-12 and lower IL-10 values; suggesting the development of an *in vitro* Th1-type response in the treated cells. In this context, data

* Corresponding author. Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br (E.A.F. Coelho).

¹ Co-senior authors.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108555>

Received 27 December 2022; Received in revised form 15 May 2023; Accepted 26 May 2023

Available online 27 May 2023

0014-4894/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

Publicação do artigo científico intitulado “New synthetic molecules incorporated into polymeric micelles used for treatment against visceral leishmaniasis”

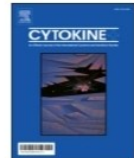
Cytokine 177 (2024) 156543



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytokine



New synthetic molecules incorporated into polymeric micelles used for treatment against visceral leishmaniasis

Camila S. Freitas^a, Isabela A.G. Pereira^a, Daniela P. Lage^a, Danniele L. Vale^a, Breno L. Pimenta^a, Nícia P. Soares^b, Samira S. Santiago^c, Vívian T. Martins^a, Raquel S.B. Câmara^a, Marcelo M. Jesus^a, Grasielle S.V. Tavares^a, Fernanda F. Ramos^a, Fernanda Ludolf^{a,d}, Lícia N.D. Magalhães^a, Fabrício M. Oliveira^e, Mariana C. Duarte^{a,f}, Miguel A. Chávez-Fumagalli^g, Adilson V. Costa^h, Bruno M. Roatt^b, Róbson R. Teixeira^c, Eduardo A.F. Coelho^{a,f,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia, 30130-100 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

^c Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos, Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs, S/N, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-110, Minas Gerais, Brazil

^e Instituto Federal de Educação de Minas Gerais, Rua Afonso Sardinha, 90, Bairro Pioneiros, 36420-000 Ouro Branco, Minas Gerais, Brazil

^f Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^g Computational Biology and Chemistry Research Group, Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, Peru

^h Departamento de Química e Física, Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, s/n, Guararema, 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Treatment
Visceral leishmaniasis
Synthetic molecules
Vanillin
Polymeric micelles

ABSTRACT

Treatment against visceral leishmaniasis (VL) presents problems, mainly related to drug toxicity, high cost and/or by emergence of resistant strains. In the present study, two vanillin synthetic derivatives, 3 s [4-(2-hydroxy-3-(4-octyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propoxy)-3-methoxybenzaldehyde] and 3 t [4-(3-(4-decyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-hydroxypropoxy)-3-methoxybenzaldehyde], were evaluated as therapeutic candidates in a murine model against *Leishmania infantum* infection. Molecules were used pure (3 s and 3 t) or incorporated into Poloxamer 407-based micelles (3 s/M and 3 t/M) in the infected animals, which also received amphotericin B (AmpB) or Ambisome® as control. Results showed that 3 s/M and 3 t/M compositions induced a Th1-type immune response in treated animals, with higher levels of IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-12, nitrite, and IgG2a antibodies. Animals presented also low toxicity and significant reductions in the parasite load in their spleens, livers, bone marrows and draining lymph nodes, as compared as control groups mice, with the evaluations performed one and 30 days after the application of the therapeutics. In conclusion, preliminary data suggest that 3 s/M and 3 t/M could be considered for future studies as therapeutic agents against VL.

1. Introduction

Leishmaniasis are tropical diseases endemic in 98 countries, with 12 million people clinically affected [55]. Visceral leishmaniasis (VL) is the more severe clinic form of this disease complex, and it has a 95 % fatality

rate in acute and untreated cases, with an estimated incidence of about 0.5 million new cases annually [4]. The causative agents of the VL are the *Leishmania donovani* and *L. infantum* species [29]. *L. donovani* is found in East-Africa, India and parts of the Middle East. *L. infantum* is the main etiological agent of VL in the New World, causing the disease in

* Corresponding author at: Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30.130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br (E.A.F. Coelho).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2024.156543>

Received 19 December 2023; Received in revised form 30 January 2024; Accepted 6 February 2024

Available online 18 February 2024

1043-4666/© 2024 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Demais trabalhos publicados durante o doutorado

- 1) S. SANTIAGO, SAMIRA ; **S. FREITAS, CAMILA** ; V. COSTA, ADILSON ; B. DE OLIVEIRA, MARIANA ; F. C. FARIA, AIDENE ; S. BELARMINO, WILLIAM ; F. MOURA, GISELY ; A. DOS SANTOS, NAYARA ; ROMÃO, WANDERSON ; LACERDA JÚNIOR, VALDEMAR ; M. DE OLIVEIRA, FABRÍCIO ; V. OLIVEIRA, OSMAIR ; A. F. COELHO, EDUARDO ; R. TEIXEIRA, RÓBSON . Synthesis, Antileishmanial Activity, and in silico Study of 2-Hydroxy-3-(1,2,3-triazolyl)propyl Vanillin Derivatives. JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY, v. 36, p. 5, 2025.
- 2) PEREIRA, ISABELA A.G. ; **FREITAS, C. S.** ; CÂMARA, RAQUEL S.B. ; JESUS, MARCELO M. ; LAGE, DANIELA P. ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; SOYER, TAUANE G. ; RAMOS, F. F. ; SOARES, NÍCIA P. ; SANTIAGO, SAMIRA S. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; VALE, DANNIELE L. ; PIMENTA, BRENO L. ; Ludolf, F. ; OLIVEIRA, FABRÍCIO M. ; DUARTE, MARIANA C. ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; COSTA, ADILSON V. ; GONÇALVES, DENISE U. ; ROATT, BRUNO M. ; et.al . Treatment using vanillin-derived synthetic molecules incorporated into polymeric micelles is effective against infection caused by Leishmania amazonensis species. EXPERIMENTAL PARASITOLOGY, v. -, p. 108743, 2024.
- 3) CARPINTER, BÁRBARA ALBUQUERQUE ; RENHE, DANIELA CHAVES ; BELLEI, JÉSSICA CORREA BEZERRA ; VIEIRA, CAROLINA DAVID ; RODOLPHI, CINTHIA MAGALHÃES ; RANGEL-FERREIRA, MARCOS VINICIUS ; **DE FREITAS, CAMILA SIMÕES** ; NETO, ADOLFO FIRMINO DA SILVA ; COELHO, EDUARDO ANTÔNIO FERRAZ ; MIETTO, BRUNO DE SIQUEIRA ; GOMES, FLÁVIA LIMA RIBEIRO ; ROCHA, VINICIUS NOVAES ; SCOPEL, KÉZIA KATIANI GORZA . DHA-rich fish oil plays a protective role against experimental cerebral malaria by controlling inflammatory and mechanical events from infection. JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTR, v. 123, p. 109492, 2024.
- 4) ASSIS, BÁRBARA P.N. ; CHAVES, ANA T. ; LAGE, DANIELA P. ; CARDOSO, MARIANA M. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; CÂMARA, RAQUEL S.B. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; DE OLIVEIRA, ANA LAURA G. ; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A. ; GALDINO, ALEXSANDRO S. ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; GONÇALVES, DENISE U. ; BUENO, LÍLIAN L. ; FUJIWARA, RICARDO T. ; COELHO, EDUARDO A.F. ; DA COSTA ROCHA, MANOEL O. . Serodiagnosis of paucibacillary and multibacillary leprosy using a recombinant chimeric protein composed of specific B-cell epitopes derived from Mycobacterium leprae proteins. TUBERCULOSIS, v. 147, p. 102505, 2024.
- 5) SANTANA, BIANCA DE MELO ; ARMENTANO, GIOVANA MARCHINI ; FERREIRA, DAYANA AGNES SANTOS ; **DE FREITAS, CAMILA SIMÕES** ; CARNEIRO-RAMOS, MARCELA SORELLI ; SEABRA, AMEDEA BAROZZI ; CHRISTODOULIDES, MYRON . In Vitro Bactericidal Activity of Biogenic Copper Oxide Nanoparticles for Neisseria gonorrhoeae with Enhanced Compatibility for Human Cells. ACS Applied Materials & Interfaces, v. 16, p. 21633-21642, 2024.
- 6) SOYER, TAUANE GONÇALVES ; BANDEIRA CÂMARA, RAQUEL SOARES ; PEREIRA, ISABELA AMORIM GONÇALVES ; RAMOS, FERNANDA FONSECA ; DE JESUS, MARCELO MOREIRA ; LUDOLF, FERNANDA ; DE PAULA COSTA, GUILHERME ; LAGE, DANIELA PAGLIARA ; **DE FREITAS, CAMILA SIMÕES** ; VALE, DANNIELE LUCIANA ; PIMENTA, BRENO LUIZ ; MARTINS, VÍVIAN TAMIETTI ;

- GALDINO, ALEXSANDRO SOBREIRA ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL ANGEL ; ROATT, BRUNO MENDES ; DE SOUSA VIEIRA TAVARES, GRASIELE ; COELHO, EDUARDO ANTONIO FERRAZ . Immunotherapy Combining Mimotopes Selected by Phage Display Plus Amphotericin B Is Effective for Treatment Against Visceral Leishmaniasis. *PARASITE IMMUNOLOGY*, v. 46, p. May, 2024.
- 7) KANT, RAVI; TILFORD, HANNAH; **FREITAS, CAMILA S.**; FERREIRA, DAYANA A. SANTOS; NG, JAMES; RUCINSKI, GWENNAN ; WATKINS, JOSHUA ; PEMBERTON, RYAN ; ABRAMYAN, TIGRAN M. ; CONTRERAS, STEPHANIE C. ; VERA, ALEJANDRA ; CHRISTODOULIDES, MYRON . Antimicrobial activity of compounds identified by artificial intelligence discovery engine targeting enzymes involved in *Neisseria gonorrhoeae* peptidoglycan metabolism. *BIOLOGICAL RESEARCH (ONLINE)*, v. 57, p. 62, 2024.
 - 8) CÂMARA, RAQUEL S.B. ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; LAGE, DANIELA P. ; VALE, DANNIELE L. ; LUDOLF, FERNANDA ; CARDOSO, MARIANA M ; **FREITAS, CAMILA S.** ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; ASSIS, BÁRBARA P.N. ; CHAVES, ANA T. ; PIMENTA, BRENO L. ; SILVA, MARCELA G.P. ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; GALDINO, ALEXSANDRO S. ; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; PASCOAL, VANESSA P.M. ; ELLER, MARCELA T.C. ; ROCHA, MANOEL O. DA COSTA ; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A. . Non-invasive urine-based ELISA using a recombinant *Leishmania* protein to diagnose tegumentary leishmaniasis. *ACTA TROPICA*, v. 258, p. 107326, 2024.
 - 9) CÂMARA, RAQUEL S.B. ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; LAGE, DANIELA P. ; VALE, DANNIELE L. ; LUDOLF, FERNANDA ; GALVANI, NATHÁLIA C. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; ASSIS, BÁRBARA P.N. ; CHAVES, ANA T. ; GIUSTA, MÁRIO S. ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; PEREIRA, CÉSAR N. ; GALDINO, ALEXSANDRO S. ; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; PASCOAL, VANESSA P.M. ; ELLER, MARCELA T.C. ; DA COSTA ROCHA, MANOEL O. ; CHRISTODOULIDES, MYRON . Comparison of urine and serum IgG detection ELISA for tegumentary leishmaniasis diagnosis and prognosis. *IMMUNOBIOLOGY*, v. 229, p. 152853, 2024.
 - 10) ASSIS, BÁRBARA P.N. ; CHAVES, ANA T. ; LAGE, DANIELA P. ; CARDOSO, MARIANA M. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; CÂMARA, RAQUEL S.B. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; DE OLIVEIRA, ANA LAURA G. ; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A. ; GALDINO, ALEXSANDRO S. ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; GONÇALVES, DENISE U. ; BUENO, LÍLIAN L. ; FUJIWARA, RICARDO T. ; COELHO, EDUARDO A.F. ; DA COSTA ROCHA, MANOEL O. . Serodiagnosis of paucibacillary and multibacillary leprosy using a recombinant chimeric protein composed of specific B-cell epitopes derived from *Mycobacterium leprae* proteins. *TUBERCULOSIS*, v. 147, p. 102505, 2024.
 - 11) AMARAL, MAIARA ; ROMANELLI, MAIARA M. ; ASIKI, HANNAH ; BICKER, JOANA ; LAGE, DANIELA P. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; TANIWAKI, NOEMI N. ; LAGO, JOAO HENRIQUE G. ; COELHO, EDUARDO A. F. ; FALCÃO, AMÍLCAR ; FORTUNA, ANA ; ANDERSON, EDWARD A. ; TEMPONE, ANDRE G. . Synthesis of a dehydrodieugenol B derivative as a lead compound for visceral leishmaniasis-mechanism of action and in vivo pharmacokinetic studies. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY (ONLINE)*, v. -, p. -, 2024.

- 12) SOYER, TAUANE G. ; RAMOS, F. F. ; PEREIRA, ISABELA A. G. ; LAGE, DANIELA P. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; DE JESUS, MARCELO M. ; COSTA, GUILHERME P. ; MACHADO, AMANDA S. ; **FREITAS, C. S.** ; VALE, DANNIELE L. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; GALDINO, ALEXSANDRO S. ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; MENEZES-SOUZA, DANIEL ; DUARTE, MARIANA C. ; ROATT, BRUNO M. ; COELHO, EDUARDO A. F. ; TAVARES, GRASIELE S. V. . Immunotherapy Using Immunogenic Mimotopes Selected by Phage Display plus Amphotericin B Inducing a Therapeutic Response in Mice Infected with *Leishmania amazonensis*. *PATHOGENS*, v. 12, p. 314, 2023.
- 13) LAGE, DANIELA P. ; MACHADO, AMANDA S. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; VALE, DANNIELE L. ; LINHARES, FLÁVIA P. ; CARDOSO, JAMILLE M.O. ; OLIVEIRA-DASILVA, JOÃO A. ; RAMOS, FERNANDA F. ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; LUDOLF, FERNANDA ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; OLIVEIRA, JAMIL S. ; MENEZES-SOUZA, DANIEL ; DUARTE, MARIANA C. ; GALDINO, ALEXSANDRO S. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; ROATT, BRUNO M. ; MARTINS, VÍVIAN T. . Recombinant endonuclease III protein from *Leishmania infantum* associated with Th1-type adjuvants is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. *MOLECULAR IMMUNOLOGY*, v. 155, p. 79-90, 2023.
- 14) LAGE, DANIELA P. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; VALE, DANNIELE L. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; PIMENTA, BRENO L. ; MOREIRA, GABRIEL J.L. ; RAMOS, FERNANDA F. ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; DE JESUS, MARCELO M. ; LUDOLF, FERNANDA ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; ROATT, BRUNO M. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; COELHO, EDUARDO A.F. . The association between rLiHyp1 protein plus adjuvant and amphotericin B is an effective immunotherapy against visceral leishmaniasis in mice. *ACTA TROPICA* **JCR**, v. 246, p. 106986, 2023.
- 15) VALE, DANNIELE L. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; MARTINS, VÍVIAN T. ; MOREIRA, GABRIEL J. L. ; MACHADO, AMANDA S. ; RAMOS, FERNANDA F. ; PEREIRA, ISABELA A. G. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; DE JESUS, MARCELO M. ; TAVARES, GRASIELE S. V. ; LUDOLF, FERNANDA ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; GALDINO, ALEXSANDRO S. ; FUJIWARA, RICARDO T. ; BUENO, LÍLIAN L. ; ROATT, BRUNO M. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; COELHO, EDUARDO A. F. ; LAGE, DANIELA P. . Efficacy of an Immunotherapy Combining Immunogenic Chimeric Protein Plus Adjuvant and Amphotericin B against Murine Visceral Leishmaniasis. *BIOLOGY*, v. 12, p. 851, 2023.
- 16) BARAZORDA-CCAHUANA, HARUNA LUZ ; GOYZUETA-MAMANI, LUIS DANIEL ; CANDIA PUMA, MAYRON ANTONIO ; **SIMÕES DE FREITAS, CAMILA** ; DE SOUSA VIERIA TAVARES, GRASIELE ; PAGLIARA LAGE, DANIELA ; FERRAZ COELHO, EDUARDO ANTONIO ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL ANGEL . Computer-aided drug design approaches applied to screen natural product's structural analogs targeting arginase in *Leishmania* spp. *F1000RESEARCH*, v. 12, p. 93, 2023.
- 17) OLIVEIRA, LUCAS ; DA SILVA, UEVETON ; BRAGA, JOÃO PEDRO ; TEIXEIRA, ÁLVARO ; RIBON, ANDRÉA ; VAREJÃO, EDUARDO ; COELHO, EDUARDO ; **DE FREITAS, CAMILA** ; TEIXEIRA, RÓBSON ; MOREIRA, RENATA . Green Synthesis, Characterization and Antibacterial and Leishmanicidal Activities of Silver Nanoparticles Obtained from Aqueous Extract of *Eucalyptus grandis*. *JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY*, v. 34, p. 527-536, 2023.

- 18) SANTOS, FABIOLA SUELEN DOS ; FREITAS, ROSSIMIRIAM PEREIRA DE ; **FREITAS, CAMILA SIMÕES DE** ; MENDONÇA, DÉBORA VASCONCELOS COSTA ; LAGE, DANIELA PAGLIARA ; TAVARES, GRASIELE DE SOUSA VIEIRA ; MACHADO, AMANDA SANCHEZ ; MARTINS, VIVIAN TAMIETI ; COSTA, ADILSON VIDAL ; QUEIROZ, VAGNER TEBALDI DE ; DE OLIVEIRA, MARIANA BELIZARIO ; OLIVEIRA, FABRÍCIO MARQUES DE ; ANTINARELLI, LUCIANA MARIA RIBEIRO ; COIMBRA, ELAINE SOARES ; PILAU, EDUARDO JORGE ; DA SILVA, GEOVANE PEREZ ; COELHO, EDUARDO ANTONIO FERRAZ ; TEIXEIRA, RÓBSON RICARDO . Synthesis of 1,2,3-Triazole-Containing Methoxylated Cinnamides and Their Antileishmanial Activity against the Leishmania braziliensis Species. PHARMACEUTICALS, v. 16, p. 1113, 2023.

- 19) RAMOS, FERNANDA F. ; PEREIRA, ISABELA A. G. ; CARDOSO, MARIANA M. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; LAGE, DANIELA P. ; SCUSSEL, RAHISA ; ANASTACIO, RAFAELA S. ; FREIRE, VICTOR G. ; MELO, MARINA F. N. ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOAO A. ; MARTINS, VIVIAN T. ; TAVARES, GRASIELE S. V. ; VALE, DANNIELE L. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; CHAVES, ANA THEREZA ; CAPORALI, JÚLIA F. M. ; VASSALLO, PAULA F. ; RAVETTI, CECILIA G. ; NOBRE, VANDACK ; FONSECA, FLAVIO G. . B-Cell Epitopes-Based Chimeric Protein from SARS-CoV-2 N and S Proteins Is Recognized by Specific Antibodies in Serum and Urine Samples from Patients. Viruses-Basel, v. 15, p. 1877, 2023.

- 20) JESUS, MARCELO M. ; LAGE, DANIELA P. ; VALE, DANNIELE L. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; PIMENTA, BRENO L. ; MOREIRA, GABRIEL J.L. ; RAMOS, FERNANDA F. ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; LUDOLF, FERNANDA ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; GALDINO, ALEXSANDRO S. ; DUARTE, MARIANA C. ; MENEZES-SOUZA, DANIEL ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; TEIXEIRA, ANTÔNIO L. ; GONÇALVES, DENISE U. ; ROATT, BRUNO M. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; MARTINS, VÍVIAN T. . Immunization with recombinant LiHyp1 protein plus adjuvant is protective against tegumentary leishmaniasis. PARASITOLOGY RESEARCH, v. 122, p. 2917-2931, 2023.

- 21) DA SILVA BARROS, EUNICE ; BARROS NASCIMENTO, ANA LUIZA ; PAULA PONTES, DANIEL ; FONSECA DIAS, CARINA ; FARIA DE ALMEIDA SILVA, MARINA ; DOS SANTOS ANDRADE, AGDA DANIELLE ; **SIMÕES DE FREITAS, CAMILA** ; LAUAR GONÇALVES, JULIANA . Validação do Mnemônico NUTRIFICO como Abordagem Nutricional e Comunicação de Notícias Difíceis em Cuidados Paliativos. REVISTA BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA, v. 70, p. jan/fev/mar, 2023.

- 22) PINTO, BÁRBARA FERNANDES ; RIBEIRO, LORENA NATASHA BRITO ; DA SILVA, GISELA BEVILACQUA ROLFSSEN FERREIRA; **FREITAS, CAMILA SIMÕES**; KRAEMER, LUCAS; OLIVEIRA, FABRÍCIO MARCUS SILVA ; CLÍMACO, MARIANNA CARVALHO; MOURÃO, FLÁVIO AFONSO GONÇALVES; SANTOS, GABRYELLA SOARES PINHEIRO DOS ; BÉLA, SAMANTHA RIBEIRO; GURGEL, ISABELLA LUÍSA DA SILVA; LEITE, FÁBIO DE LIMA; DE OLIVEIRA, ANSELMO GOMES; VILELA, MAURA REGINA SILVA DA PÁSCOA; OLIVEIRA-LIMA, ONÉSIA CRISTINA; SORIANI, FREDERICO MARIANETTI; FUJIWARA, RICARDO TOSHIO ; BIRBRAIR, ALEXANDER ; RUSSO, REMO CASTRO ; CARVALHO-TAVARES, JULIANA . Inhalation of dimethyl fumarate-encapsulated solid lipid nanoparticles attenuate clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis and pulmonary inflammatory dysfunction in mice. CLINICAL SCIENCE, v. 136, p. 81-101, 2022.

- 23) GALVANI, NATHALIA C. ; MACHADO, AMANDA S. ; LAGE, DANIELA P. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; DE OLIVEIRA, DAYSIANE ; **FREITAS, CAMILA S.** ; VALE, DANNIELE L. ;

- FERNANDES, BRUNA B. ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; REIS, THIAGO A.R. ; SANTOS, THAÍS T.O. ; RAMOS, FERNANDA F. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; LUDOLF, FERNANDA ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; GUIMARÃES, NATHALIA S. ; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; HUMBERT, MARIA V. ; GONÇALVES, DENISE U. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A. ; COELHO, EDUARDO A.F. . Sensitive and specific serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis using a new chimeric protein based on specific B-cell epitopes of *Leishmania* antigenic proteins. MICROBIAL PATHOGENESIS, v. 162, p. 105341, 2022.
- 24) LAGE, DANIELA P. ; MACHADO, AMANDA S. ; VALE, DANNIELE L. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; LINHARES, FLÁVIA P. ; CARDOSO, JAMILLE M.O. ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; RAMOS, FERNANDA F. ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; LUDOLF, FERNANDA ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; SILVA, ALESSANDRA M. ; SIMÕES, LUCIANA C. ; REIS, THIAGO A.R. ; OLIVEIRA, JAMIL S. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; ROATT, BRUNO M. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; COELHO, EDUARDO A.F. . Recombinant guanosine-5--triphosphate (GTP)-binding protein associated with Poloxamer 407-based polymeric micelles protects against *Leishmania infantum* infection. CYTOKINE, v. 153, p. 155865, 2022.
- 25) VALE, DANNIELE L. ; MACHADO, AMANDA S. ; RAMOS, FERNANDA F. ; LAGE, DANIELA P. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; DE OLIVEIRA, DAYSIANE ; GALVANI, NATHALIA C. ; LUIZ, GABRIEL P. ; FAGUNDES, MIRIAN I. ; FERNANDES, BRUNA B. ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; LUDOLF, FERNANDA ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; GUIMARÃES, NATHALIA S. ; CHAVES, ANA T. ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; ROCHA, MANOEL O.C. ; GONÇALVES, DENISE U. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A. ; COELHO, EDUARDO A.F. . Evaluation from a B-cell epitope-based chimeric protein for the serodiagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. MICROBIAL PATHOGENESIS, v. 167, p. 105562, 2022.
- 26) RIBEIRO ANTINARELLI, LUCIANA M. ; GLANZMANN, NÍCOLAS ; MENDONÇA, DÉBORA V. C. ; LAGE, DANIELA P. ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; TAVARES, GRASIELE S. V. ; CARVALHO, ANA MARIA R. S. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; MARTINS, VÍVIAN T. ; DUARTE, MARIANA C. ; MENEZES-SOUZA, DANIEL ; DA SILVA, ADILSON DAVID ; COELHO, EDUARDO ANTÔNIO FERRAZ ; SOARES COIMBRA, ELAINE . Parasitological and immunological evaluation of a quinoline derivative salt incorporated into a polymeric micelle formulation against *Leishmania infantum* infection. PARASITOLOGY RESEARCH, v. 121, p. 2129-2140, 2022.
- 27) LAGE, DANIELA P. ; VALE, DANNIELE L. ; LINHARES, FLÁVIA P. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; MACHADO, AMANDA S. ; CARDOSO, JAMILLE M. O. ; DE OLIVEIRA, DAYSIANE ; GALVANI, NATHÁLIA C. ; DE OLIVEIRA, MARCELO P. ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; RAMOS, FERNANDA F. ; TAVARES, GRASIELE S. V. ; LUDOLF, FERNANDA ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; PEREIRA, ISABELA A. G. ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; ROATT, BRUNO M. ; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; COELHO, EDUARDO A. F. ; MARTINS, VÍVIAN T. . A Recombinant Chimeric Protein-Based Vaccine Containing T-Cell Epitopes from Amastigote Proteins and Combined with Distinct Adjuvants, Induces Immunogenicity and Protection against *Leishmania infantum* Infection. Vaccines, v. 10, p. 1146, 2022.
- 28) MACHADO, AMANDA S. ; LAGE, DANIELA P. ; VALE, DANNIELE L. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; LINHARES, FLÁVIA P. ; CARDOSO, JAMILLE M. O. ;

- OLIVEIRA'DA'SILVA, JOÃO A. ; PEREIRA, ISABELA A. G. ; RAMOS, FERNANDA F. ; TAVARES, GRASIELE S. V. ; LUDOLF, FERNANDA ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; MAIA, LUIZ G. N. ; MENEZES'SOUZA, DANIEL ; DUARTE, MARIANA C. ; CHÁVEZ'FUMAGALLI, MIGUEL A. ; ROATT, BRUNO M. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; MARTINS, VÍVIAN T. ; COELHO, EDUARDO ANTONIO FERRAZ . Leishmania LiHyC protein is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. *PARASITE IMMUNOLOGY*, v. 44, p. 1-12, 2022.
- 29) MACHADO, AMANDA S. ; LAGE, DANIELA P. ; VALE, DANNIELE L. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; LINHARES, FLÁVIA P. ; CARDOSO, JAMILLE M.O. ; PEREIRA, ISABELA A.G. ; RAMOS, FERNANDA F. ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; LUDOLF, FERNANDA ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; SIMÕES, ARATTI C. ; DUARTE, MARIANA C. ; OLIVEIRA, JAMIL S. ; CHRISTODOULIDES, MYRON ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; ROATT, BRUNO M. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; COELHO, EDUARDO A.F. . A recombinant Leishmania amastigote-specific protein, rLiHyG, with adjuvants, protects against infection with Leishmania infantum. *ACTA TROPICA*, v. 230, p. 106412, 2022.
- 30) REIS, THIAGO A.R. ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; MENDONÇA, DÉBORA V.C. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; COSTA, RAFAELLA R. ; LAGE, DANIELA P. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; MACHADO, AMANDA S. ; RAMOS, FERNANDA F. ; SILVA, ALESSANDRA M. ; LUDOLF, FERNANDA ; ANTINARELLI, LUCIANA M.R. ; BRITO, RORY C.F. ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; HUMBERT, MARIA V. ; ROATT, BRUNO M. ; COIMBRA, ELAINE S. ; COELHO, EDUARDO A.F. . Ivermectin presents effective and selective antileishmanial activity in vitro and in vivo against Leishmania infantum and is therapeutic against visceral leishmaniasis. *EXPERIMENTAL PARASITOLOGY*, v. 221, p. 108059, 2021.
- 31) SANTOS, THAÍS T.O. ; MACHADO, AMANDA S. ; RAMOS, FERNANDA F. ; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A. ; LAGE, DANIELA P. ; TAVARES, GRASIELE S.V. ; MENDONÇA, DÉBORA V.C. ; CARDOSO, MARIANA S. ; SIQUEIRA, WILLIANE F. ; MARTINS, VÍVIAN T. ; LUDOLF, FERNANDA ; REIS, THIAGO A.R. ; CARVALHO, LÍVIA M. ; **FREITAS, CAMILA S.** ; BANDEIRA, RAQUEL S. ; SILVA, ALESSANDRA M. ; OLIVEIRA, JAMIL S. ; MOREIRA, RICARDO L.F. ; FUJIWARA, RICARDO T. ; ROATT, BRUNO M. ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A. ; HUMBERT, MARIA V. ; TEIXEIRA, ANTÔNIO L. ; COELHO, EDUARDO A.F. . Leishmania eukaryotic elongation Factor-1 beta protein is immunogenic and induces parasitological protection in mice against Leishmania infantum infection. *MICROBIAL PATHOGENESIS*, v. 151, p. 104745, 2021.