

Sarah Kymberly Santos de Lima

**Tratamento tóxico da leishmaniose cutânea experimental com 8-
hidroxiquinolina**

São Paulo

2024

Sarah Kymberly Santos de Lima

**Tratamento tópico da leishmaniose cutânea experimental com 8-
hidroxiquinolina**

Versão Corrigida

(Versão original encontra-se na unidade
que aloja o Programa de Pós-graduação)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
a obtenção do título de mestre em Ciências.

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Domingues
Passero

São Paulo

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Sarah Kymberly Santos de

Tratamento tópico da leishmaniose cutânea experimental com
8-hidroxiquinolina / Sarah Kymberly Santos de Lima; Luiz Felipe
Domingues Passero, orientador. -- São Paulo, 2024.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Fisiopatologia
Experimental. Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo, 2024.

Versão corrigida

1. Administração tópica 2. 8- hidroxiquinolina 3. Quinolinas 4. L.
(L.) amazonensis 5. Leishmaniose cutânea I. Passero, Luiz Felipe
Domingues, orient. II. Título

USP/FM/DBD-452/23

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ALUNO(A): Sarah Kymberly Santos de Lima
Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Experimental

Relatório da Comissão Julgadora:

Aos 12/03/2024, atendendo ao disposto no Regimento da Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, o(a) candidato(a) Sarah Kymberly Santos de Lima ao título de Mestre, apresentou sua Dissertação de Mestrado com o título: Tratamento tópico da leishmaniose cutânea experimental com 8-hidroxiquinolina.

Esta Comissão, indicada pela Comissão de Pós-Graduação, é de parecer que:

A aluna respondeu todas as perguntas feitas pela banca examinadora de maneira clara e objetiva, respondendo adequadamente o questionamento.

O trabalho foi considerado de relevância para a área de protozooses, com publicações relevantes já obtidas.

Adicionalmente, a monografia apresentou seus resultados com clareza e didática, mostrando total domínio sobre o tema.

Assim, a banca é de parecer que a candidata tem mérito para receber o título de mestre pela FMUSP.



De acordo com o disposto no Regimento da Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, os Examinadores consideraram o(a) candidato(a): SARAH KYMBERLY SANTOS DE LIMA

São Paulo, 12 de março de 2024

COMISSÃO EXAMINADORA:

- Luiz Felipe D. Passero
Luiz Felipe Domingues Passero - PRESIDENTE
- APR () REP - Marcia Dalastro Laurenti - TITULAR
- APR () REP - André Gustavo Tempone Cardoso - TITULAR
- APR () REP - João Henrique Ghilardi Lago - TITULAR
- () APR () REP - Marcia Aparecida Sperança - SUPLENTE
- () APR () REP - Walter Belda Junior - SUPLENTE
- () APR () REP - Ella Tamaso Espin Garcia Calzolari - SUPLENTE

Agradecimentos

À Profª Drª Márcia Dalastra Laurenti, por ter aberto as portas do laboratório para a realização da minha pesquisa, por não medir esforços em ajudar sempre que possível, pela cordialidade e gentileza constante que teve comigo.

Ao Prof. Dr. Felipe Domingues Passero, meu orientador, expresso minha profunda gratidão por ter me acolhido como aluna e pela orientação exemplar proporcionada ao longo do mestrado. Agradeço pelo apoio constante e pela confiança manifestada em meu trabalho, bem como pelo notável exemplo de dedicação e profissionalismo que sempre demonstrou. Por sua capacidade de incentivar e inspirar meu constante aprimoramento. Além dos ensinamentos no campo científico, reconheço e valorizo aqueles que transcendem os limites da ciência. Agradeço também pela paciência e compreensão nos momentos em que mais precisei, por proporcionar ambientes descontraídos e agradáveis em nossa rotina de laboratório, e pela amizade que se desenvolveu para além da relação de orientador.

À Profª Drª Renata de Britto Mari, que desempenhou um papel fundamental como exemplo de orientadora e pesquisadora, marcando o início da minha jornada na carreira acadêmica e contribuindo significativamente para o meu amadurecimento como minha primeira mentora. Por seu constante incentivo, por continuar acompanhando minha trajetória na ciência e por torcer pelo meu sucesso. Por sua valiosa confiança em meu trabalho, assim como a oportunidade que proporcionou ao me apresentar ao Felipe, que juntos criaram os melhores ambientes, permeados por acolhimento, aprendizado e carinho. Estendo meus agradecimentos aos amigos do LABMA (Alexandre, Natália, Karine, Giovana e Mari) com quem compartilhei inúmeras alegrias; em especial à Gabriela, que além da amizade me instruiu durante os 5 anos de laboratório.

Ao Dr. João Henrique G. Lago, por todas as valiosas sugestões e colaborações durante o mestrado, pela receptividade enquanto estive em seu laboratório; também estendo meu agradecimento a todos os alunos do Laboratório de Biologia Química (407-3), que me receberam com grande cordialidade. Em particular, agradeço à Chris, que não só colaborou ativamente com meu trabalho, mas também generosamente compartilhou sua amizade.

Ao Dr. André E. Tempone, expresso minha sincera gratidão pelos valiosos ensinamentos e considerações fornecidos ao longo deste trabalho, que foram fundamentais para o desenvolvimento e aprimoramento desta pesquisa.

Ao laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM50): Dr^a Vânia da Matta, Dr^a Cláudia Gomes, Lia Negrão, Edson Tadeu que sempre foram muito gentis e solícitos. Aos amigos e colegas: Carmen, Gabi, Bruno, Fábio, Larissa, Júlia, Slam e Thaina, pela companhia e os preciosos momentos vivenciados no laboratório. Em especial agradeço à Jéssica, que dedicou seu tempo para me ensinar todos os experimentos *in vitro*, mesmo durante um momento tão significativo de sua vida, como o preparo do casamento. Ao Ítalo por ser a melhor dupla de laboratório que poderia existir e por me ajudar nos experimentos mais longos e cansativos durante o mestrado; e à Thaíse por não medir esforços para me ajudar sempre que possível. A colaboração e amizade de todos tornaram essa jornada no laboratório uma experiência enriquecedora e memorável.

À minha amada família, expresso minha profunda gratidão por estar sempre presente, fornecendo não apenas apoio, mas também os ensinamentos e incentivos necessários para que eu valorizasse a educação e pudesse dar continuidade à minha formação. Aos meus queridos avós, em especial à minha avó, Rosângela, agradeço por ser minha maior incentivadora, por instilar em mim a crença de que era possível alcançar meus objetivos. Ao meu avô, William, agradeço por cuidar de mim sempre que necessário e por ter me acompanhado em todas as provas de vestibulares que prestei. Também expresso minha gratidão aos meus avós maternos, que sempre demonstraram preocupação com o meu bem-estar e ofereceram uma demonstração constante de amor.

À minha mãe, Silvia, e à minha irmã, Samara, dedico minha profunda gratidão por serem não apenas minha família, mas também minhas melhores amigas, oferecendo apoio incondicional em todos os momentos, mesmo cientes de que minha ausência pode afetá-las. Agradeço por compreenderem e compartilharem dos meus sonhos, e por serem exemplos inspiradores de amor, dedicação e resiliência.

Ao Caíque e ao Evandro, pelos bons momentos compartilhados e por cuidarem tão bem da nossa família. A presença e contribuição de cada um de vocês enriquece significativamente minha vida, e sou grata por ter pessoas tão especiais ao meu lado.

Ao meu pai, Wellington, por ser o melhor pai que eu poderia ter; à Cris e à Isa pelo carinho, acolhimento e por terem me acrescentado uma nova e preciosa parte à nossa família.

Aos meus tios: Jaci, William, Wanessa e Cleiton, pela presença e orientação, que têm sido fundamentais em minha vida. Cada um de vocês desempenhou um papel fundamental no

meu desenvolvimento, e sou eternamente grata por todo o apoio e carinho que recebi ao longo da minha jornada educacional.

A todos os familiares, amigos e colegas que participaram direta ou indiretamente de minha vida durante esse processo.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), bolsas números 2018/24077-6 e 2021/02392-0; A União Iberoamericana de Universidades (ENF03-2017), PROPE-UNESP (05/2023) e HCFMUSP-LIM50 que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors*

Documentação: *Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver)*/ Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro... [et al.]. --3. ed. rev. ampl. mod. - - São Paulo: SIBi/USP, 2016. 100p.: il. -- (Cadernos de estudos; 9)

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Aspectos gerais da leishmaniose	17
1.2. Formas clínicas de leishmaniose	22
1.3. Fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose	24
1.4. Busca por um tratamento alternativo para o tratamento das leishmanioses.....	27
2. OBJETIVO GERAL	32
2.1. Objetivos específicos.....	32
3. Métodos.....	34
3.1. Materiais.....	34
3.2. Parasito.....	34
3.3. Avaliação do potencial leishmanicida da 8-HQ em formas promastigotas	34
3.4. Macrófagos derivados da medula óssea (MMO)	35
3.5. Teste de citotoxicidade.....	36
3.6. Infecção de macrófagos.....	36
3.7. Determinação da produção de óxido nítrico intracelular	37
3.8. Preparo dos cremes contendo 8-HQ.....	37
3.9. Tamanho de partículas	38
3.10. Estudos de permeação cutânea empregando por células de Franz	38
3.11. Animais experimentais e considerações éticas	40
3.12. Animais saudáveis tratados com cremes 1 e 2%	41
3.13. Infecção e tratamento.....	41
3.14. Evolução da lesão e avaliação da carga parasitária	42
3.15. Avaliação da produção de IL-4 e IFN- γ	42
3.16. Análise estatística	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Atividade da 8-HQ em formas promastigotas e amastigotas.....	45
4.2. Avaliação da produção de óxido nítrico em macrófagos infectados.....	50

4.3. Produção do creme contendo 8-HQ, avaliação do tamanho de partículas.....	55
4.4. Análise da permeação.....	57
4.5. Avaliação das alterações histológicas de pele de camundongos BALB/c saudáveis tratados com cremes 1 e 2%.	60
4.6. Avaliação da eficácia dos cremes contendo 8-HQ na leishmaniose cutânea experimental.....	62
4.7. Avaliação de carga parasitária.....	63
4.8. Alterações histopatológicas em pele de animais infectados e tratados	65
4.9. Avaliação da produção de IL-4 e IFN- γ	69
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
6. Referências Bibliográficas*	75
Anexos	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-HQ	8-hidroxiquinolina
CC₅₀	Concentração citotóxica de 50%
CDC	<i>Center for disease control</i>
CE₅₀	Concentração efetiva de 50%
CSF-1	Fator estimulador de colônia-1
D	Coefficiente de difusão
DMSO	Dimetilsulfóxido
DND_i	<i>Drugs for neglected diseases initiative</i>
DTN	Doença tropical negligenciada
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Gp63	metaloproteinase de 63kDa
HBSS	Solução salina balanceada de Hanks
HRP	enzima estreptavidina-horseradish peroxidase
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
II	Índice de infecção
IL-	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico induzível
IS	Índice de seletividade
Jss	Fluxo em estado estacionário
LC	Leishmaniose cutânea
LCAD	Leishmaniose cutânea anérgica difusa
LCCM	Meio condicionado por células L929
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCNU	Leishmaniose cutânea não ulcerada, ou atípica
LDPC	Leishmaniose dérmica pós-calazar
LM	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose visceral
M1	Macrófagos classicamente
M2	Macrófagos alternativamente
M-CFS	Fator estimulador de colônia de macrófagos e monócitos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

Milte	Miltefosina
NH₄Cl	Ácido sulfúrico
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização mundial da saúde
P	Coefficiente de permeabilidade
PBS	Tampão fosfato
PI	Pós-infecção
QSP	Quantidade suficiente para
R10	RPMI suplementado à 10%
RMN	Ressonância magnética nuclear
S10	Schneider suplementado à 10%
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
T[SH]₂	Tripanotiona
Tc	Linfócito T CD8 ⁺ citotóxico
Th	Linfócito T <i>helper</i>
TLR-7	<i>Toll like receptor-7</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Tripanotiona redutase
Treg	Linfócito T regulador
TXN	Triparedoxina
TXPN_x	Triparedoxina peroxidase
UHPLC	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
×g	Veze a aceleração da gravidade
°C	Graus Celsius
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitros
µm	Micrometros
cm²	Centímetros cúbicos
h	Horas
kDa	Quilodalton
M	Mol
mg	Miligramas
mg/kg	Miligrama por quilograma
Min	Minutos
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ng/mL	Nanogramas por mililitro
nm	Nanômetros
p/v	Peso por volume
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotação por minuto
U/mL	Unidade por mililitro
v:v	Volume por volume
x	Veze

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de *Leishmania* sp. Fonte: Figura A – Reddy, 2019; Figura B - arquivo pessoal..... 18
- Figura 2.** Ciclo biológico de *Leishmania* sp. com início através do repasto sanguíneo de flebotomíneos infectados e da infecção em humanos (1); posteriormente as formas promastigotas são fagocitadas (2), se diferenciam em amastigotas (3), e se multiplicam no interior de macrófagos causando a ruptura da membrana das células (4). Após um novo repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados (5), os flebotomíneos ingerem células infectadas por *Leishmania* sp. (6), que serão rompidas liberando as formas amastigotas e se diferenciarão em promastigotas (7), se ligando à superfície intestinal e posteriormente migrando para a probóscide dos insetos (8), onde serão capazes de infectar novo hospedeiro vertebrado após um novo repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo biológico do gênero *Leishmania* sp..... 19
- Figura 3.** Esquematização da resposta imune direcionada a resistência ou susceptibilidade na leishmaniose por linfócitos NK, CD4⁺ e CD8⁺. Fonte: Adaptado de Passero,2011..... 22
- Figura 4.** Cascata enzimática da neutralização de EROS pela tripanotiona redutase em tripanossomatídeos. Fonte: De Oliveira, 2008..... 25
- Figura 5.** Estrutura química da 8-hidroxiquinolina. Fonte: Adaptado de Pubchem..... 29
- Figura 6.** Macrófagos derivados da medula óssea foram infectados com *L. (V.) guyanensis* ou *L. (L.) amazonensis* e tratados com diferentes concentrações de 8-HQ ou miltefosina durante 24 h ou 72 h. Esta figura ilustra a ação de ambas as drogas a 10 µg/mL..... 48
- Figura 7.** Macrófagos foram infectados por espécies do subgênero *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis* (A); *L. (L.) infantum* (B); e subgênero *Viannia*: *L. (V.) guyanensis* (C); *L. (V.) lainsoni* (D); *L. (V.) naiffi* (E); *L. (V.) shawi* (F). Após a infecção, os macrófagos foram tratados com 8-HQ (1,25 -10 µg/mL) durante 24 e 72 h e a produção de óxido nítrico intracelular foi determinada. O LPS foi utilizado como controle positivo (dados não mostrados) e macrófagos não infectados e não tratados (MΦ) foram considerados controle negativo da reação. Os resultados foram expressos por média e erro padrão. A letra “a” demonstra resultados que

- apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação entre macrófagos infectados e tratados por 8-HQ (1,25 -10 $\mu\text{g/mL}$) e macrófagos infectados ($iM\Phi$) em 24 h, e a letra “b” a comparação em 72 h..... 52
- Figura 8.** Tamanho de partículas da base de Beeler e dos cremes com 1 ou 2% de 8-HQ indicando que 10% (D10), 50% (D50) e 90% (D90) das partículas possuem o diâmetro (μm) indicado no eixo Y. $p^* < 0,05$ entre as porcentagens de partículas do mesmo grupo de creme. Em “a” e “b” os resultados referentes a D50 e D90 do creme a 2% indicam $p < 0,05$ em relação a D50 e D90 da base de Beeler e creme 1%, respectivamente..... 56
- Figura 9.** Após a análise de permeação cutânea em células de Franz, os fragmentos de pele de suínos foram processados histologicamente e corados com hematoxilina e eosina (HE). A prancha histológica demonstra o creme com 1% de 8-HQ (A) e creme com 2% de 8-HQ (B), (Barras 10 μm)..... 58
- Figura 10.** Cortes histológicos da pele de BALB/c corados com hematoxilina e eosina (HE) demonstrando a estrutura da pele de camundongos após o tratamento tópico durante 14 dias. Grupo controle não tratado (A), Grupo tratado com a base de Beeler pela via tópica (B), Grupo tratado com o creme contendo 1% de 8-HQ pela via tópica (C), Grupo tratado com a creme contendo 2% de 8-HQ pela via tópica (D); e Grupo tratado com Glucantime[®] pela via intralesional (E). As setas sinalizam áreas de inflamação tecidual (Barras 20 μm)..... 61
- Figura 11.** Para a mensuração do diâmetro da lesão (A), os camundongos BALB/c foram infectados na base da cauda com 10^6 formas promastigotas de *L (L.) amazonensis*. Ao final da 4^a semana de infecção os animais foram submetidos ao tratamento com creme de 8-HQ à 1% ou 2%. O Glucantime[®] (50 mg/kg) foi considerado o fármaco controle no experimento. Os animais receberam a aplicação única dos tratamentos por 14 dias consecutivos e tiveram o diâmetro das lesões mensuradas semanalmente por um micrômetro. $*p < 0,05$ em relação ao grupo infectado. $\#p < 0,05$ na comparação entre o creme 1% e os demais grupos. Imagem do tamanho da lesão na cauda dos camundongos BALB/c referentes aos grupos: infectado (controle), e infectados e tratados com base de Beeler, creme 1% ou 2% de 8-HQ, e Glucantime (50 mg/kg), após o final do período experimental (B)..... 62
- Figura 12.** Para avaliação de carga parasitária, camundongos BALB/c foram infectados na base da cauda com 10^6 formas promastigotas de *L (L.) amazonensis*; ao final da 4^a semana de infecção os animais foram submetidos ao tratamento com os cremes contendo 1

ou 2% de 8-HQ. O Glucantime[®] (50 mg/kg) foi considerado o fármaco controle do experimento. Os animais foram tratados uma vez ao dia por um período total de 14 dias consecutivos. A carga parasitária foi determinada pelo ensaio de diluição limitante. *p<0,05 na comparação ao grupo infectado e Beeler em relação ao tratamento com o creme de 8-HQ à 1% ou 2%, e Glucantime[®].....

64

Figura 13. Fragmentos de pele de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) amazonensis* foram submetidos ao processamento histológico e corados com Hematoxilina e eosina (HE). A prancha histológica demonstra o controle infectado (A e B); o tratamento tópico com creme 1% de 8-HQ (C e D); tratamento tópico com creme 2% de 8-HQ (E e F); tratamento por via intralesional com 50 mg/kg de Glucantime[®] (G e H). A estrutura da derme e epiderme de cada grupo é detalhada em A, C, E e G; o parasitismo tecidual é detalhado em B, D, F e G. A necrose pode ser observada na ponta das setas (Barras: 40 µm).....

67

Figura 14. A quantificação de citocinas foi realizada pelo ensaio de ELISA sanduíche. Para tanto os linfonodos inguinais de camundongos BALB/c infectados, infectados e tratados com creme (1 e 2% de 8-HQ) ou Glucantime[®] (50 mg/kg) foram macerados, centrifugados e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de citocinas IFN-γ e IL-4. *p<0,05.....

70

Figura 15. Esquematização da resposta imune nos grupos experimentalmente infectados por *L. (L.) amazonensis* demonstrando a polarização da resposta Th2 no grupo controle infectado e grupo tratado com base de Beeler (A); e a polarização da resposta imune Th1 nos grupos infectados e tratados com creme 1% ou 2% de 8-HQ, e grupo tratado com Glucantime[®] (B).....

71

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1.	A determinação da Concentração Efetiva 50 (CE ₅₀) foi realizada em promastigotas das seguintes espécies: <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (L.) infantum</i> , <i>L. (V.) guyanensis</i> , <i>L. (V.) lainsoni</i> , <i>L. (V.) naiiffi</i> e <i>L. (V.) shawi</i> . Macrófagos foram utilizados para a determinação da Concentração Citotóxica 50 (CC ₅₀). As promastigotas e macrófagos foram incubados com 8-HQ ou miltefosina durante 24 ou 72 h. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes. *8-HQ – 8-hidroxiquinolina; * Milt – miltefosina. Os índices de seletividade (IS) foram expressos pela razão entre CC ₅₀ e CE ₅₀ e os resultados expressos por média e erro padrão a partir de três experimentos independentes.....	46
Tabela 2.	Para determinação da Concentração Efetiva 50 (CE ₅₀) macrófagos foram incubados e a infecção foi realizada com as seguintes espécies: <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (L.) infantum</i> , <i>L. (V.) guyanensis</i> , <i>L. (V.) lainsoni</i> , <i>L. (V.) naiiffi</i> e <i>L. (V.) shawi</i> , que foram incubadas com 8-HQ ou miltefosina durante 24 ou 72 h. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. *8-HQ – 8-hidroxiquinolina; * Milt – miltefosina. Os índices de seletividade (IS) foram expressos pela razão entre CC ₅₀ e CE ₅₀ e os resultados expressos por média e erro padrão a partir de três experimentos independentes.....	47
Tabela 3.	O ensaio de permeação cutânea foi realizado isoladamente em peles de suínos ou membranas artificiais (Strat-M [®]) que foram incubadas com os cremes contendo 1 ou 2% de 8-hidroxiquinolina. *p<0,05 entre os cremes contendo 1 e 2% de 8-HQ em um mesmo modelo de membrana.....	56

RESUMO

Lima SKS. Tratamento tópico da leishmaniose cutânea experimental com 8-hidroxiquinolina [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

O presente trabalho objetiva avaliar a sensibilidade de diferentes espécies à 8-hidroxiquinolina (8-HQ), formular um creme contendo 8-HQ para uso tópico e avaliar sua eficácia na leishmaniose cutânea experimental. Estudos com *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* demonstraram que a 8-HQ foi seletiva em promastigotas e amastigotas após 24 e 72 h de incubação, sendo que as espécies do subgênero *Viannia* foram mais suscetíveis ao composto; adicionalmente a 8-HQ foi mais seletiva que a miltefosina em todas as espécies avaliadas. Macrófagos infectados tratados com 8-HQ produziram NO principalmente em 72 h, sugerindo que o composto possui ação imunomoduladora. A 8-HQ foi formulada na base de Beeler a 1 e 2% e do ponto de vista físico, foi observado que o creme 2% continha partículas maiores que o creme 1% e somente o creme sem adição de 8-HQ. Experimentos de permeação cutânea em pele suína demonstraram maior fluxo em estado estacionário ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), coeficiente de permeabilidade (cm^2/h) e coeficiente de difusão (cm/h) do creme 1% em comparação a 2%. O coeficiente de difusão dos cremes 1 e 2% em membrana artificial e pele suína foi superior à CE_{50} da 8-HQ para *L. (L.) amazonensis*, sugerindo que ambos possuem capacidade de permeação na CE_{50} para exercer ação leishmanicida *in vivo*. Não foi detectada alteração histológica das peles suínas expostas ao creme durante o teste de permeação cutânea, e quando testados em camundongos BALB/c os cremes não induziram alterações macroscópicas ou histológicas em pele. Para avaliar a eficácia dos cremes, camundongos BALB/c foram infectados na base da cauda com *L. (L.) amazonensis* e após 4 semanas foram submetidos ao tratamento tópico com cremes contendo 1 ou 2% de 8-HQ, por 14 dias. Em comparação aos animais controles infectados; observou-se que o tratamento com os cremes 1 ou 2% reduziu o tamanho da lesão dos animais e a carga parasitária da pele e linfonodos inguinais. Ressalta-se que na última semana de tratamento o creme 1% apresentou reduções mais expressivas no tamanho de lesão em comparação aos demais grupos, reduzindo em 56.4% o tamanho das lesões em relação ao grupo infectado. O tratamento intralesional com Glucantime[®] (50mg/kg) foi utilizado como controle e demonstrou redução no diâmetro das lesões e na carga parasitária dos animais. Nas avaliações imunológicas os grupos controles produziram altos níveis de IL-4 e baixos níveis de IFN- γ , correlacionados a um infiltrado inflamatório difuso na pele, com alta densidade de formas amastigotas e áreas de necrose tecidual. Em contrapartida, o tratamento com os cremes 1 e 2% causaram uma diminuição de amastigotas teciduais, associadas a um infiltrado inflamatório moderado e baixa densidade de macrófagos infectados; além da diminuição dos níveis de IL-4 e aumento de IFN- γ . O tratamento com Glucantime[®] também diminuiu a carga parasitária, os níveis de IL-4 e aumento de IFN- γ . Todavia, um intenso infiltrado inflamatório e áreas de necrose tecidual foram observadas no tratamento intralesional. Deste modo, o tratamento tópico com 1 e 2% foi eficaz no tratamento da leishmaniose cutânea experimental e pode ser considerado um tratamento alternativo nesta doença negligenciada.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea; *L. (L.) amazonensis*; Administração tópica; Quinolinas; 8-hidroxiquinolina.

ABSTRACT

Lima SKS. Topical treatment of experimental leishmaniasis with 8-hydroxyquinoline [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

This work aims to evaluate the sensitivity of different species to 8-hydroxyquinoline (8-HQ), formulate a cream containing 8-HQ for topical use, and evaluate its effectiveness in experimentally detected leishmaniasis. Studies with *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) shawi* discoveries that 8-HQ was selected in promastigotes and amastigotes after 24 and 72 h of incubation, with species of the subgenus *Viannia* were more susceptible to the compound; Furthermore, 8-HQ was more selective than miltefosine in all species evaluated. Infected macrophages treated with 8-HQ produced NO mainly within 72 h, indicating that the molecule has an immunomodulatory action. 8-HQ was formulated based on Beeler at 1 and 2% and from a physical point of view, it was observed that the 2% cream contained larger particles than the 1% cream and only the cream without the addition of 8-HQ. Permeation experiments on porcine skin revealed a higher steady-state flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), permeability coefficient (cm^2/h) and diffusion coefficient (cm/h) of the 1% cream compared to 2%. The diffusion coefficient of 1 and 2% creams in artificial membrane and porcine skin was higher than the 8-HQ EC_{50} for *L. (L.) amazonensis*, indicating that both have permeation capacity at EC_{50} to exert a leishmanicidal action *in vivo*. There were no histological changes in porcine skin exposed to the cream during the demonstrative permeation test, and when tested in BALB/c mice, the creams did not induce macroscopic or histological changes in the skin. To evaluate the effectiveness of the creams, BALB/c mice were infected at the base of the tail with *L. (L.) amazonensis* and after 4 weeks they were subjected to topical treatment with creams containing 1 or 2% 8-HQ for 14 days. Compared to infected control animals; it was observed that treatment with 1 or 2% creams reduced the size of the lesion in the animals and the parasite load in the skin and inguinal lymph nodes. It is noteworthy that in the last week of treatment, the 1% cream showed more significant reductions in the size of the lesion compared to the other groups, reducing the size of the lesions by 56.4% in relation to the infected group. Intralesional treatment with Glucantime[®] (50 mg/kg) was used as a control and demonstrated a reduction in the diameter of the lesions and the parasitic load of the animals. In immunological evaluation, control groups produced high levels of IL-4 and low levels of IFN- γ , correlated with a diffuse inflammatory infiltrate in the skin, with a high density of amastigotes and areas of tissue necrosis. On the other hand, treatment with 1 and 2% creams caused a reduction in tissue amastigotes, associated with moderate inflammatory infiltrate and low density of infected macrophages; in addition to a decrease in IL-4 levels and an increase in IFN- γ . Treatment with Glucantime[®] also reduced the parasite load, IL-4 levels and an increase in IFN- γ . However, an intense inflammatory infiltrate and tissue necrosis areas were observed in intralesional treatment. Therefore, topical treatment with 1 and 2% was effective in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis and can be considered an alternative treatment for this neglected disease.

Keywords: Administration, Topical; 8-hydroxyquinoline; quinolines; *L. (L.) amazonensis*; cutaneous leishmaniasis.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecciosa não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, onde aproximadamente 31 espécies parasitam mamíferos, e ao menos 20 espécies podem ser patogênicas ao homem (1–3). As duas principais manifestações clínicas da doença são leishmaniose visceral (LV), que apresenta notoriedade por levar a óbito 95% dos casos não tratados; e a leishmaniose cutânea (LC) com grande relevância epidemiológica por apresentar o maior número de casos incidentes na leishmaniose (4,5).

Segundo a organização mundial da saúde (OMS) juntas, as duas principais manifestações clínicas acometem aproximadamente 1 milhão de novos casos de leishmaniose anualmente, levando a aproximadamente 26.000 mortes em todo o mundo (6). Além disso, a doença é endêmica na Ásia, Oriente médio, Mediterrâneo, Norte da África, América Central e América do Sul (7), com cerca de 90% dos casos concentrados em apenas sete países: Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Brasil (8). No Brasil casos de leishmaniose visceral foram relatados em 23 estados, sendo a infecção causada por *L. (L.) infantum* (9). Por outro lado, a leishmaniose cutânea (LC) foi reportada em todos os estados brasileiros onde as três espécies com maior notoriedade são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, mas também abrangendo casos com as seguintes espécies: *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenberg* (10).

Ressalta-se ainda, que a *L. (V.) braziliensis* é a espécie mais prevalente não só no Brasil, mas na América Latina, com ampla distribuição desde a América Central até o norte da Argentina (11,12). Em sequência, as infecções por *L. (L.) amazonensis* também possuem ampla distribuição geográfica no Brasil, ocorrendo nos estados do Amazonas, Pará, Acre, Rondônia, Tocantins e Maranhão (em florestas primárias e secundárias da Amazônia), além da Bahia, Mato Grosso, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Paraná (13,14). Em contrapartida, os parasitos da espécie *L. (V.) guyanensis* que também apresentam alta incidência de casos diagnosticados, estão aparentemente restritos aos estados do norte do Brasil, como Acre, Amapá, Amazonas, Pará e Roraima (11).

Durante o ciclo de vida da *Leishmania* sp. o protozoário apresenta características dimórficas podendo se diferenciar em promastigotas (forma flagelada e extracelular do protozoário) (Figura 1 A), e em amastigotas (forma aflagelada e intracelular obrigatória) (Figura 1B) (5).

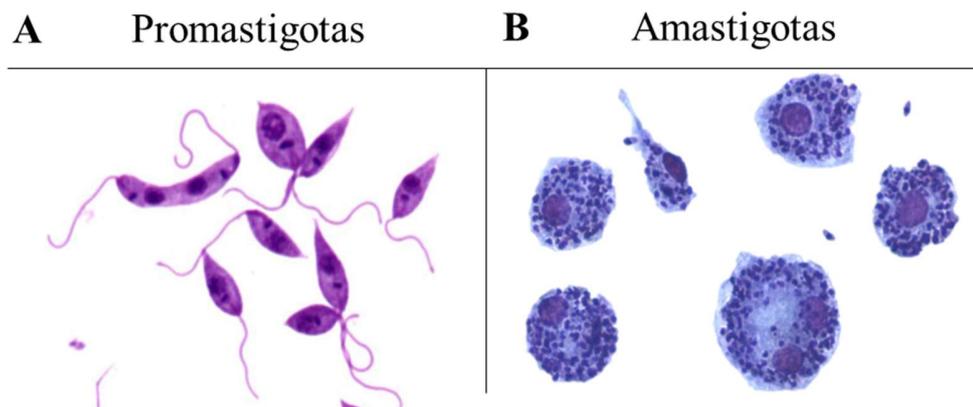


Figura 1. Formas promastigotas (A) e amastigotas fagocitadas por macrófagos (B) de *Leishmania* sp. Fonte: Figura A – Reddy, 2019 (15); Figura B - arquivo pessoal.

O ciclo de infecção da *Leishmania* (Figura 2) tem início por meio de flebotomíneos fêmeas dos gêneros *Phlebotomus* (Velho mundo) ou *Lutzomyia* (Novo mundo). Tais vetores possuem hábito hematófago para completarem o ciclo de desenvolvimento dos ovos, e no momento do repasto sanguíneo acabam por ingerir macrófagos parasitados por amastigotas concomitantemente à sua alimentação (16).

Após a alimentação, as formas amastigotas são liberadas dos macrófagos, e com o novo ambiente, fatores como a diminuição de temperatura e aumento do pH influenciam a rápida diferenciação das amastigotas para formas promastigotas. Estas promastigotas recém diferenciadas sofrem um processo de maturação que dura aproximadamente de 5 a 7 dias para se transformarem em formas promastigotas metacíclicas as quais apresentam alta concentração de duas principais moléculas superficiais, o lipofosfoglicano (LPG) e a metaloproteínase de 63kDa (gp63). Após a metaciclogênese as formas promastigotas se desligam do epitélio intestinal e migram para a probóscide do vetor, onde serão inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, podendo acometer animais silvestres, domésticos e seres humanos (17). Além disso, estima-se que mais de 70 espécies de animais já tenham sido relatadas como reservatório de *Leishmania* sp. (6). Quando um novo vetor fêmea realizar o repasto sanguíneo no indivíduo infectado, o ciclo biológico de *Leishmania* será reiniciado; neste caso, ocorrerá a ingestão de formas amastigotas concomitantemente à sua alimentação, que passarão pela transformação em formas promastigotas no interior do vetor e poderão ser injetadas na pele do mesmo ou de novos hospedeiros.

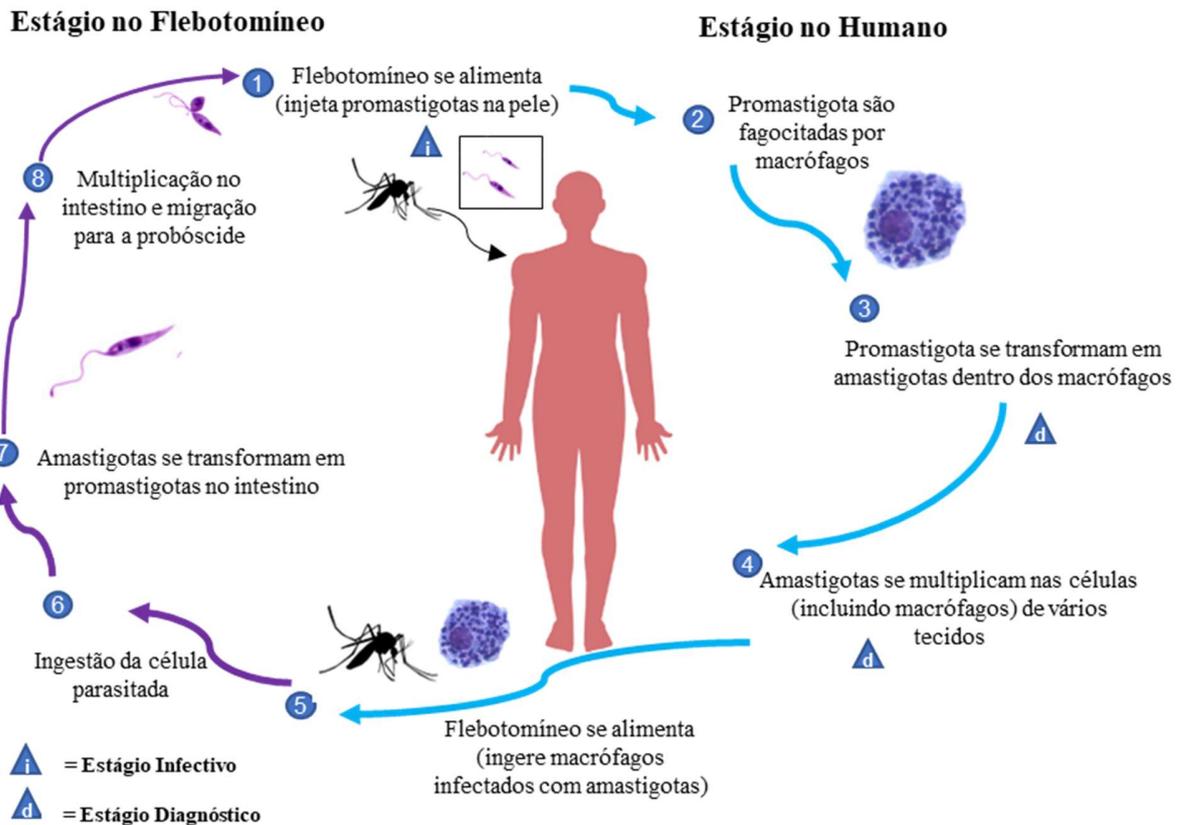


Figura 2. Ciclo biológico de *Leishmania* sp. com início através do repasto sanguíneo de flebotomíneos infectados e da infecção em humanos (1); posteriormente as formas promastigotas são fagocitadas (2), se diferenciam em amastigotas (3), e se multiplicam no interior de macrófagos causando a ruptura da membrana das células (4). Após um novo repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados (5), os flebotomíneos ingerem células infectadas por *Leishmania* sp. (6), que serão rompidas liberando as formas amastigotas e se diferenciarão em promastigotas (7), se ligando à superfície intestinal e posteriormente migrando para a probóscide dos insetos (8), onde serão capazes de infectar novo hospedeiro vertebrado após um novo repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo biológico do gênero *Leishmania* sp. Fonte: Adaptado de *Center for Disease Control* (CDC) (18).

Uma vez que as formas promastigotas são inoculadas na derme do hospedeiro, células fagocíticas e componentes acelulares da imunidade são recrutados ao local da infecção. Neste momento se estabelecerá uma resposta imune contra o patógeno. Na fase inicial da infecção, os componentes séricos, como o sistema complemento, são capazes de atuar na contenção do protozoário, podendo lisar aproximadamente 90% das promastigotas inoculadas, que posteriormente tem seus antígenos enviados para os linfonodos regionais (19).

Do mesmo modo, durante o estabelecimento da resposta imune os componentes da imunidade inata e adaptativa atuam simultaneamente para conter a infecção (Figura 3). As células dendríticas exercem a função de correlacionar a resposta imune inata e a resposta adaptativa, pois produzem

citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-12, que estimulam as células *natural killer* (NK) e linfócitos T na produção de IFN- γ , responsável pela ativação dos macrófagos (7,20).

Já os macrófagos são células essenciais durante a infecção, pois exibem diferentes funções frente a estímulos das citocinas presentes no microambiente, podendo ser divididos em macrófagos classicamente ativados (M1), que exercem função microbicida e pró-inflamatória; mas também podem estimular macrófagos alternativamente ativados (M2), que atuam na função de reparo tecidual e resolução da inflamação, mas que também facilitam a multiplicação do protozoário na célula hospedeira (21).

Neste sentido quando estiverem sob estímulos de mediadores pró-inflamatórios, os macrófagos são classicamente ativados e iniciam a síntese da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que por sua vez, oxidam o aminoácido L-arginina e acabam por produzir L-citrulina e óxido nítrico (NO), capaz de restringir a disseminação dos protozoários (22).

Concomitantemente, a resposta imune adaptativa desempenha seu papel através da ativação e maturação das células T CD4⁺ (Th1 ou Th2, Th17 e Treg) e CD8⁺ (Tc1 e Tc2). Deste modo as células T CD4⁺ quando estimuladas por componentes pró-inflamatórios, como a IL-12 induzem a maturação das células T CD4⁺ virgens em Th1. Por consequência a polarização dos linfócitos em Th1 acaba por produzir IFN- γ , que além de aumentar a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade do tipo 1 (MHC I), podem ativar os macrófagos a um estado leishmanicida através da produção de NO e espécies reativas de oxigênio (EROs), que resultam na eliminação do protozoário e na consequente contenção da infecção (23,24).

Por outro lado, a maturação de células T CD4⁺ em Th2 pode ser mediada pela presença da citocina IL-4, ativando macrófagos alternativamente (M2) capazes de modificar a via metabólica de NO. Ao serem ativados os macrófagos M2 produzem a arginase, que hidrolisa a L-arginina em ureia e ornitina, impossibilitando a produção de NO caracterizando um perfil de atividade anti-inflamatória (25); e em consequência observa-se a suscetibilidade do hospedeiro à infecção por *Leishmania* (26,27).

A diferenciação das células Th17 ocorre através do estímulo de citocinas como o TGF- β , IL-6, IL-1 β e IL-23 (28). Esta série de eventos leva a produção das citocinas IL-17 que induz o recrutamento e ativação dos neutrófilos, aumentando a produção de EROs que leva a eliminação dos protozoários (29). Por outro lado, a IL-17, assim como outras citocinas (IL-17F, IL-21 e IL-

22), coopera para a inflamação tecidual excessiva, que na ausência da regulação por IL-10 podem levar a lesão tecidual, podendo desempenhar um papel duplo na infecção por *Leishmania* sp. (30).

De modo geral, as células T reguladoras (Treg) exercem uma importante função na manutenção da tolerância imunológica no hospedeiro através da imunossupressão, resultando no controle da inflamação prejudicial (31). Na leishmaniose o controle imunológico da infecção se dá pelo equilíbrio da resposta pró-inflamatória mediada pela polarização das células Th1, responsáveis por controlar a replicação dos parasitos, assim como neutrófilos e células Th17 que contribuem para um estado inflamatório, auxiliando na eliminação do parasito, mas que também levam à patologia (32). Deste modo a atuação das células Treg medeiam uma resposta regulatória e imunossupressora importante para atenuar uma inflamação acentuada, mas que se predominante pode resultar na progressão da infecção, ou ainda, em infecção assintomática (30,33).

Por estes motivos, tanto o perfil de resistência quanto a suscetibilidade da infecção podem ser influenciados por células Treg, através da produção de citocinas imunorreguladoras (IL-10 e TGF- β) (32). Estudos anteriores mostraram que para infecção por *L. (L.) major* as células Treg podem reativar infecções secundárias ou tornar camundongos suscetíveis à infecção (34). Já em relação a *L. (L.) amazonensis* as células Treg podem controlar as respostas imunopatológicas (35).

Assim como as células T CD4⁺, as células T CD8⁺ exercem influência no perfil da patogênese na leishmaniose. De modo geral as células T CD8⁺ são ativadas pelo reconhecimento de peptídeos específicos apresentados pelo MHC I nas células apresentadoras de antígeno (APC) nos órgãos linfáticos periféricos e sua atividade citolítica ocorre por meio das proteínas perforina e granzima, as quais induzem a formação de poros na membrana e apoptose nas células alvo (36). Adicionalmente, a liberação de citocinas por meio das APCs e células T CD4⁺ acabam por influenciar a diferenciação das células T CD8⁺ virgens, sendo que o estímulo de IL-12 leva a diferenciação em células citolíticas do tipo 1 (Tc1); ao contrário da citocina IL-4, que estimula sua diferenciação para células citolíticas do tipo 2 (Tc2) (37). Portanto, além de desempenhar atividade citotóxica, as células T CD8⁺ podem concomitantemente estimular a suscetibilidade ou a resistência da infecção por *Leishmania* sp. por meio da subpopulação de Tc1 que estimula a produção de componentes pró-inflamatórios (como TNF- α e IFN- γ); e a população Tc2, que produz componentes anti-inflamatórios (como IL-4, IL-5 e IL-10) (38–40).

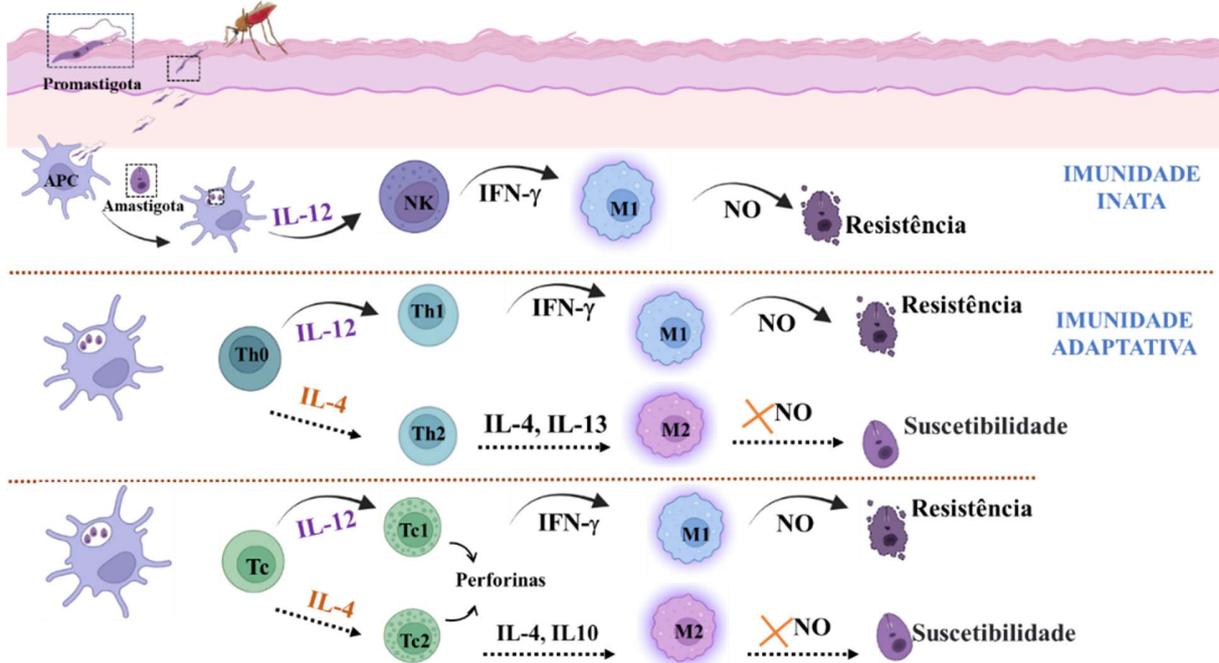


Figura 3. Ilustração demonstrando a resposta imune direcionada a resistência ou susceptibilidade na leishmaniose por células apresentadoras de antígenos (APC), macrófagos (M), células *natural killer* (NK), linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ Fonte: Adaptado de Passero, 2011(38). Th – T helper, Tc – T citotóxica, NO – óxido nítrico.

1.2. Formas clínicas de leishmaniose

Como abordado anteriormente, a leishmaniose é caracterizada por apresentar duas principais manifestações clínicas: a leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea. A LV é uma manifestação clínica causada por *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*; contudo, eventualmente algumas espécies dermatotrópicas podem visceralizar e ocasionar a LV, principalmente em pacientes imunossuprimidos (41). A LV é considerada uma das manifestações mais graves da leishmaniose, por levar ao óbito aproximadamente 95% dos casos não tratados corretamente, adicionalmente na LV ocorre o comprometimento dos principais órgãos imunes dos hospedeiros e os principais sinais clínicos mais característicos são hepatoesplenomegalia, febre, perda de peso e pancitopenia (42).

Na América Central, principalmente em Honduras, Costa Rica, El Salvador e Nicarágua na infecção por *L. (L.) infantum chagasi* em áreas endêmicas para LV também ocorre o desenvolvimento de lesões cutâneas não ulceradas na face e extremidades de pacientes, caracterizando a forma clínica conhecida como leishmaniose cutânea não ulcerada, ou atípica (LCNU) (43), que acomete principalmente crianças com mais de 6 anos e jovens adultos, ao contrário da LV que nesta região acomete principalmente crianças com idade inferior a 5 anos (44).

Entre o período de 1 à 3 anos posteriores ao fim do tratamento para leishmaniose visceral, alguns pacientes podem apresentar casos de complicação dérmica, caracterizando a leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) (45). A manifestação da LDPC é causada por *L. (L.) donovani* e ocorre em mais de 50% dos pacientes pertencentes aos países da África Oriental (Etiópia, Quênia, Sudão, Uganda) e tem ocorrência em até 10% nos pacientes do Sudeste asiático (Bangladesh, Índia, Nepal) (46). Existe divergência também no perfil das lesões encontradas nos pacientes em ambas regiões, sendo que no Sudeste asiático a LDPC se manifesta por lesões papulonodulares (polimórficas, enquanto na África Oriental a manifestação causa lesões hipomelanóticas (maculares) (47). Embora em nenhuma das regiões a manifestação seja uma ameaça à vida, a LDPC de fato, gera um estigma e afeta a qualidade de vida dos pacientes acometidos (48).

Em contrapartida, a forma cutânea apresenta um amplo espectro de manifestações que variam de acordo com a espécie infectante de *Leishmania* e a resposta imune do hospedeiro, podendo ser subdividida em leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD) e leishmaniose mucocutânea (LM) (5).

A LCL é considerada a forma mais frequente da leishmaniose, onde são encontrados aproximadamente 95% dos casos de LC, podendo ser causada por qualquer espécie de *Leishmania* dermatotrópica. Pacientes com LCL geralmente apresentam lesões cutâneas autocuráveis, com borda elevada e uma ulceração central, podendo ser encontradas no local do repasto sanguíneo do vetor e respectiva infecção. As lesões geralmente não são dolorosas e não se disseminam. Também é possível encontrar as mesmas lesões espalhadas pelo corpo, ou graves lesões crônicas, ulcerações com crostas podendo ser dolorosas, principalmente se coinfetadas por bactérias, caracterizando formas mais graves da LCL (49).

Por outro lado, na LCAD, que no Brasil é causada por *L. (L.) amazonensis*, os pacientes apresentam um quadro de imunodeficiência antígeno-específica e costumam apresentar lesões com grande quantidade de nódulos, pápulas e tubérculos, não ulcerados (13,50). Tais lesões possuem intensa quantidade de macrófagos parasitados e poucos linfócitos e células plasmáticas (51). Apesar de se apresentarem predominantemente em áreas expostas, as lesões também acabam se espalhando progressivamente para as demais extremidades do corpo, podendo envolver toda a superfície da pele e membrana mucosa, exceto a nasofaringe. Deste modo, a LCAD acaba sendo difícil de tratar e não possui a resolução espontânea (52–54).

A LM também é considerada uma das formas clínicas mais debilitante da LC, podendo ser destrutiva ou até mesmo fatal devido a gravidade das lesões e a ausência de boa resposta ao tratamento (45). Essa manifestação clínica é endêmica nas Américas, onde aproximadamente 90% dos casos ocorrem no Peru, Bolívia e Brasil, (55). Em sua caracterização clínica os sintomas podem ter início com inflamação, congestão, obstrução ou sangramento nasal e conforme a doença progride as lesões podem ocasionar destruição do septo nasal, lábios e palato, podendo causar deficiências e estigmas sociais severos, além de infecções disseminadas potencialmente letais (6,17).

1.3. Fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose

Embora a leishmaniose seja uma doença amplamente conhecida há muitas décadas, seu tratamento ainda é considerado desafiador, pois a eficiência das opções de fármacos atualmente disponíveis estão associadas a diversos fatores limitantes como a resistência de diferentes espécies de *Leishmania*, toxicidade dos órgãos e efeitos colaterais severos, alto custo e baixa seletividade em determinadas regiões (56).

Há séculos o antimônio é utilizado para fins medicinais, sendo historicamente conhecido por suas propriedades eméticas, que em baixas quantidades podem resultar em vômito (57). Todavia, seu uso clínico mais significativo durante o último século tem sido no tratamento da leishmaniose, onde é utilizado como tratamento de primeira linha desde 1920 (58,59). No ambiente intracelular, o antimonial pentavalente torna-se ativo somente após sua biorredução em antimônio trivalente, que é capaz de inibir a ação da tripanotiona redutase (TR), uma enzima que desempenha um papel fundamental na sobrevivência do parasito (60).

Tal inibição se torna importante pois os parasitos da família Trypanosomatidae são sensíveis ao estresse oxidativo e não possuem catalase ou glutationa peroxidase, enzimas responsáveis pelo controle redox em mamíferos; portanto, nesses protozoários o controle redox é realizado por uma cascata enzimática dependente de tripanotiona (61).

A cascata que dá início ao controle redox nos tripanossomatídeos (Figura 4A) é iniciada pela reação de NADPH e a enzima TR, que convertem a tripanotiona oxidada $[T(S)_2]$ para seu estado reduzido $(T[SH]_2)$ (62). Uma vez reduzida, a $T[SH]_2$ participa dos mecanismos redox no citosol e mitocôndria do parasito, envolvendo o conjunto de enzimas peroxirredoxinas: triparedoxina (TXN) e triparedoxina peroxidase (TXPN_x). Neste sentido, a TXN atua como substrato para TXPN_x, que em conjunto são capazes de reduzir o peróxido de hidrogênio em moléculas H₂O, assim como

reduzir outros hidroperóxidos orgânicos importantes para metabolismo oxidativo e nitrosativo produzidos pelos macrófagos durante a infecção (63).

No tratamento da leishmaniose, os antimoniais pentavalentes atuam na inibição da TR (Figura 4B), impedindo ação da cascata enzimática de tripanotona e a atuação das peroxirredoxinas no controle redox, o que conseqüentemente leva ao acúmulo de EROs culminando na morte do parasito (64,65).

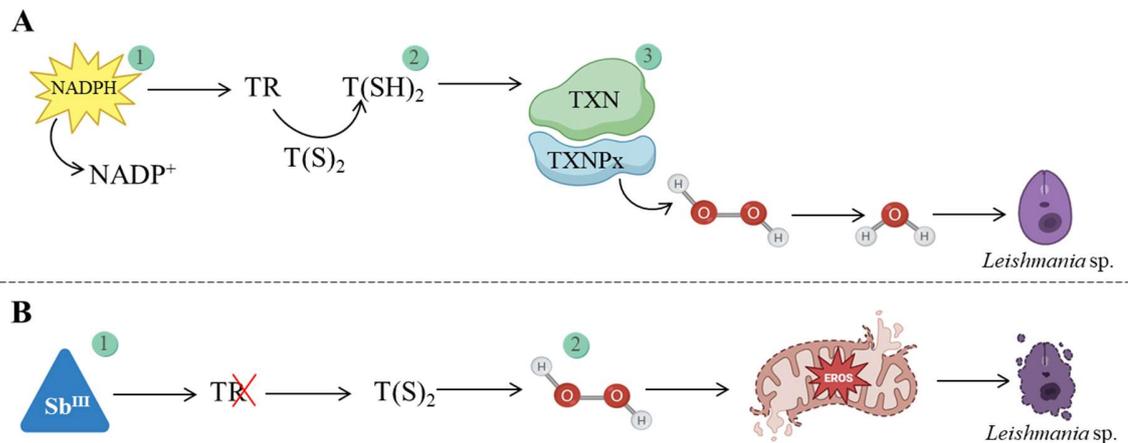


Figura 4. Cascata enzimática da neutralização de EROS pela TR em tripanossomatídeos (A), demonstrando a ação de TR a partir de NADPH (1); Redução de $T(S)_2$ para $T(SH)_2$ (2); mecanismo redox com TXN como substrato para TXNPx e eliminação de H_2O_2 , resultando na sobrevivência de *Leishmania* sp. (3). Ação do antimonial trivalente (B) demonstrando a inibição da TR, mantendo a tripanotona no estado oxidado (1); resultando no acúmulo de H_2O_2 , gerando estresse oxidativo e morte do protozoário (2). Fonte: Arquivo pessoal.

O tratamento com antimonial pentavalente (estibogluconato de sódio ou Pentostam[®] e antimoniato de meglumina ou Glucantime[®]) é realizado pela via intravenosa ou intramuscular (58). Porém mesmo em administração parenteral tal droga apresenta eficácia limitada (66,67). A taxa de cura no Brasil oscila entre 60 a 90%, e está associada ao desenvolvimento de cardiotoxicidade, pancreatite ou ainda, hepatotoxicidade em 15% dos pacientes durante o tratamento (68). O surgimento de parasitos resistentes aos antimoniais é uma preocupação constante, o que de fato vem impactando as taxas de cura, como observado em Bihar, na Índia, onde 60% dos casos são refratários ao tratamento com antimoniais (4,69,70).

Em casos onde os antimoniais não demonstram ser eficazes a anfotericina B acaba sendo utilizada como um quimioterápico alternativo, e por isso, considerado como tratamento de segunda linha para a leishmaniose (71). A anfotericina B é um antimicótico cujo mecanismo de ação consiste na capacidade do fármaco em se ligar ao ergosterol da *Leishmania*, resultando na formação

de poros na membrana celular do parasito. Por consequência, após a formação de poros ocorre o fluxo de íons, macromoléculas e água através da bicamada lipídica, causando um desequilíbrio hídrico e iônico, levando o parasito à morte (72). Embora tenham sido observadas altas taxas de eficácia durante o tratamento, a anfotericina B interage com o colesterol, principal componente da membrana celular de mamíferos, desencadeando efeitos colaterais graves, que incluem febre, calafrios, artralgia, náuseas, vômitos, cefaleia, além de nefrotoxicidade que é observado em aproximadamente 53% dos pacientes (73). Além disso, esse tratamento é prolongado (necessitando de doses diárias do fármaco pelo período de 15 à 30 dias) e requer acompanhamento médico, tornando-o insatisfatório para os pacientes (6,72).

Para tentar diminuir sua toxicidade, a anfotericina B vem sendo formulada em lipossomas, que em linhas gerais são vesículas unilamelares contendo 60 a 80 nm de tamanho, constituídas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e diestearoil fosfatidilglicerol de alta temperatura e estabilizada por colesterol em combinação com anfotericina B na bicamada lipossômica (74).

Após a administração do fármaco, via intravenosa, o transportador lipossomal permanece intacto por longos períodos de tempo no sangue e demonstra ser uma alternativa interessante ao tratamento, pois apresenta baixa toxicidade ao paciente e mantém a eficácia no tratamento em comparação com a Anfotericina B convencional (4).

Uma vez injetada na corrente sanguínea a formulação lipossomal da anfotericina B permanece intacta até chegar aos locais de infecção onde ocorre a captação do fármaco via células fagocíticas (75). A partir da fagocitose a formulação lipossomal permeia a membrana plasmática e é liberada no citoplasma das células infectadas, sem que ocorra a degradação das vesículas lipídicas e consequentemente sem causar dano as células hospedeiras (76). Após adentrar ao citoplasma da célula hospedeira, há uma interação do parasito e a formulação lipossomal, que se adere à parede celular da *Leishmania* (77). Em sequência a anfotericina B é liberada, e por possuir alta afinidade com esteróis, incluindo o ergosterol da *Leishmania*, leva a formação de poros na membrana celular de *Leishmania*, permitindo o extravasamento de componentes intracelulares, promovendo a morte do parasito (78). Entretanto, o custo do tratamento pode ser extremamente elevado para populações socioeconomicamente vulneráveis, limitando o uso da anfotericina B lipossomal (76).

Por fim, a miltefosina foi originalmente desenvolvida como uma droga antitumoral, mas tem sido considerada outra alternativa de segunda linha para o tratamento da leishmaniose, e a única disponível como tratamento oral (79). O mecanismo de ação da miltefosina consiste na alteração

do potencial da membrana mitocondrial do protozoário por meio da modificação do metabolismo fosfolipídico na membrana celular, que resulta na morte celular programada (80). Apesar de ser inicialmente considerado um medicamento com alta atividade terapêutica, com taxa de cura de 98% em humanos, os casos relatados na Índia e no Nepal começaram a apresentar resistência crescente ao tratamento, sugerindo que sua eficácia depende da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (7,81,82). No entanto, em países onde predominam *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*, a taxa de cura da miltefosina é de apenas 53%, significativamente inferior à taxa de cura dos antimoniais (83). Embora a administração oral seja considerada uma característica interessante, a miltefosina também induz efeitos colaterais significativos, incluindo toxicidade gastrointestinal, renal e hepática, além de teratogenicidade em gestantes (56).

1.4. Busca por um tratamento alternativo para o tratamento das leishmanioses

Diante do exposto acima, é possível considerar que os tratamentos disponíveis para leishmaniose não são ideais pois possuem inúmeros efeitos colaterais sistêmicos, e em algumas situações o alto custo impede que populações em vulnerabilidade financeira tenham acesso aos medicamentos com maior eficácia e menores efeitos colaterais. Adicionalmente, a baixa efetividade e a existência de parasitos resistentes são preocupações constantes (84,85). Desta forma, torna-se extremamente importante desenvolver novos medicamentos e novas terapias que contemplem um baixo custo, fácil aplicação, alta eficácia e que reduzam os efeitos colaterais (86).

Considerando que o maior número de casos registrados de leishmaniose se relaciona à LCL, torna-se importante a formulação de drogas para uso tópico como cremes ou mesmo loções, pois as mesmas são de fácil aplicação, não necessitam de monitoramento médico constante, não causam dor como as injeções e podem ser aplicados diretamente no local das lesões pelo próprio paciente, solucionando parte da problemática envolvendo a quimioterapia das leishmanioses (87).

Considerando a necessidade de se encontrar um novo tratamento voltando às leishmanioses, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com uma série de compostos de origem sintética e natural. Entre elas, destaca-se a 8-HQ, uma quinolina que apresenta alto índice de seletividade em formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (88).

As quinolinas são compostos aromáticos heterocíclicos à base de nitrogênio, que tem chamado a atenção de pesquisadores nas últimas décadas (89). Atualmente sabe-se que as principais fontes de quinolina incluem petróleo, processamento de carvão e óleo de xisto, além disso, as quinolinas estão inclusas em diversos produtos naturais, especialmente em alcaloides (90).

Em um contexto histórico, o quinino (derivado de quinolina) é um composto encontrado nas cascas da árvore Cinchona, que foi utilizado no tratamento de malária (91); em 1820 o composto foi isolado como princípio ativo e se tornou um dos primeiros isolados de quinolina relatados entre os inúmeros derivados existentes (92). O uso do quinino substituiu a utilização das cascas brutas no tratamento de malária, que se tornou uma das primeiras doenças a serem tratadas com um produto natural (93). Apesar de apresentar baixa eficiência e tolerabilidade, o quinino possui um papel historicamente importante no desenvolvimento de alcaloides de quinolina, bem como no tratamento de malária multirresistente (94).

A quinolina, de fato, foi extraída em 1834 do alcatrão de carvão, que continua sendo a maior fonte de extração comercial da quinolina (95). O composto começou a demonstrar grande versatilidade química e biológica, atuando como um agente antimalárico e anticâncer em potencial, despertando interesse de pesquisadores nas áreas de química medicinal, industrial, e química orgânica sintética (90,96). Consequentemente uma ampla variedade de derivados de quinolina começou a ser isolada de maneira natural e produzida de maneira sintética, pois a partir de uma matriz de origem natural pode-se obter diversos compostos sintéticos que apresentaram diferentes aplicações biológicas (97).

Entre estes compostos destaca-se a 8-hidroxiquinolina (8-HQ), que foi sintetizada pela primeira vez em 1953 e despertou um aumento exponencial de interesse por pesquisadores da área medicinal nas últimas duas décadas. Este composto apresenta uma estrutura heterocíclica bicíclica com um anel fenol fundido a um anel de piridina em dois átomos de carbono adjacentes (Figura 5) (98). Tais características conferem a 8-HQ ampla variedade de atividades farmacológicas, como neuroproteção, ação antitumoral, antimicrobiana e como agente antiparasitário (96,99).

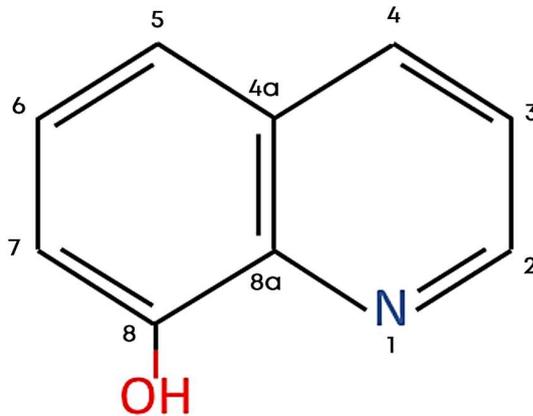


Figura 5. Estrutura química da 8-hidroxiquinolina. Fonte: Adaptado de Pubchem (100).

Neste sentido, a ação da 8-HQ demonstrou eliminar epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, com resultados similares ao Nifurtimox, medicamento de referência utilizado no tratamento da doença de Chagas (101). Foi demonstrado também que as derivações de 8-HQ apresentaram atividade para formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*, demonstrando índices de seletividades entre 11-48, superiores aos resultados apresentados pelo medicamento de referência para doença do sono. Além disso, também foi observado que todos os derivados interagiram com o DNA do parasito, eliminando o protozoário por estresse oxidativo (102).

Também foi demonstrado que camundongos machos MF1 infectados com *Schistosoma mansoni* tiveram uma redução do parasitismo hepático em 65% após administração oral de 8-HQ. Além disso, foi observada diminuição do volume dos granulomas hepáticos nos animais tratados com 8-HQ e o aumento dos níveis de anticorpos IgG anti-*S. mansoni*. Embora o praziquantel tenha reduzido a carga parasitaria em 62%, o medicamento referência no tratamento da esquistossomose humana não reduziu o volume dos granulomas hepáticos nem elevou os níveis de anticorpos IgG anti-*S. mansoni*, sugerindo que no tratamento por 8-HQ a atividade imunomoduladora poderia ter auxiliado na eliminação do protozoário (103).

Estudos anteriores já demonstraram que a 8-HQ inibe o crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* (104). Além disso, observou-se baixa toxicidade do composto à macrófagos murinos, diferente de fármacos utilizados atualmente no tratamento como a anfotericina B (104). Ainda, demonstrou-se que em formas promastigotas de *L. (L.) infantum* a 8-HQ alterou o potencial de membrana mitocondrial, por meio da depolarização da membrana após 1 hora de incubação, induzindo a morte celular programada

nesses parasitos, sugerindo uma ação seletiva (104). Em trabalhos anteriores abordando a infecção experimental por *L. (L.) infantum* ou *L. (L.) amazonensis* também foi observada a diminuição expressiva no diâmetro das lesões cutâneas e carga parasitária em camundongos BALB/c tratados subcutaneamente com 8-HQ e clioquinol; adicionalmente, foi demonstrado que a 8-HQ induziu a polarização da resposta imune Th1 (105,106). Reforça-se que não foram relatados quaisquer danos hepáticos ou renais durante o tratamento com a 8-HQ e o clioquinol em animais experimentais (107); sugerindo que a 8-HQ deva possuir características importantes para o desenvolvimento de um novo fármaco direcionado à leishmaniose.

Embora a ação leishmanicida da 8-HQ já tenha sido demonstrada, até o momento nenhum estudo apresentou a ação *in vitro* deste composto em formas promastigotas e amastigotas de *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (L.) infantum* (agente etiológico da leishmaniose cutânea atípica), *L. (L.) guyanensis* e *L. (L.) shawi*. Adicionalmente, não há estudos que demonstrem o potencial terapêutico deste composto administrada de maneira tópica nas leishmanioses. Neste contexto, seria de extrema importância desenvolver uma terapia tópica com a 8-HQ, pois embora o composto tenha sugerido desempenhar ação multiespectral em *Leishmania*, os estudos *in vivo* elaborados até então abordaram o uso do composto com o tratamento via parenteral.

Contudo, atualmente um dos maiores desafios relacionados a quimioterapia da leishmaniose é desenvolver um tratamento mais humanizado, em que o próprio paciente seja capaz de gerir evitando, por exemplo, a hospitalização e todos os custos associados a ela. Portanto o desenvolvimento de uma medicação de administração tópica representaria um marco importante no tratamento da leishmaniose cutânea.

OBJETIVOS

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o potencial leishmanicida multiespectral *in vitro* da 8-HQ e avaliar sua atividade terapêutica formulada em creme (base de Beeler) para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea experimental causada por *L. (L.) amazonensis*.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial leishmanicida da 8-HQ em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V) shawi*;
- Avaliar o potencial citotóxico da 8-HQ em macrófagos;
- Produzir cremes contendo 8-HQ e avaliar seus tamanhos de partículas;
- Avaliar a permeação cutânea dos cremes contendo 1 ou 2% de 8-HQ;
- Avaliar as alterações histológicas que os cremes contendo 1 ou 2% de 8-HQ induzem em camundongos BALB/c;
- Avaliar a eficácia terapêutica dos cremes contendo 1 ou 2% de 8-HQ na leishmaniose cutânea americana experimental.

MÉTODOS

3. Métodos

3.1. Materiais

O meio RPMI 1640 (Thermo Scientific, EUA) foi suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB), 1% de piruvato, 1% de aminoácidos não essenciais, 10 µg/mL de gentamicina e 1.000 U/mL de penicilina, 0,1% de 2-mercaptoetanol (R10). O meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich, EUA) foi suplementado com 10% de SFB, 10 µg/mL de gentamicina e 1.000 U/mL de penicilina (S10). A miltefosina e 8-hidroxiquinolina (pureza > 99%) foram obtidas da Sigma-Aldrich (EUA). O Glucantime® foi obtido da Sanofi-Aventis (São Paulo; Brasil). A pureza dos compostos foi confirmada através de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) e por cromatografia líquida de alta eficiência (UHPLC).

3.2. Parasito

As cepas *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269), *L. (L.) infantum* (MHOM/HND/2017/AMA-65); *L. (V.) guyanensis* (IUMB/BR/85/M9945); *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/1993/M14263); *L. (V.) naiffi* (MHOM/BR/1979/M5533) e *L. (V.) shawi* (MHOM/BR/96/M15789) foram gentilmente doadas pela Prof^ª Dr^ª Marcia Dalastra Laurenti, do criobanco do “Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas”, da Faculdade de Medicina da USP, e pelo Prof. Dr. Fernando T. Silveira do criobanco do “Laboratório de Leishmaniose Prof. Dr. Ralph Laison”, Departamento de Parasitologia, Evandro Chagas Instituto, Ministério da Saúde, Belém, Pará, Brasil. Os protozoários foram cultivados em meio de cultura S10. Em todos os experimentos, foram utilizados parasitos em fase estacionária de crescimento, com quatro passagens de cultura para os experimentos *in vitro* e na primeira passagem para experimentos *in vivo*.

3.3. Avaliação do potencial leishmanicida da 8-HQ em formas promastigotas

Para avaliar o potencial leishmanicida da 8-HQ foram utilizadas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* que foram cultivadas em meio S10 e incubadas a 25° C, até atingirem a fase estacionária de crescimento; posteriormente foram coletadas, centrifugadas (1200 × g, 10 min, 4° C) e contadas em câmara de Neubauer, onde tiveram a concentração do parasito ajustada para 2×10⁶ parasito/poço. A 8-HQ foi solubilizada com dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionada a placa de cultura de 96 poços na concentração de 0,08 a 100 µg/mL, juntamente aos parasitos; a miltefosina

foi utilizada como fármaco controle (0,08 a 100 µg/mL). O controle positivo foi composto por meio S10 com 1% de DMSO e os parasitos (2×10^6 parasito/poço). O controle negativo foi composto apenas por meio S10 com 1% de DMSO. As placas de 96 poços foram incubadas a 25° C durante 24 ou 72 horas, posteriormente foram centrifugadas ($1200 \times g$, 10 min, 4° C), lavadas três vezes com 200 µL de tampão fosfato (PBS); e a viabilidade dos parasitos foi analisada com o reagente PrestoBlue® (Thermo, EUA) diluído em meio S10 (1:20). Após ser adicionado às células, o PrestoBlue® é reduzido por enzimas mitocondriais de parasitos viáveis, tornando-se avermelhado e altamente fluorescente. Assim, poços com alta fluorescência estão associados a uma alta porcentagem de células viáveis; contrariamente, amostras com coloração azul apresentam baixa viabilidade celular. Após 45 minutos de incubação as placas foram levadas a um leitor de microplacas, com uma sonda de fluorescência com 416 nm de excitação e 574 nm de emissão. A concentração efetiva de 50% (CE₅₀) foi estimada usando o software GraphPad Prism 8.0.

3.4. Macrófagos derivados da medula óssea (MMO)

Para produção de MMO utilizaram-se fibroblastos de linhagem celular L929 que foram cultivados em meio R10, e quando as células apresentaram 80% de confluência foram coletadas das garrafas de cultura utilizando um *cell scraper* (Corning®, EUA), contadas com solução Trypan Blue 0.4% (ThermoFisher, EUA), ajustadas a 5×10^6 de células em 80 mL de meio R10 e mantidas durante 10 dias em estufa a 37° C. Na fase final de seu ciclo de vida, o meio sobrenadante (LCCM) rico em M-CFS (fator estimulador de colônia de macrófagos/ monócitos) foi coletado, esterilizado por filtração (0,32 µm) e armazenado à -20° C.

Camundongos BALB/c com 7 semanas de idade foram eutanasiados segundo o protocolo determinado pelo comitê de ética no uso de animal (CEUA) n° 1648/2022, e o fêmur e tibia foram coletados assepticamente. As epífises destes ossos foram cortadas, e o conteúdo da medula óssea foi extraído injetando solução salina balanceada de Hanks (HBSS) no canal da medula. A medula óssea foi submetida a duas etapas de lavagem a 2000 RPM, 5 min, 4° C, com HBSS. Em seguida 0,17 M de NH₄Cl (7,4 pH) foi incorporado aos glóbulos vermelhos, e incubados à 4° C durante 2 minutos. Após o período estipulado o HBSS foi adicionado, interrompendo a reação de lise de eritrócitos; as células foram centrifugadas a 2000 RPM, 5 min, 4° C e o sobrenadante foi descartado.

As células foram semeadas em placas de Petri estéreis tratadas para cultura de tecidos em R10 juntamente com 15% de meio LCCM, como uma fonte de fator estimulador de colônia-1 (CSF-1),

em uma incubadora à 35° C com 5% de CO₂. Após a incubação de 24 h as células não aderidas a placa de cultura foram coletadas, adicionadas em placas de Petri estéreis com R10 e 15% de LCCM, e nos dias 2; 3; 5 e 7 do experimento foram suplementadas com 15% de LCCM.

No oitavo dia, as células aderentes foram coletadas com auxílio de um *cell scraper*, contadas em câmara de Neubauer e adicionadas em placas estéreis de 96 poços ou em lamínulas redondas para placas de 24 poços.

3.5. Teste de citotoxicidade

Os MMOs coletados foram contados, ajustados na concentração de 10⁶ macrófagos/poço, adicionados a uma placa de cultura de 96 poços juntamente ao meio R10 e incubados por 24 h em uma incubadora umidificada à 35° C e 5% de CO₂. Após o determinado período de incubação a 8-HQ ou miltefosina (0,08 a 100 µg/mL) foram adicionadas aos macrófagos, e as células foram incubadas novamente por 24 h em uma incubadora umidificada à 35° C e 5% de CO₂. A citotoxicidade dos compostos foi analisada 24 e 72 horas depois da adição dos fármacos. Os MMO controles foram incubados apenas com R10. Após 24 ou 72 h de incubação as células foram centrifugadas a 1200 x g, 10 min, 4° C e os macrófagos lavados três vezes com 200 µL de PBS. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada com PrestoBlue[®], de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fischer, EUA). A concentração citotóxica 50% (CC₅₀) foi estimada usando o software GraphPad Prism 8.0. (108). O índice de seletividade (IS) da 8-HQ foi determinado pela razão entre CC₅₀ e CE₅₀ (109).

3.6. Infecção de macrófagos

Para tanto os MMOs foram ajustados em 10⁶ macrófagos/poço, adicionados em lamínulas redondas em placa de 24 poços, juntamente ao meio R10 e incubados por 24 h à 35° C. Após a incubação os macrófagos foram infectados com: *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*, na proporção de 10 parasitos por 1 macrófago e incubados por 24 h uma incubadora umidificada com 5% de CO₂ à 35° C. Subsequentemente as placas foram lavadas com 500 µL de PBS à 35° C por três vezes, retirando os parasitos não aderidos e a 8-HQ ou miltefosina (1,25 – 10 µg/mL) foram adicionadas a cultura. As placas foram incubadas durante 24 e 72 h. Os controles infectados foram cultivados apenas com R10 e 1% de DMSO. Após os períodos de incubação, as lamínulas foram retiradas das placas de 24 poços, secas à temperatura ambiente, fixadas em metanol e coradas com Giemsa (Sigma-

Aldrich, EUA). Para cada lamínula ao menos 100 células foram quantificadas e os índices de infecção (II) foram determinados por meio da equação:

$$II = \frac{\% \text{ macrófagos infectados} \times \text{amastigotas internalizadas}}{\text{Macrófagos infectados}}$$

3.7. Determinação da produção de óxido nítrico intracelular

Os MMO foram incubados com R10 durante 24 h em uma placa preta estéril de 96 poços, em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂ e 35° C por 24 h. Após o período determinado, a infecção foi realizada na proporção de 10:1 (parasitos : macrófagos), por promastigotas das seguintes espécies: *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V) shawi*. Vinte e quatro horas depois, os MMOs foram lavados três vezes com 200 µL de PBS a 35° C, para retirar parasitos não aderidos, e a 8-HQ (1,25 a 10 µg/mL) foi incubada por 24 ou 72 h. Para os controles foram adicionados apenas meio R10, e 100 ng/mL de LPS (Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado ao controle positivo. A cada período experimental, as células foram lavadas três vezes com 200 µL de PBS aquecido, seguido pela incubação com 0.2 µL de sonda DAF-FM diacetato/poço (5 mM diluído em 20 µL DMSO), por 60 minutos. Após permear a membrana celular passivamente o reagente DAF-FM diacetato é desacetilado por esterases intracelulares e então é convertido a DAF-FM, que na presença de NO torna-se reduzido a benzotriazol fluorescente. Em sequência três etapas de lavagens com PBS foram realizadas e as placas foram lidas em um leitor de microplacas fluorescentes, com emissão de 515 nm e excitação de 495 nm. Não houve qualquer interferência nos espectros de fluorescência da reação pelos poços brancos.

3.8. Preparo dos cremes contendo 8-HQ

Para produzir 10 g da base de Beeler os componentes foram separados em dois recipientes de vidro distintos compondo a fase aquosa (FA) e fase lipídica (FL). Deste modo, para FL foram utilizados: cera branca (0,1 g); álcool cetílico (1,5 g) (Sigma-Aldrich, EUA) e 2 mg de butilhidroxitolueno. Para FA utilizou-se: lauril sulfato de sódio (0,2 g), propilenoglicol (1 g) e água destilada (QSP 10 g). As fases FA e FL foram fundidas em banho-maria à 70° C. Subsequentemente os componentes de FA foram dispersos em FL e agitados energicamente para produzir o creme base, até que a mistura atingisse um aspecto homogêneo, branco e consistente. O composto ativo 8-HQ a 1% (0,1 g) e 2% (0,2 g) foi disperso em 50 µL de propilenoglicol e

incorporado à base de Beeler utilizando um almofariz. Os cremes foram acondicionados em frascos de vidro âmbar de 30 mL, isolados de luminosidade, e sua aparência física foi avaliada visualmente por um período de seis meses para detectar possíveis alterações na aparência.

3.9. Tamanho de partículas

Amostras dos cremes 1 e 2% foram diluídas (1:100) em água deionizada e a determinação do tamanho das partículas e distribuição do creme 8-HQ foi detectada pelo analisador de tamanho de partículas (Microtrac S3500, Microtrac, EUA). O tamanho das partículas de cada creme foi determinado por meio da porcentagem referentes ao diâmetro (μm); sendo que 10, 50 ou 90% das partículas (D10, D50 e D90) possuíam o diâmetro com valor similar ao valor fornecido (110). Cada amostra foi medida em triplicata.

3.10. Estudos de permeação cutânea empregando por células de Franz

Os estudos de permeabilidade em células de Franz foram realizados com dois modelos de membranas diferentes, as artificiais (Strat-M[®]) e pele suína, onde parâmetros de permeabilidade de cada modelo de membrana foi avaliado individualmente.

Para avaliar a permeabilidade em pele suína foram utilizados fragmentos pele provenientes da orelha de suínos com 3 meses de idade. A pele (espessura média: $1,66 \pm 0,16$ mm) foi limpa, retirada da cartilagem e preparada como membrana seguindo o protocolo estabelecido para utilização de peles de suínos em experimentos *in vitro*, por Silva et al (111).

As células de Franz foram montadas a partir do compartimento doador (área de 1.766 cm²); do compartimento receptor (capacidade de 12 mL); e as membranas, que foram fixadas entre ambos compartimentos. Antes de iniciar o experimento a membrana foi umidificada com PBS, adicionado através do compartimento doador; e o compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato (pH 5,5) e metanol (1: 1, v:v). Subsequentemente as células de Franz foram alocadas em banho maria a 35° C por 30 minutos. Posteriormente o PBS da câmara receptora foi removido com auxílio de pipeta e gaze estéril; 100 mg dos cremes 1% e 2% de 8-HQ foram adicionados sobre as membranas por meio do compartimento doador, que foi vedado.

Aproximadamente 1 mL de amostra foi retirada do compartimento receptor de Franz nos seguintes tempos de coleta: 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240 e 360 minutos); as amostras foram armazenadas a -20° C, e o compartimento receptor foi preenchido novamente com tampão fosfato e metanol após cada coleta. Após a última coleta (360 min) as amostras de pele foram limpas com

um cotonete impregnado com etanol para remover o excesso de creme. Cada amostra foi dividida em dois fragmentos: o primeiro foi submetido a rotina histológica para demonstrar possíveis alterações estruturais causadas por 8-HQ; e o segundo fragmento foi pesado, homogeneizado com 2 mL de tampão PBS (pH 7,4), diluído 1:2 com metanol e centrifugado (10 min, 10.000 RPM) (110). O sobrenadante submetido a análise por UHPLC para determinar a quantidade de 8-HQ retida na membrana ($\mu\text{g}/\text{mg}$).

Adicionalmente foram testadas membranas artificiais Strat-M[®] (Transdermal Diffusion Test, 25 mm, Sigma-Aldrich, Madrid) com 0,33 mm de espessura, projetadas para mimetizar a pele humana. As propriedades físicas e químicas das Strat-M[®] permitem que compostos realizem a permeação de modo similar ao que ocorre na pele humana, podendo exibir correlações melhores se comparadas a outros modelos de membranas biológicas (112). A composição de multicamadas associadas a estrutura lipídica das membranas artificiais exibe características semelhantes ao estrato córneo humano; além disso, a membrana é constituída por uma camada porosa que se assemelha às camadas da epiderme e da derme (113).

As membranas artificiais (Strat-M[®]), assim como as membranas obtidas por pele de suíno, foram montadas entre a câmara doadora e receptora de células de difusão de Franz repetindo o mesmo processo descrito anteriormente, e 100 mg de cremes contendo 1% ou 2% de 8-HQ foram adicionados ao compartimento doador em contato estrito com as membranas. Amostras de 1 mL foram retiradas após 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240 e 360 minutos; a câmara receptora foi imediatamente reabastecida com tampão fosfato e metanol pré-aquecido após a retirada das amostras nos tempos indicados anteriormente. Após a última coleta as membranas artificiais foram limpas com um cotonete para remover o excesso de creme, diluídas tampão fosfato (pH 5,5) e metanol (1:1, v:v) e centrifugadas (10 min, 10.000 RPM) (110). O sobrenadante submetido a análise por UHPLC para determinar a quantidade de 8-HQ retida na membrana ($\mu\text{g}/\text{mg}$).

As amostras foram analisadas por UHPLC (modelo Ultimate 3000 Standard Quaternary System). Os picos de 8-HQ foram detectados com o programa (Chromleon 7.3.1.6535) e a detecção foi realizada à 246 nm. Para tanto foi utilizada uma coluna de UHPLC de fase reversa Analítica Kinetex EVO 5mm C18 (150 x 4,6 mm). A fase móvel foi composta por uma eluição de acetonitrila e metanol (52:48); a vazão foi ajustada em 1 mL/min e foram injetados 10 μL das amostras. A curva padrão com 8-HQ foi construída com as concentrações de 0,38 - 400 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$

($R^2 > 0,9906$), e a análise de regressão foi utilizada para calcular as inclinações e interceptos da porção linear de cada gráfico.

O fluxo em estado estacionário (J_{ss}), o coeficiente de permeabilidade (P), o coeficiente de difusão (D) e o tempo de latência foram estimados conforme descrito anteriormente por Lalatsa et al (114). Os parâmetros de permeabilidade nas membranas foram calculados pelas seguintes equações:

A equação do fluxo estacionário foi calculada pela razão entre quantidade de 8-HQ permeando a membrana (dC) em um determinado período de tempo (dX), versus a área de superfície de contato do para os cremes (A). Valores expressos em $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

$$J_{ss} = \frac{dC}{dX} \times A \quad \text{Equação do fluxo estacionário (1)}$$

A equação do coeficiente de permeabilidade (P) indica a razão entre o fluxo estacionário (J_{ss}) e a quantidade de creme aplicada ao compartimento doador (cd). Valores expressos em mm^2/h .

$$P = J_{ss}/cd \quad \text{Equação do coeficiente de permeabilidade (2)}$$

A equação do coeficiente de difusão (D) foi calculada usando a espessura da membrana (h) versus o coeficiente de permeabilidade (P). Valores expressos em $\mu\text{m}/\text{h}$

$$D = h \times P \quad \text{Equação do coeficiente de difusão (3)}$$

3.11. Animais experimentais e considerações éticas

Os camundongos BALB/c machos de aproximadamente 8 semanas de idade foram obtidos do Centro de Bioterismo do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP), alojados de acordo com as normas do Comitê de Bem-Estar Animal e tiveram acesso a comida e água *ad libitum* durante todo o estudo, sob um ciclo de luz de 12 horas.

O estudo em questão utilizou os parâmetros determinados pelo Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, do Conselho Nacional de Experimentação Animal. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP1648/2022). Para todos os procedimentos experimentais, os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e eutanasiados com dose letal de pentobarbital via intraperitoneal.

3.12. Animais saudáveis tratados com cremes 1 e 2%

Após o período de aclimação, 20 camundongos BALB/c machos foram divididos em 4 grupos saudáveis (GS) e submetidos diariamente ao tratamento tópico na base da cauda com 1.6 mg do creme 1% de 8-HQ (GS1); creme com 2% de 8-HQ (GS2); base de Beeler (GS3); e ao tratamento por Glucantime[®] (50 mg/kg) pela via intradérmica (GS4). Os animais foram tratados uma vez ao dia, durante 14 dias. Após o período experimental os animais foram eutanasiados, tiveram os fragmentos de pele retirados com auxílio de *punch* dermatológico para biópsia (6 mm); subsequentemente foram fixados em formaldeído 10% tamponado, submetidos a rotina histológica e corados com hematoxilina e eosina, onde foram avaliadas possíveis alterações histológicas.

3.13. Infecção e tratamento

Após o período de aclimação, 30 camundongos BALB/c foram divididos em seis grupos experimentais, contendo cinco animais por grupo. Os cinco animais pertencentes ao grupo saudável (G1) receberam apenas cloreto de sódio 0,9% (p/v) pela via subcutânea e os demais animais foram infectados na base da cauda pela mesma via, com 10^6 formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na fase estacionária de crescimento em um inóculo de 20 μ L.

Quatro semanas após a infecção, camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos: grupo 2 (G2) constituindo o controle infectado; Grupo 3 (G3) e Grupo 4 (G4) foram constituídos por animais infectados e tratados com a formulação contendo 1 ou 2% de 8-HQ pela via tópica, respectivamente; O grupo 5 (G5) foi tratado apenas com formulação base de Beeler por via tópica; e o grupo 6 (G6) foi tratado com 50 mg/kg de Glucantime[®] por via intralesional. O tratamento foi iniciado na quinta semana pós-infecção (PI), e os animais foram tratados por 14 dias consecutivos, uma vez ao dia. Para todas as aplicações tópicas foram utilizados 1.6 mg de creme por animal. As condições físicas dos animais foram monitoradas uma vez por semana. Ao fim do experimento, os animais foram eutanasiados, e os fragmentos de pele e linfonodo foram coletados para realização de experimentos visando avaliar o parasitismo tecidual, assim como as principais alterações histopatológicas dos animais submetidos ao tratamento. Todos os animais sobreviveram até o final do estudo. Os experimentos foram repetidos três vezes.

3.14. Evolução da lesão e avaliação da carga parasitária

O curso clínico do desenvolvimento da lesão foi avaliado em todos os animais de cada grupo (G1 à G6), uma vez por semana, com o auxílio de um micrômetro digital com faixa de 0-25 mm e precisão de 0,001 mm (Mitutoyo[®], EUA).

A carga parasitária na pele e linfonodo inguinal foi determinada usando o ensaio de diluição limitante quantitativa. Para isso, um fragmento de pele da base da cauda e o linfonodo inguinal obtido de cada grupo experimental (G1 à G6) foi coletado assepticamente, pesado e homogeneizado em meio S10 com auxílio de *cell strainer* (Corning[®], EUA) estéril individual, com poros de 40 µm de espessura, diluídos em meio S10 (1:1000) e armazenados em -20° C. O volume de 200 µL do material homogeneizado e diluído (1:1000) de cada órgão foi adicionado na primeira coluna das placas de cultura de 96 poços; os demais poços foram preenchidos com 150 µL de meio S10. Posteriormente uma alíquota de 50 µL foi coletada da primeira coluna das placas e submetida a 12 diluições seriadas (1:4). Foram realizadas quadruplicatas para cada fragmento avaliado. As placas foram incubadas em estufa a 25° C durante 10 dias; posteriormente foram examinadas e o número de parasitos viáveis foi determinado com base na maior diluição que as promastigotas puderam crescer após os 10 dias de incubação.

3.15. Avaliação da produção de IL-4 e IFN-γ

Os linfonodos inguinais dos diferentes grupos foram coletados assepticamente e macerados em 1 mL de meio R10 com auxílio de *cell strainer* (Corning[®], EUA) estéril individual, com poros de 40 µm de espessura. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 10.000 RPM, 5 min, 4° C e os sobrenadantes foram coletados e submetidos ao ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) sanduíche, para quantificar citocinas IL-4 e IFN-γ (ThermoFisher, EUA).

Para tanto, as placas de ELISA (Corning[®], EUA) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de solução tampão e anticorpo de captura (*anti mouse*; IL-4 ou IFN-γ) e incubadas *overnight* à 4° C. Em seguida os poços foram aspirados e lavados 3 vezes com 250 µL de solução de lavagem (Tween20 e PBS 1X, 1:1000). Posteriormente, 200 µL da solução de bloqueio (ELISPOT) foi adicionada em cada poço e a placa foi incubada por 1 h à 25° C. Em seguida a placa de ELISA foi submetida a mais três lavagens com solução de lavagem. Para o delineamento da curva padrão foram utilizadas duplicatas contendo 8 concentrações conhecidas das seguintes proteínas recombinantes IL-4 (4 a 500 pg/mL), e IFN-γ (16 a 2000 pg/mL). Nos poços determinados como branco triplicatas com 100 µL de solução ELISPOT foram adicionados; nos poços restantes foram

adicionados 100 μ L das amostras de sobrenadante dos linfonodos inguinais dos diferentes grupos experimentais (G1 à G6) e as placas foram incubadas à 25° C por 2 h.

Após o período de incubação os poços foram lavados 5 vezes com solução de lavagem. Em seguida, foi adicionado 100 μ L dos anticorpos de detecção (anti-IL-4 ou anti-IFN- γ) conjugados com biotina e incubados por 1 h em temperatura ambiente. Após este período, os poços foram lavados 5 vezes e 100 μ L de estreptavidina conjugada a peroxidase (HRP) (enzima com alta especificidade à biotina), foi adicionada à reação e incubada por 30 minutos à 25° C. Os poços foram lavados 7 vezes, e então 100 μ L de solução substrato tetrametilbenzidina (TMB) foram adicionados. Ao final de 15 minutos a reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de H₂SO₄ (2N). A placa foi lida com sonda de 450 nm.

3.16. Análise estatística

Todos os dados obtidos nos experimentos foram normalizados em relação ao controle. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 8.0 e o teste ANOVA foi utilizado para classificar as diferenças entre os grupos. A significância estatística foi fixada em $p < 0,05$ (115).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade da 8-HQ em formas promastigotas e amastigotas

Os estudos avaliando a concentração efetiva 50% (CE₅₀) da 8-HQ em *Leishmania* sp. (Tabela 1), demonstram que as promastigotas de *L. (V.) shawi* foram mais suscetíveis ao composto após 24 h incubadas (CE₅₀= 0,20 ± 0,03 µg/mL). Por outro lado, as promastigotas de *L. (V.) lainsoni* demonstraram maior suscetibilidade a 8-HQ às 72 h de incubação (CE₅₀= 0,06 ± 0,01 µg/mL) (Figura 6). Embora a 8-HQ também tenha eliminado *L. (L.) amazonensis*, é importante ressaltar que essa foi a mais resistente entre todas as espécies testadas em 24 e 72 h de incubação, apresentando a CE₅₀ de 2,9 ± 0,3 e 1,1 ± 0,1 µg/mL, respectivamente (Tabela 1).

Em sequência, a incubação de 8-HQ durante 24 e 72 h resultou na CE₅₀ de 2,1 ± 0,2 e 0,3 ± 0,1 µg/mL para promastigotas de *L. (L.) infantum*, além da CE₅₀ de 0,34 ± 0,08 e 0,13 ± 0,03 µg/mL para *L. (V.) guyanensis*. Já a incubação do composto com *L. (V.) naiffi* demonstrou a CE₅₀ igual a 0,8 ± 0,1 e 0,53 ± 0,08 µg/mL, seguidas pela atividade em *L. (V.) shawi*, com a CE₅₀ de 0,25 ± 0,03 e 0,30 ± 0,08 µg/mL quando incubadas durante 24 e 72 h, respectivamente.

A miltefosina foi utilizada como fármaco controle e também demonstrou exercer atividade leishmanicida nas espécies avaliadas. Deste modo, em 24 h de tratamento, as formas promastigotas de *L. (V.) shawi* demonstraram maior sensibilidade; já em 72 h, as promastigotas de *L. (V.) guyanensis* foram mais suscetíveis. Em contrapartida, foi observado também que as formas promastigotas de *L. (V.) naiffi* foram as mais resistentes em 24 h, assim como *L. (L.) amazonensis* às 72 h (Tabela 1).

A concentração citotóxica 50% (CC₅₀) foi determinada em macrófagos, sendo demonstrado que nas respectivas 24 e 72 h de incubação, tanto a 8-HQ (36,3 ± 2,7 e 33,6 ± 2,2 µg/mL), quando a miltefosina (CC₅₀ de 42,9 ± 1,3 e 32,8 ± 12,0 µg/mL) demonstraram valores relativamente aproximados em ambos períodos avaliados.

Tabela 1. A determinação da Concentração efetiva 50 (CE₅₀) foi realizada em promastigotas das seguintes espécies: *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*. Macrófagos foram utilizados para a determinação da Concentração Citotóxica 50 (CC₅₀). As promastigotas e macrófagos foram incubados com 8-HQ ou miltefosina durante 24 ou 72 h. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes. *8-HQ – 8-hidroxiquinolina; * Milt – miltefosina. Os índices de seletividade (IS) foram expressos pela razão entre CC₅₀ e CE₅₀ e os resultados expressos por média e erro padrão a partir de três experimentos independentes.

Promastigotas	CE ₅₀ (µg/mL) e Índice de Seletividade (IS)			
	24 h		72 h	
	8-HQ	Milt	8-HQ	Milt
<i>L. (L.) amazonensis</i>	2,9 ± 0,3	8,5 ± 0,4	1,1 ± 0,1	16,1 ± 0,1
	IS (12,5)	IS (5,0)	IS (30,5)	IS (2,0)
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	2,1 ± 0,2	19,3 ± 1,6	0,3 ± 0,1	7,5 ± 1,5
	IS (17,3)	IS (2,2)	IS (98,8)	IS (4,4)
<i>L. (V.) guyanensis</i>	0,34 ± 0,08	5,0 ± 1,3	0,13 ± 0,03	1,8 ± 0,3
	IS (121)	IS (8,6)	IS (336)	IS (18,2)
<i>L. (V.) lainsoni</i>	0,6 ± 0,1	5,3 ± 0,1	0,06 ± 0,01	2,4 ± 0,2
	IS (60,5)	IS (8,1)	IS (560)	IS (13,7)
<i>L. (V.) naiffi</i>	0,8 ± 0,1	23,5 ± 5,7	0,53 ± 0,08	13,7 ± 0,5
	IS (45,4)	IS (1,8)	IS (67,2)	IS (2,4)
<i>L. (V.) shawi</i>	0,25 ± 0,03	1,79 ± 0,09	0,31 ± 0,08	2,4 ± 0,6
	IS (181)	IS (25,2)	IS (108,4)	IS (13,7)
	CC ₅₀ (µg/mL)			
Macrófagos	36,3 ± 2,7	42,9 ± 1,3	33,6 ± 2,2	32,8 ± 12,0

Nas formas amastigotas (Tabela 2), observou-se que em 24 h de incubação com 8-HQ, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) shawi* foram as espécies mais sensíveis (CE₅₀ = 0,17 ± 0,09 e 0,16 ± 0,01 µg/mL) enquanto as amastigotas de *L. (L.) infantum* foram as mais resistentes (CE₅₀ = 2,0 ± 0,8 µg/mL); Além disso, a 8-HQ induziu uma atividade leishmanicida intermediária em *L. (L.) amazonensis* (CE₅₀ = 1,9 ± 0,1 µg/mL), *L. (V.) guyanensis* (CE₅₀ = 0,8 ± 0,1 µg/mL) e *L. (V.) naiffi* (CE₅₀ = 0,45 ± 0,02 µg/mL). Em 72 h de incubação, as amastigotas intracelulares de *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) guyanensis* apresentaram alta sensibilidade à 8-HQ (CE₅₀ = 0,0323 ± 0,0002 e 0,039 ± 0,002 µg/mL, respectivamente) (Figura 6), seguidas por *L. (L.) infantum* e *L. (V.) shawi*; comparativamente, as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram as espécies mais resistentes à 8-HQ (Tabela 2 e Figura 6). As formas amastigotas intracelulares de *L. (V.) lainsoni* tratadas com miltefosina foram mais sensíveis, em contraste a espécie *L. (L.) amazonensis*, demonstrou ser a

mais resistentes em 24 h de incubação. Em sequência, a atividade da miltefosina em 72 h demonstrou maior sensibilidade para amastigotas de *L. (L.) infantum*, em contraste a maior resistência apresentada pelas formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Tabela 2).

Tabela 2. Para determinação da Concentração efetiva 50 (CE₅₀) macrófagos foram incubados e a infecção foi realizada com as seguintes espécies: *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*, que foram incubadas com 8-HQ ou miltefosina durante 24 ou 72 h. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes. *8-HQ – 8-hidroxiquinolina; * Milt – miltefosina. Os índices de seletividade (IS) foram expressos pela razão entre CC₅₀ e CE₅₀, e os resultados expressos por média e erro padrão a partir de três experimentos independentes.

Amastigotas	CE ₅₀ (µg/mL) e Índice de Seletividade (IS)			
	24 h		72 h	
	8-HQ	Milt	8-HQ	Milt
<i>L. (L.) amazonensis</i>	1,9 ± 0,1	6,53 ± 0,06	0,97 ± 0,09	3,5 ± 0,2
	IS (19,1)	IS (6,6)	IS (37,3)	IS (9,3)
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	2,0 ± 0,8	4,1 ± 0,2	0,055 ± 0,001	0,05 ± 0,01
	IS (18,1)	IS (10,4)	IS (672)	IS (656)
<i>L. (V.) guyanensis</i>	0,8 ± 0,1	4,9 ± 0,9	0,039 ± 0,002	0,8 ± 0,2
	IS (45,3)	IS (8,8)	IS (1120)	IS (41)
<i>L. (V.) lainsoni</i>	0,17 ± 0,09	0,51 ± 0,03	0,51 ± 0,01	1,88 ± 1,04
	IS (363)	IS (85,8)	IS (67,2)	IS (18,2)
<i>L. (V.) naiffi</i>	0,45 ± 0,02	2,0 ± 0,3	0,0323 ± 0,0002	0,19 ± 0,08
	IS (80,6)	IS (21,4)	IS (1120)	IS (328)
<i>L. (V.) shawi</i>	0,16 ± 0,01	3,9 ± 0,4	0,218 ± 0,001	1,6 ± 0,5
	IS (363)	IS (11)	IS (168)	IS (20,5)

A Figura 6 ilustra a eficácia da 8-HQ e miltefosina a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 e 72 h nas formas amastigotas intracelulares de *L. (V.) guyanensis* (a espécie mais suscetível à 8-HQ em 72 h) e *L. (L.) amazonensis* (a espécie mais resistente à 8-HQ em 72 h).

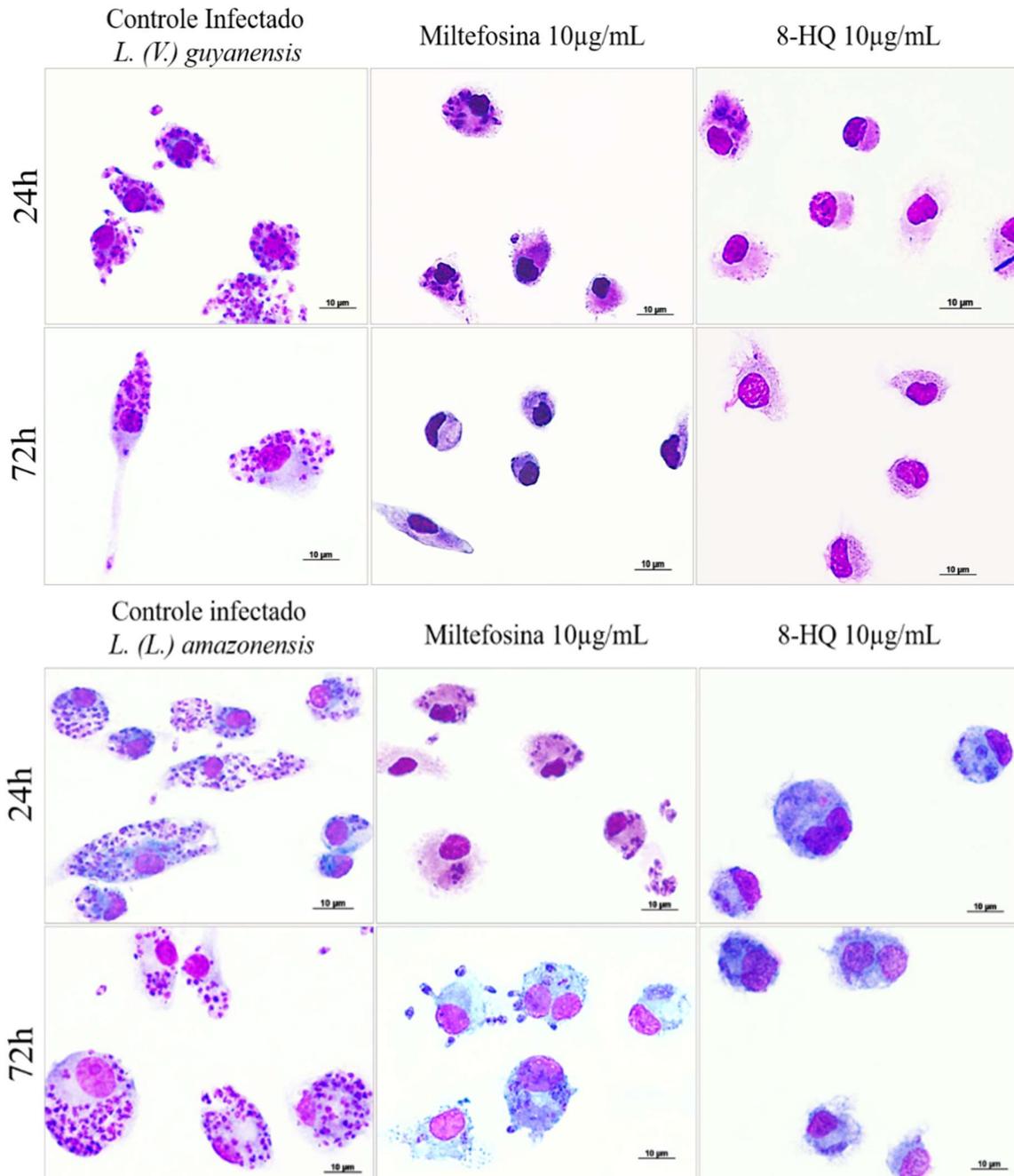


Figura 6. Macrófagos derivados da medula óssea foram infectados com *L. (V.) guyanensis* ou *L. (L.) amazonensis* e tratados com diferentes concentrações de 8-HQ ou miltefosina durante 24 h ou 72 h. Esta figura ilustra a ação de ambas as drogas a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Os resultados apresentados acima demonstram que nos experimentos *in vitro* a 8-HQ desempenhou atividade leishmanicida nas espécies: *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* em 24 e 72 horas de incubação. Contudo, ressalta-se que para formas promastigotas e amastigotas, as espécies do subgênero *Viannia* foram mais sensíveis à 8-HQ, eliminando ambas as formas do protozoário com alta seletividade. Além disso, às 72 h de tratamento, o composto foi 18,36 e 11,02 vezes mais seletivo para promastigotas de *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) guyanensis* do que *L. (L.) amazonensis* e 30 vezes mais seletivo para amastigotas de *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) guyanensis* do que *L. (L.) amazonensis*, a espécie menos suscetível tratada com 8-HQ. Em sequência, *L. (V.) shawi* foi a terceira espécie mais suscetível à 8-HQ em comparação às demais avaliadas; em contrapartida, *L. (L.) infantum chagasi* foi o segundo parasita mais resistente à 8-HQ.

Apesar da maior sensibilidade apresentada pelas espécies do subgênero *Viannia*, a 8-HQ foi capaz de exercer atividade leishmanicida nos parasitos do subgênero *Leishmania*, que foram eliminados com alta seletividade, se comparados as incubações realizadas com miltefosina, que foi utilizada como fármaco controle para leishmaniose nestes experimentos. Trabalhos anteriores avaliaram a atividade da 8-HQ *in vitro* em espécies do subgênero *Leishmania*, demonstrando alta seletividade da substância às 48 horas de incubação, com a CE_{50} de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ (IS 328) e CE_{50} de 0,26 $\mu\text{g/mL}$ (IS 62), para *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*, respectivamente (104). Da mesma forma, as promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram eliminadas pela ação da 8-HQ com CE_{50} de 0,35 $\mu\text{g/mL}$ (SI ~ 47); além disso, a 8-HQ reduziu as formas amastigotas intracelulares de *L. (V.) braziliensis* com maior eficácia em comparação à anfotericina B (104). Assim, os dados apresentados neste trabalho corroboram a sólida eficácia e seletividade da 8-HQ para eliminar *Leishmania* sp. e reforçar o potencial de tal composto para produzir medicamentos novos e eficazes para combater esta infecção.

Reforça-se também que além do alto efeito leishmanicida, a 8-HQ exibiu baixa citotoxicidade em macrófagos, resultando nos elevados índices de seletividade apresentados pelo composto em 24 h (IS 12,5 – 363) e em 72 h (IS 30,5 a 1120), em comparação a miltefosina que apresentou a variação dos IS de 1,8 a 85,8 e 2 a 656 durante 24 e 72h de incubação, respectivamente.

4.2. Avaliação da produção de óxido nítrico em macrófagos infectados

Considerando que a 8-HQ foi capaz de exercer alta atividade leishmanicida em formas promastigotas e amastigotas, investigou-se se o mecanismo de ação do composto estava relacionado a produção de peróxido de hidrogênio e/ou óxido nítrico.

Na comparação com o controle infectado (iMΦ) e macrófago controle não infectado (MΦ), os macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* (Figura 7A), *L. (L.) infantum* (Figura 7B) que foram tratados com 8-HQ demonstraram a diminuição do NO intracelular nas incubações com 1,25 – 5 µg/mL durante 24 h. Por outro lado, quando tratados com 10 µg/mL de 8-HQ, as células infectadas por *L. (L.) amazonensis* restauraram a capacidade de produzir NO, em comparação aos controles.

Do mesmo modo, a comparação com o controle infectado em 72 h de incubação demonstrou que macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com 10 µg/mL de 8-HQ apresentaram níveis mais elevados de NO intracelular ($p < 0,05$). Por outro lado, quando comparados ao controle infectado, macrófagos infectados por *L. (L.) infantum chagasi* e tratados com 8-HQ demonstraram maior produção de NO em todas as concentrações de 8-HQ ($p < 0,05$). Adicionalmente, observou-se que a incubação por 8-HQ aumentou os níveis de NO produzidos pelos macrófagos na passagem de 24 h para 72 h ($p < 0,05$).

Na infecção por *L. (V.) guyanensis* (Figura 7C), *L. (V.) lainsoni* (Figura 7D), *L. (V.) naiffi* (Figura 7E) e *L. (V.) shawi* (Figura 7F) foi observado um padrão diferente de produção de NO. Na comparação de 24 h de incubação com seus respectivos controles infectados, macrófagos infectados por *L. (V.) lainsoni* ou *L. (V.) naiffi* que foram incubados 8-HQ (1,25 -10 µg/mL) reduziram expressivamente a produção de NO. Já as infecções causadas por *L. (V.) guyanensis* ou *L. (V.) shawi* não demonstraram qualquer modificação relacionada ao nível de NO. Em 72 h macrófagos infectados com *L. (V.) lainsoni* e tratados com 1,25 – 5 µg/mL exibiram uma redução significativa nos níveis de NO em comparação com o controle infectado, porém quando as células infectadas foram tratadas com 10 µg/mL houve a restauração nos níveis de NO em relação aos níveis do grupo iMΦ. No mesmo período de incubação, macrófagos infectados por *L. (V.) guyanensis* mostraram menor produção de NO em todas as concentrações de 8-HQ quando comparadas a iMΦ. Em sequência, a 8-HQ não alterou a produção de NO na infecção causada por *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* em comparação com os respectivos controles infectados.

Adicionalmente, em macrófagos infectados por espécies do subgênero *Viannia*, os níveis de NO foram maiores em 72 h do que em 24 h de incubação com 8-HQ. Macrófagos incubados com LPS durante 24 ou 72 h produziram níveis mais elevados de NO em comparação com todas as condições experimentais (dados não mostrados). A produção de NO a partir de macrófagos controles ($M\Phi$) foi considerada o fundo da reação.

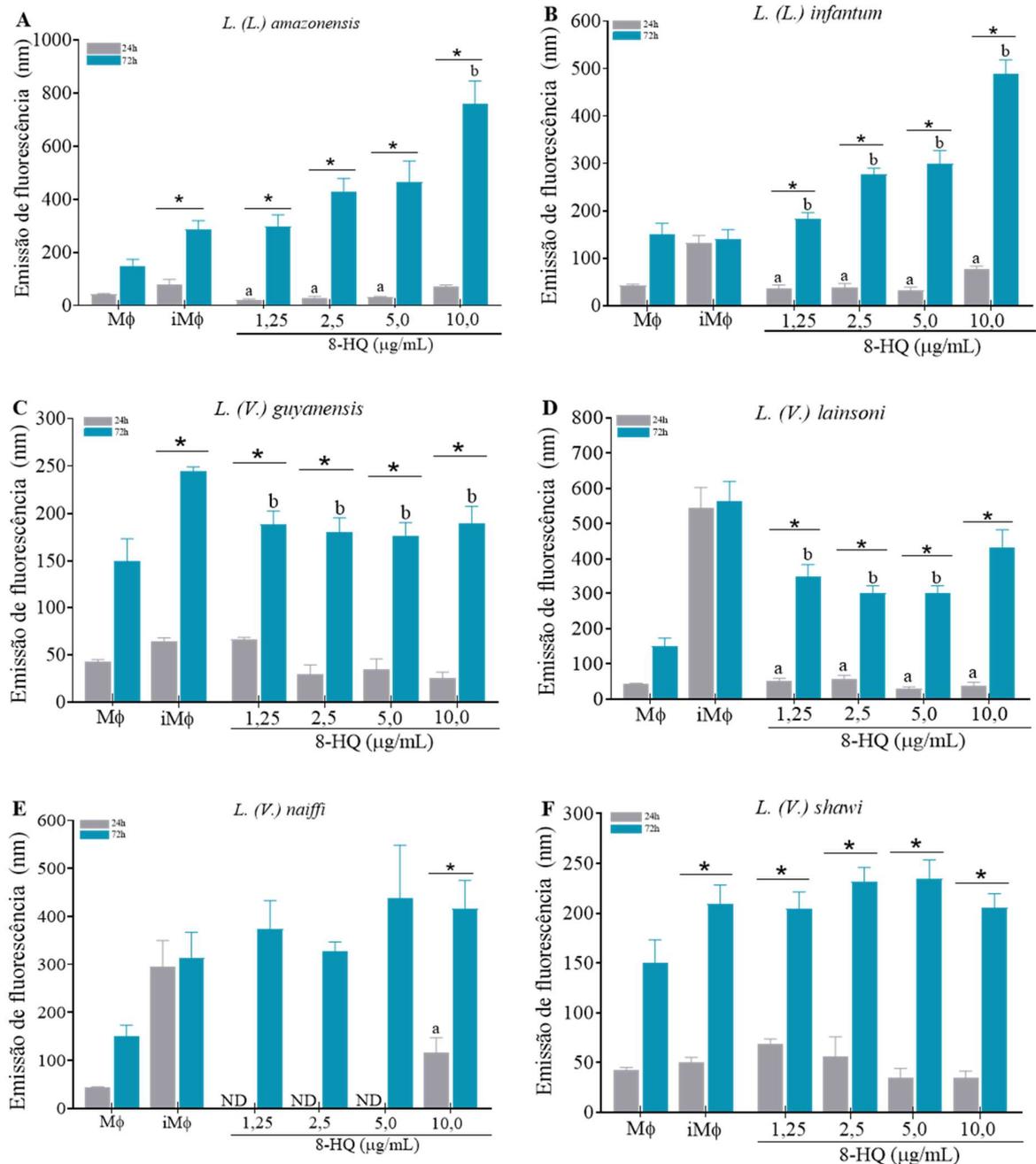


Figura 7. Macrófagos foram infectados por espécies do subgênero *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis* (A); *L. (L.) infantum* (B); e subgênero *Viannia*: *L. (V.) guyanensis* (C); *L. (V.) lainsoni* (D); *L. (V.) naiffi* (E); *L. (V.) shawi* (F). Após a infecção, os macrófagos foram tratados com 8-HQ (1,25-10 µg/mL) durante 24 e 72 h e a produção de óxido nítrico intracelular foi determinada. O LPS foi utilizado como controle positivo (dados não mostrados) e macrófagos não infectados e não tratados (MΦ) foram considerados controle negativo da reação. Os resultados foram expressos por média e erro padrão. A letra “a” demonstra resultados que

apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação entre macrófagos infectados e tratados por 8-HQ (1,25 -10 $\mu\text{g/mL}$) e macrófagos infectados (iM Φ) em 24 h, e a letra “b” a comparação em 72 h.

Determinados compostos podem aumentar a atividade respiratória das células hospedeiras durante a fagocitose e processos infecciosos, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio, que podem causar a eliminação de patógenos intracelulares (116,117). Nesse sentido, foram realizados testes para a detecção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e NO no sobrenadante das células, que não puderam ser observados nas culturas de macrófagos infectados; contudo, a presença de NO intracelular foi identificada.

Em geral, às 24 h de incubação com 8-HQ foi detectada a redução de NO em macrófagos infectados por espécies de *Leishmania* sp. em comparação aos respectivos controles. Por outro lado, com o aumento da concentração de 8-HQ (10 $\mu\text{g/mL}$) os macrófagos infectados tratados apresentaram baixa quantidade de formas amastigotas, assim como uma tendência a normalizar os níveis de NO. Possivelmente, o composto não foi capaz de exercer uma atividade imunomoduladora no período inicial de incubação, sobretudo nas concentrações de 1,25 - 5 $\mu\text{g/mL}$, pois em infecções por *Leishmania* sp. a produção de NO pela 8-HQ pode estar relacionada à um mecanismo de ação secundário do composto nos períodos iniciais de infecção. Estudos anteriores demonstraram que o tratamento com 8-HQ induziu a alteração no potencial de membrana mitocondrial em *Leishmania* sp. incubadas por 24 h, indicando que esta seja a principal via de ação do composto para desempenhar tal efeito leishmanicida (104,118). Por outro lado, a alta concentração de 8-HQ poderia modular a produção de NO às 24 h, como visto em macrófagos infectados e tratados com 10 $\mu\text{g/mL}$ do composto.

Em especial, a atividade modulatória da 8-HQ foi potencializada às 72 horas de tratamento, nas infecções causadas pelo subgênero *Leishmania*, onde foi vista a produção de NO nos macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) infantum* e tratados em todas as concentrações de 8-HQ avaliadas no experimento (1,25 – 10 $\mu\text{g/mL}$).

Tendo em vista que estas espécies foram consideradas as menos suscetíveis ao composto, é justificável a ausência de produção de NO às 24 h. Estudos anteriores mostraram que o tratamento com 8-HQ em 48h de incubação não levou a produção de NO na infecção de macrófagos por *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* (104,107). A ausência de NO intracelular neste estudo deve indicar que no tratamento com 8-HQ a produção de NO é um processo tardio, além disso, sugere também que a atividade imunomoduladora pode desempenhar um papel secundário nos

mecanismos leishmanicidas. Todavia, a produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* foi observada após 72 h de tratamento com um agonista TLR7/8 à base de imidazoquinolina (derivado da quinolina), que resultaram também na eliminação de formas amastigotas (119). Outro estudo utilizando macrófagos infectados por *L. (L.) infantum* demonstrou o aumento na produção de NO quando tratados com quinolina (120); sugerindo que compostos estruturalmente relacionados podem compartilhar propriedades biológicas semelhantes, e possivelmente a estimulação de NO é um processo secundário e tardio, como foi observado no presente estudo.

Adicionalmente, a 8-HQ demonstrou possuir um efeito tempo dependente nas espécies do subgênero *Leishmania*. Como visto anteriormente, em amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* a 8-HQ apresenta uma CE₅₀ de 1,9 µg/mL em 24 h de incubação e a CE₅₀ de 0,9 µg/mL em 72 h. Do mesmo modo, em amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum* a CE₅₀ de 2 µg/mL em 24 h incubação reduziu consideravelmente às 72 h do tratamento com 8-HQ (CE₅₀ de 0,05 µg/mL). Esses resultados demonstram que as concentrações necessárias para eliminar 50% dos parasitos viáveis às 72 h de incubação reduziram em 52,6% e 97% para espécies de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* respectivamente; deste modo, podem ter contribuído como estímulo para potencializar a produção de NO intracelular nas espécies mais resistentes ao composto.

Por outro lado, foi observado que em 72 h macrófagos infectados com *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) lainsoni* e tratados com 8-HQ diminuíram os níveis de NO; e ainda que nenhuma alteração nos níveis de NO foi observada em macrófagos infectados com *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*.

Possivelmente a redução de NO nos grupos tratados ocorreu em função da comparação ao grupo de macrófagos infectados por *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) lainsoni*, que apresentou um aumento expressivo de NO quando comparados aos macrófagos não infectados, sugerindo que a partir do tratamento com 8-HQ houve a regulação nos níveis de NO intracelular nas espécies do subgênero *Viannia*.

Corroborando com nossos resultados um estudo anterior utilizando alcaloides quinolínicos demonstrou que macrófagos infectados por *L. (V.) panamensis* apresentaram redução na produção de NO após 48 h de incubação (121). Esses resultados indicaram que houve uma alteração metabólica nos macrófagos, resultando na resolução da explosão oxidativa e consequente resolução da fase de infecção (122,123).

Deste modo, a partir da ação terapêutica da 8-HQ os macrófagos apresentaram um número baixo de amastigotas intracelulares remanescentes, sugerindo que com a atividade leishmanicida dos compostos nas células hospedeiras, os níveis de NO tendem a ser normalizados (relacionados ao MΦ), se aproximando dos níveis de NO produzidos por macrófagos não infectados, apesar de ainda serem considerados elevados. Além disso, a redução nos níveis de NO em comparação aos macrófagos infectados não deve ser considerada como uma recuperação no número de formas amastigotas, uma vez que às 72 h o índice seletivo da 8-HQ aumentou na infecção causada por estas espécies em comparação com 24 h.

4.3. Produção do creme contendo 8-HQ, avaliação do tamanho de partículas

Considerando que a 8-HQ apresentou seletividade superior à miltefosina em formas promastigotas e amastigotas de espécies cutâneas de *Leishmania* sp., foram idealizados estudos para avaliar a eficácia deste composto administrado como um creme dermatológico.

Após produção do creme, foi realizada uma análise para verificar tamanho de partículas. Neste caso, observou-se que a distribuição 10% (D10) de todas as formulações apresentaram tamanho de partícula de aproximadamente 10 μm (Figura 8). A base de Beeler e a formulação contendo 1% de 8-HQ apresentaram 50% (D50) das partículas em torno de 25 μm , porém, a formulação contendo 2% de 8-HQ apresentou um aumento significativo em D50 (51,27 μm) em comparação com a base de Beeler e formulação 1%. A base de Beeler e a formulação de 1% exibiram D90 semelhantes, com 90% das partículas com tamanho de 92,84 e 89,93 μm , respectivamente. Em contraste, a formulação 2% apresentou o maior tamanho de partícula (146,77 μm) em comparação a todos os cremes.

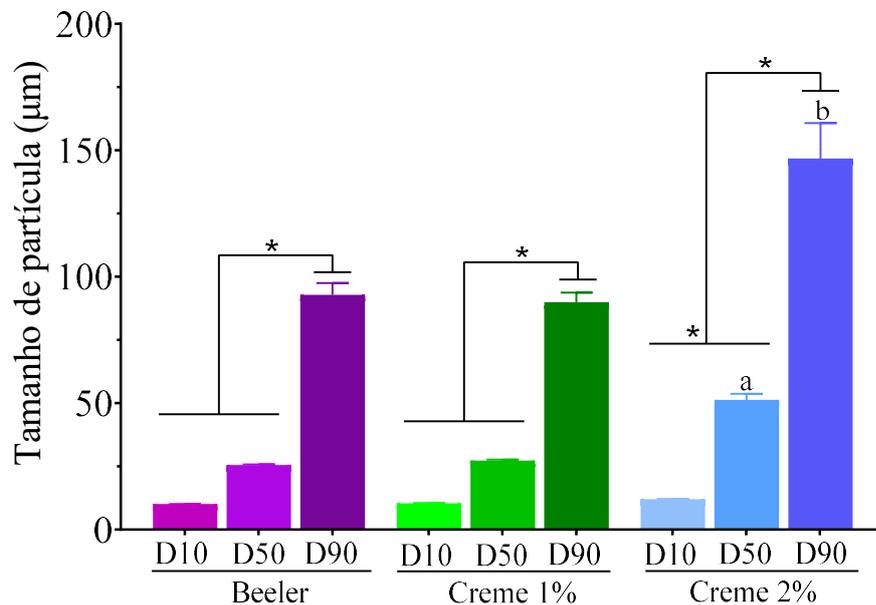


Figura 8. Tamanho de partículas da base de Beeler e dos cremes com 1 ou 2% de 8-HQ indicando que 10% (D10), 50% (D50) e 90% (D90) das partículas possuem o diâmetro (μm) indicado no eixo Y. $* < 0,05$ entre as porcentagens de partículas do mesmo grupo de creme. Em “a” e “b” os resultados de D50 e D90 do creme 2% são $< 0,05$ em relação a D50 e D90 dos grupos de Beeler e creme 1%, respectivamente.

Como abordado anteriormente, o creme 1% apresentou um tamanho de partícula semelhante a base de Beeler, indicando que a 8-HQ é dispersa homogeneamente e provavelmente solubilizada dentro da emulsão. No entanto, o creme com 2% de 8-HQ apresentou tamanhos aumentados de suas partículas em D50 e D90, que provavelmente foram atribuídos a quantidade de partículas de 8-HQ que permaneceram parcialmente insolúveis após a incorporação no creme, resultando em partículas de 8-HQ suspensas no interior do creme base.

Deste modo, quando a 8-HQ permanecer suspensa na base do creme provavelmente não será capaz de permear a pele e apenas a fração solubilizada poderá atravessar a barreira cutânea. Estes fatores indicam que o creme 1% pode possuir maior quantidade de 8-HQ na forma solubilizada em comparação com o creme a 2%, pois gotículas de menor tamanho de partícula têm maior probabilidade de incorporar na emulsão (124). Todavia, o creme 2% apresentou partículas polidispersas, com tamanhos menores que $210 \mu\text{m}$. Deste modo, mesmo em menor quantidade, as partículas do creme 2% com menores tamanhos, devem possuir capacidade de permeação na pele (125).

4.4. Análise da permeação

Considerando a distribuição do tamanho de partículas, observa-se que os cremes contendo 1 e 2% de 8-HQ possuem características morfológicas que permitem a permeação cutânea. Por tal razão foram realizados estudos de permeação cutânea empregando células de Franz contendo 1 e 2% de 8-HQ em pele suína, bem como com uma membrana artificial (membrana Strat-M[®]) projetada para mimetizar a pele humana. Em relação ao teste de permeação cutânea empregando pele suína, observou-se que o fluxo em estado estacionário foi 1,57 maior com creme 1% em relação ao 2% ($p < 0,05$). Por outro lado, as membranas artificiais apresentaram similaridade nos resultados relacionados ao fluxo em estado estacionário dos cremes de 1 ou 2%.

Na pele suína o creme 1% demonstrou parâmetros 3,33 e 3,18 vezes maiores quando ao coeficiente de permeabilidade e coeficiente de difusão, respectivamente, se comparado com creme de 2%. Contrariamente, as membranas artificiais não demonstraram qualquer diferença significativa em relação a tais parâmetros quando os cremes 1 e 2% foram comparados. Por fim, os tempos de latência foram semelhantes para os testes de pele suína, bem como para as membranas artificiais incubadas com cremes a 1 ou 2%.

Tabela 3. O ensaio de permeação cutânea foi realizado isoladamente em peles de suínos ou membranas artificiais (Strat-M[®]) que foram incubadas com os cremes contendo 1 ou 2% de 8-hidroxiquinolina. * $p < 0,05$ entre os cremes contendo 1 e 2% de 8-HQ em um mesmo modelo de membrana

Parâmetros	Pele de suíno		Membrana Strat-M [®]	
	Creme 1%	Creme 2%	Creme 1%	Creme 2%
Fluxo estacionário ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	40,24 \pm 1,09	25,55 \pm 1,21*	30,66 \pm 3,25	33,49 \pm 6,09
Tempo de latência (h)	0,46 \pm 0,03	0,60 \pm 0,16	0,35 \pm 0,03	0,24 \pm 0,05
Coefficiente de permeabilidade (mm^2/h)	0,20 \pm 0,02	0,06 \pm 0,003*	0,31 \pm 0,03	0,24 \pm 0,03
Coefficiente de difusão ($\mu\text{m}/\text{h}$)	33,83 \pm 4,68	10,63 \pm 0,50*	9,20 \pm 0,97	7,33 \pm 0,87
8-HQ retida na pele ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0,20 \pm 0,02	0,17 \pm 0,04	0,10 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01

Após 360 minutos, foram coletados fragmentos da pele suína, os quais foram avaliados do ponto de vista histopatológico. Nesse contexto, verificou-se que os cremes contendo 1 (Figura 9A) ou 2% (Figura 9B) de 8-HQ não provocaram alterações na morfologia das peles de orelha dos suínos, uma vez que a epiderme, derme superficial e profunda, glândulas, folículos e capilares foram preservados. A partir da preservação da integridade histológica da pele dos suínos sugere-se que os cremes foram seguros, permitindo dar seguimentos às análises *in vivo*.

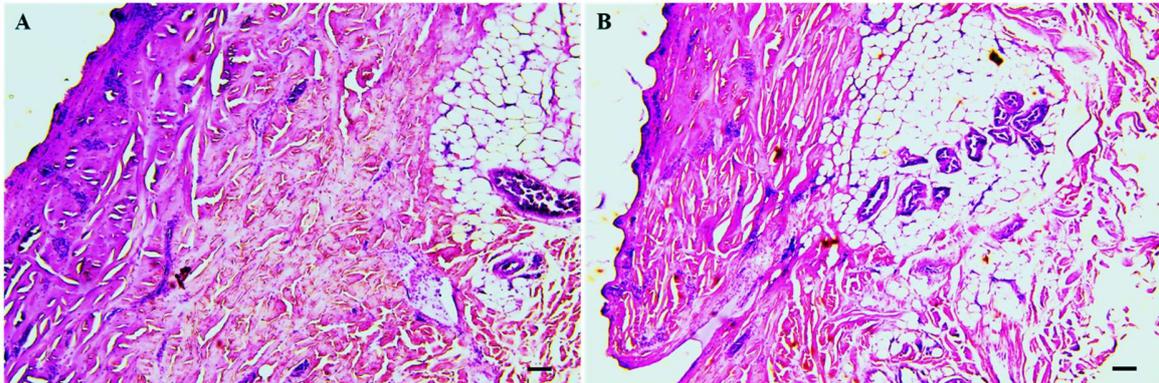


Figura 9 - Após a análise de permeação cutânea em células de Franz, os fragmentos de pele de suíno foram submetidos a rotina histológica e corados com hematoxilina e eosina (HE). A prancha histológica demonstra o creme com 1% de 8-HQ (A) e creme com 2% de 8-HQ (B). (Barras 10 μm).

Tendo em vista que o creme 2% apresentava maiores concentrações de 8-HQ que o creme 1%, inicialmente foi esperado que os parâmetros mais favoráveis à permeação do composto pela membrana fossem exibidos pelo creme 2%. Todavia, de modo geral o creme 1% exibiu maior fluxo estacionário, coeficiente de permeabilidade e difusão. Tais resultados podem ser justificados novamente pelo tamanho das partículas encontradas em cada formulação, sugerindo que possivelmente a discrepância para menor permeabilidade do creme 2% possa estar relacionada ao elevado tamanho de partículas que não puderam ser solubilizadas na emulsão e por tanto, não permearam a pele suína se comparadas a maior permeação das partículas presentes no creme 1%, que possuíam partículas menores.

Contudo, embora o creme 1% tenha demonstrado parâmetros mais favoráveis a permeação, ambos foram eficientes em permear a membrana suína. Além do tamanho das partículas presentes nos cremes, a permeação da 8-HQ através da pele pode ter sido potencializada pela função de alguns componentes presentes na base de Beeler como: o propilenoglicol que pode solubilizar drogas hidrofóbicas, permitindo a permeação da 8-HQ pela membrana (126); e o lauril sulfato de sódio que é capaz de reduzir a resistência do estrato córneo, facilitando a penetração da 8-HQ (127).

É importante ressaltar ainda que, na pele suína tratada com creme contendo 1% ou 2% de 8-HQ o coeficiente de difusão apresentado por ambos os cremes foi de 17,80 ou 5,60 vezes mais 8-HQ, respectivamente, do que a concentração efetiva de 8-HQ capaz de eliminar 50% (CE_{50}) das formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*, que foi previamente estimada em 1,9 $\mu\text{g/mL}$ após 24 h de incubação (Tabela 2). Adicionalmente, constatou-se que os cremes contendo

8-HQ não promoveram modificações na estrutura histológica da pele suína, indicando assim, a segurança destes cremes para aplicação *in vivo*.

Quando avaliados em membrana artificial (Strat-M[®]) não foram observadas diferenças significativas entre os cremes 1 ou 2%. A semelhança entre os parâmetros de permeabilidade dos cremes expressos nos testes com a membrana Strat-M[®] pode ter ocorrido pois no experimento foram utilizadas doses infinitas de creme 1 e 2%, indicando que a massa de creme espalhada sobre a área da membrana pode estar acima da capacidade máxima tolerável para que haja a absorção de 8-HQ. Deste modo, ao atingir a capacidade máxima de permeação as demais partículas permaneceriam suspensas no compartimento doador da célula de Franz, em razão da saturação da membrana artificial, resultando na similaridade dos parâmetros de permeação dos cremes 1 e 2% apresentados na membrana Strat-M[®].

Um estudo anterior comparou parâmetros de permeabilidade das membranas artificiais Strat-M[®] e pele de suínos aplicando compostos com dose finita e dose infinita, onde os resultados mostraram que a membrana artificial não foi um bom indicador de permeabilidade para aplicação de doses infinitas se comparado a pele de suínos (128).

Ainda considerando a membrana Strat-M[®], o coeficiente de difusão de ambos os cremes também demonstrou ser superior à CE₅₀ da 8-HQ em amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Reforça-se que as discrepâncias na permeação dos cremes através da pele suína e das membranas Strat-M[®] podem estar vinculadas à disparidade na estrutura histológica complexa da espessura da pele suína em comparação com a membrana artificial (112,129). No entanto, os resultados obtidos em ambas as condições experimentais corroboram de maneira contundente a eficácia das formulações tópicas que incluem 8-HQ.

Uma formulação de creme com 2% de iodo-cloridroxiquinolina, derivado de 8-HQ, foi testada em humanos e demonstrou uma absorção percutânea significativa de 40% do composto após 12 horas da aplicação (130). Adicionalmente, a formulação de cremes e pomadas com 8-HQ foi estudada em pacientes com dermatoses generalizadas durante 10 dias, onde foi demonstrada a absorção de 0.3 – 1.3 µg/mL de 8-HQ após 24 horas de aplicação, além da meia-vida sérica do composto que durou entre 19 a 30 horas (131); demonstrando que a formulação tópica da 8-HQ apresenta a capacidade de permear a pele humana e uma longa duração após atingir a corrente sanguínea. No mesmo estudo, os pacientes não demonstraram nenhum sinal de toxicidade severa

com o uso dos cremes, sugerindo que além da atividade leishmanicida, a formulação tópica com 8-HQ pode ser um método seguro para o tratamento de leishmaniose cutânea em humanos.

4.5. Avaliação das alterações histológicas de pele de camundongos BALB/c saudáveis tratados com cremes 1 e 2%.

Durante 14 dias camundongos BALB/c sadios foram tratados com 1.6 mg de base de Beeler, cremes 1 e 2% de 8-HQ por via tópica ou com Glucantime[®] 50 mg/kg por via intralesional. Após o período de tratamento os animais foram eutanasiados, fragmentos de pele foram coletados, submetidos a rotina de processamento histológico e em sequência corados com hematoxilina e eosina (HE).

Secções histológicas da pele de animais saudáveis não submetidos a tratamento revelaram uma morfologia normal da epiderme, derme, assim como das glândulas, folículos capilares e capilares sanguíneos (Figura 10A). De maneira análoga, a pele dos animais tratados com a base de Beeler (Figura 10B), creme contendo 1% (Figura 10C) ou 2% (Figura 10D) de 8-HQ exibiu uma morfologia semelhante ao grupo controle (Figura 10A).

Por outro lado, a pele dos animais tratados com Glucantime[®] por via intralesional exibiu uma área focal de inflamação na derme caracterizada por infiltração de células mononucleares e polimorfonucleares (Figura 10E).

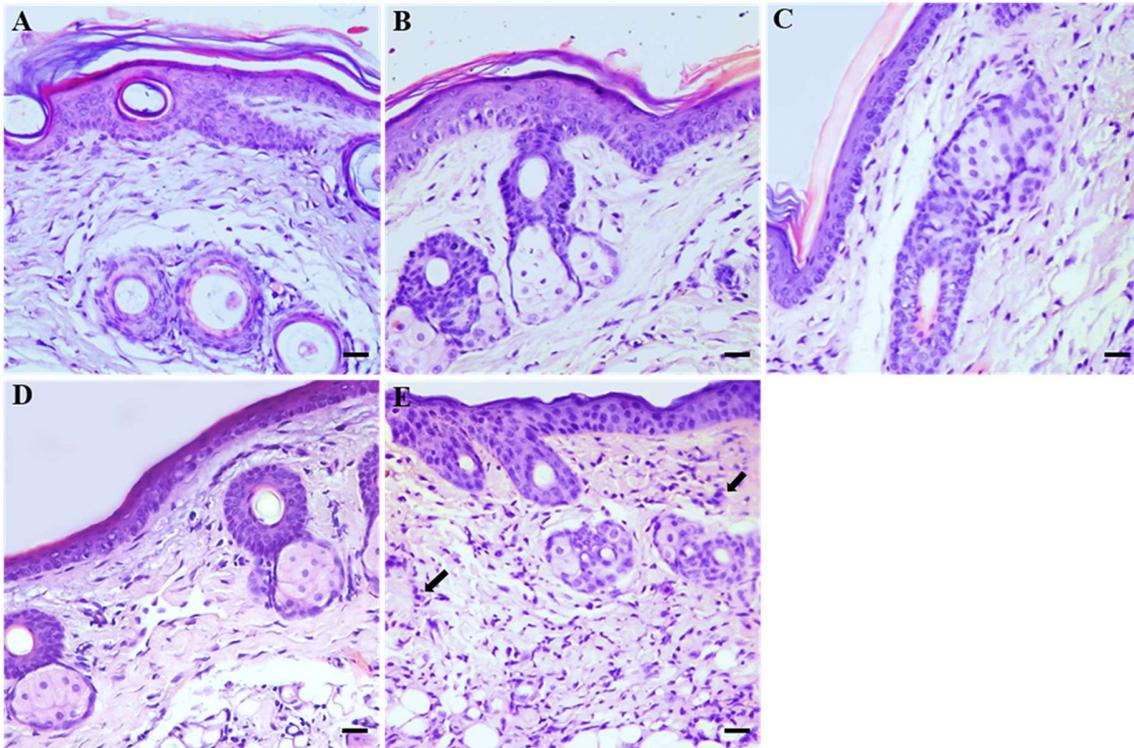


Figura 10. Cortes histológicas da pele de BALB/c corados com hematoxilina e eosina (HE) demonstrando a estrutura das camadas após tratamento tópico durante 14 dias. Grupo controle não tratado (A), Grupo tratado com a base de Beeler pela via tópica (B), Grupo tratado com o creme contendo 1% de 8-HQ pela via tópica (C), Grupo tratado com a creme contendo 2% de 8-HQ pela via tópica (D); e Grupo tratado com Glucantime[®] pela via intralesional (E). As setas sinalizam áreas de inflamação tecidual (Barras 20 μ m).

Os resultados histológicos relacionados ao infiltrado inflamatório identificado no tratamento intralesional com Glucantime[®] (50 mg/kg) podem ser atribuídos à capacidade do fármaco em aumentar a atividade fagocítica de monócitos e neutrófilos, elevar a produção de superóxido, assim como a síntese de TNF- α e NO (132). Esses mecanismos justificam a inflamação observada na pele. Além disso, os animais foram submetidos ao tratamento intralesional, o que pode induzir uma resposta inflamatória devido a uma lesão mecânica (133). Em síntese, os resultados sugerem que os cremes com 1% ou 2% de 8-HQ preservaram a morfologia da pele após 14 aplicações tópicas, validando sua consideração como formulações tópicas seguras para investigação no modelo experimental de leishmaniose cutânea.

4.6. Avaliação da eficácia dos cremes contendo 8-HQ na leishmaniose cutânea experimental

Os camundongos BALB/c infectados na base da cauda foram tratados diariamente a partir da 5ª semana de infecção, por via tópica com 1,6 mg dos cremes contendo 1% ou 2% de 8-HQ; base de Beeler ou com o medicamento de referência Glucantime® pela via intralesional.

Na 6ª semana PI (Figura 11) o grupo tratado com o creme 1% ou 2% de 8-HQ apresentou diminuição significativa no tamanho das lesões cutâneas (em 34,5% e 49,5% respectivamente), em comparação aos animais infectados, nos quais as lesões aumentaram progressivamente. Na 7ª semana, os tratamentos tópicos com o creme 1 e 2% continuaram a reduzir significativamente ($p < 0,05$) o tamanho da lesão quando comparados aos animais infectados e o grupo tratado com base de Beeler. Contudo, reforça-se que na última semana de tratamento a maior redução foi observada no grupo tratado com o creme contendo 1% de 8-HQ em comparação aos grupos tratados com creme contendo 2% de 8-HQ. Os animais tratados com Glucantime® (50 mg/kg) por via intralesional também demonstraram redução do tamanho de lesão na última semana de tratamento, quando comparados ao grupo infectado e ao grupo tratado com a base de Beeler. A lesão dos animais tratados com creme base de Beeler teve um aumento progressivo ao longo do tempo.

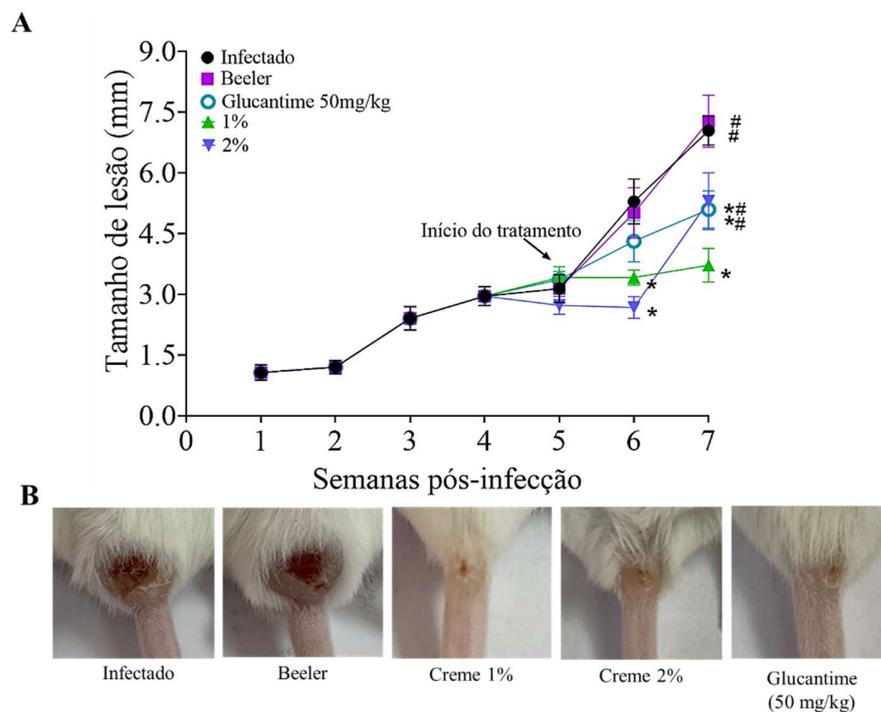


Figura 11. Para a mensuração do diâmetro da lesão (A), os camundongos BALB/c foram infectados na base da cauda com 10^6 formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Ao final da 4ª semana de infecção os animais foram submetidos ao tratamento com creme de 8-HQ à 1% ou 2%. O Glucantime® (50 mg/kg) foi

considerado o fármaco controle no experimento. Os animais receberam a aplicação única dos tratamentos por 14 dias consecutivos e tiveram o diâmetro das lesões mensuradas semanalmente por um micrômetro. * $p < 0,05$ em relação ao grupo infectado. # $p < 0,05$ na comparação entre o creme 1% e os demais grupos. Imagem do tamanho da lesão na cauda dos camundongos BALB/c referentes aos grupos: infectado (controle), e infectados e tratados com base de Beeler, creme 1% ou 2% de 8-HQ, e Glucantime (50 mg/kg), após o final do período experimental (B).

Os animais submetidos ao tratamento apresentaram uma diminuição significativa no tamanho das lesões cutâneas após a primeira semana, em comparação ao grupo de controle e ao grupo tratado exclusivamente com o creme Beeler, indicando que ambos os cremes efetivamente influenciaram a evolução das lesões cutâneas nos camundongos BALB/c. Ainda, observou-se que o creme 1% induziu a redução mais expressiva do tamanho da lesão em comparação aos animais tratados pela via tópica com creme 2% e os animais tratados pela via intralesional com Glucantime®.

Conforme observado anteriormente, sugere-se que este achado biológico pode estar relacionado ao menor tamanho das partículas do creme 1% que conferiu maior solubilidade da 8-HQ na emulsão impactando diretamente no aumento da permeabilidade e coeficiente de difusão através da pele suína quando comparado ao creme 2%.

Em estudos anteriores a redução do diâmetro da lesão também foi observada em camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) amazonensis* e tratados subcutaneamente durante 15 dias com 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ de 8-HQ (104,134); mostrando que o composto pode exercer um efeito terapêutico em infecções por *L. (L.) amazonensis*, e que ainda preserva sua efetividade quando utilizado pela via de administração tópica.

4.7. Avaliação de carga parasitária

Por meio do ensaio de diluição limitante (Figura 12A) foi visto que os tratamentos com o creme a 1% e 2% de 8-HQ levaram a uma redução significativa da carga parasitária na pele em 90,43% e 84,19% respectivamente, quando comparados ao controle infectado. O grupo tratado com Glucantime® (50 mg/kg) apresentou 98,24% de redução na carga parasitária da pele, e o nível de parasitismo para os animais infectados (controle) e os animais tratados com base de Beeler foi similar.

No linfonodo inguinal os grupos tratados com o creme 1% e 2% apresentaram redução significativa da carga parasitária em 91,95% e 87,06%, respectivamente, quando comparados ao controle infectado e ao creme Beeler ($p < 0,05$) (Figura 12B). O grupo tratado com Glucantime®

reduziu a carga parasitária do linfonodo em 94,73%. Os animais infectados e os animais infectados tratados com base de Beeler não apresentaram diferença significativa em relação a carga parasitária no órgão avaliado.

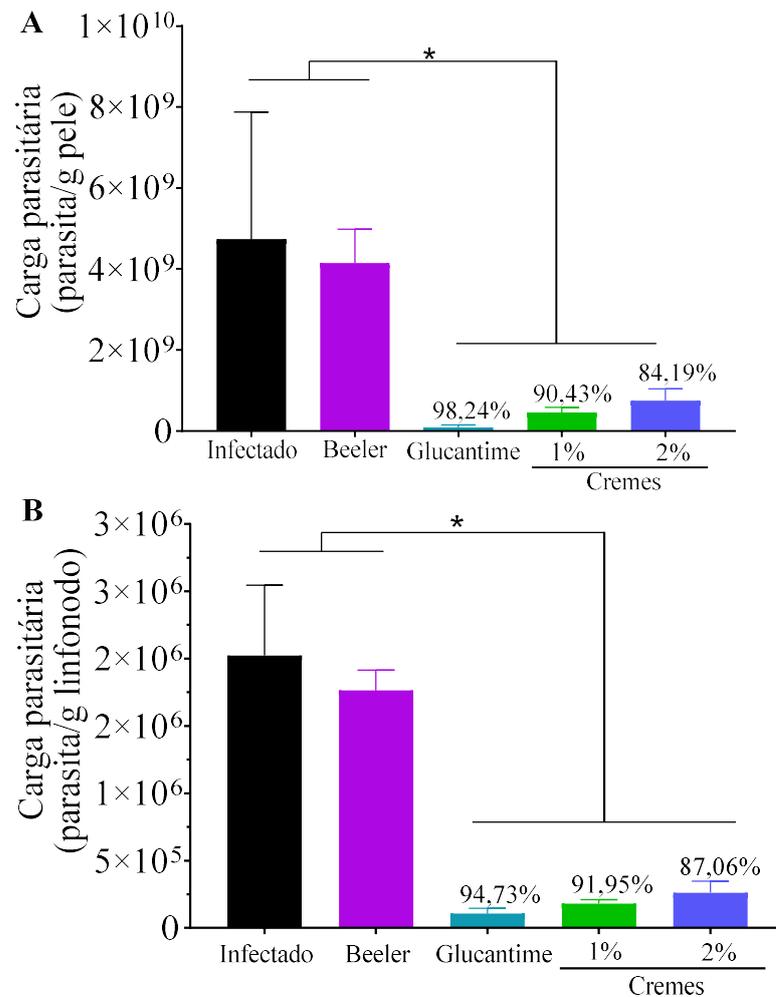


Figura 12. Para avaliação de carga parasitária camundongos BALB/c foram infectados na base da cauda com 10^6 formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*; ao final da 4ª semana de infecção os animais foram submetidos ao tratamento com creme de 8-HQ à 1% ou 2%. O Glucantime® (50 mg/kg) foi considerado o fármaco controle no experimento. Os animais receberam a aplicação única dos tratamentos por 14 dias consecutivos. A carga parasitária foi determinada pelo ensaio de diluição limitante. * $p < 0,05$ na comparação ao grupo infectado e Beeler em relação ao tratamento com o creme de 8-HQ à 1% ou 2%, e Glucantime®.

Somada à redução do tamanho das lesões cutâneas, foi observada diminuição significativa na carga parasitaria da pele e no linfonodo inguinal dos animais tratados com cremes contendo 1 ou 2% de 8-HQ.

Estudos utilizando a 8-HQ como tratamento para a infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c também demonstraram a redução de carga parasitária na pele, baço, fígado e linfonodo, bem como a redução no diâmetro da lesão da cauda após 15 dias de tratamento, em comparação aos animais infectados, porém nos estudos em questão os animais foram tratados subcutaneamente e intralesionalmente (105,135). Esses resultados demonstram que a 8-HQ pode exercer atividade leishmanicida na infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*, e que as características físicas da 8-HQ como o tamanho de partícula e alguns componentes da base de Beeler como o lauril sulfato de sódio e propilenoglicol podem ter facilitado a solubilização e a permeação de 8-HQ, impactando diretamente na redução significativa da carga parasitária da pele e linfonodo dos animais tratados topicamente.

Além disso, considerando que a leishmaniose cutânea anérgica difusa seja uma manifestação clínica caracterizada por muitas lesões espalhadas pelo corpo do hospedeiro, e apresente alta gravidade entre outras manifestações clínicas da leishmaniose, estes dados demonstraram que os tratamentos tópicos possuem características vantajosas em comparação a via parenteral, como a necessidade de baixa dosagem cumulativa para um atingir efeito terapêutico, além de toxicidade sistêmica reduzida e a facilidade da autoaplicação com nível de incomodo reduzido, que podem contribuir para que os pacientes deem continuidade ao tratamento.

Deste modo, sugere-se que o tratamento tópico a base de 8-HQ apresentou vantagens quando comparado ao tratamento intralesional por 8-HQ ou Glucantime®; reforça-se ainda que a formulação dos cremes 1 e 2% seguiu os critérios estabelecidos pelo DNDi aplicáveis para experimentação *in vivo*, como: o desenvolvimento de fármacos de uso tópico ou oral que cumpram um regime de tratamento de aproximadamente 14 dias, com fácil aplicação e que preferencialmente demonstre a redução do tamanho das lesões nos hospedeiros (87).

4.8. Alterações histopatológicas em pele de animais infectados e tratados

Os cortes histológicos de pele de camundongos BALB/c infectados (Figura 13A) e do grupo tratado com creme base de Beeler (Figura 13C) revelaram, na avaliação histopatológica, um aumento significativo no número de macrófagos infectados em ambos os grupos experimentais (detalhado em B e D). Esse aumento estava associado a um infiltrado inflamatório intenso e difuso, apresentando poucos linfócitos, mas uma expressiva quantidade de células mono e polimorfonucleares. Além disso, observaram-se áreas de necrose na derme profunda (indicadas pela cabeça de seta).

Diferentemente destes animais, foi observado que os grupos tratados topicamente com creme 1% (Figura 13E) ou 2% (Figura 13G) exibiram uma resposta inflamatória moderada, em comparação ao controle. Além disso, os infiltrados inflamatórios eram compostos principalmente por células mononucleares, adicionalmente observou-se que a densidade de parasitos foi menor em relação ao grupo infectado (detalhes na inserção em F e H). Igualmente, a avaliação histopatológica da pele de camundongos BALB/c, tratados com Glucantime[®] por via intralesional (50 mg/kg), revelou a presença de um infiltrado inflamatório intenso e difuso, predominantemente composto por células mononucleares (Figura 13I). Adicionalmente, foram identificadas algumas formas amastigotas em macrófagos, detalhadas na inserção J. No entanto, áreas focais de necrose tecidual foram evidenciadas na derme profunda (indicadas pela cabeça de seta na figura J).

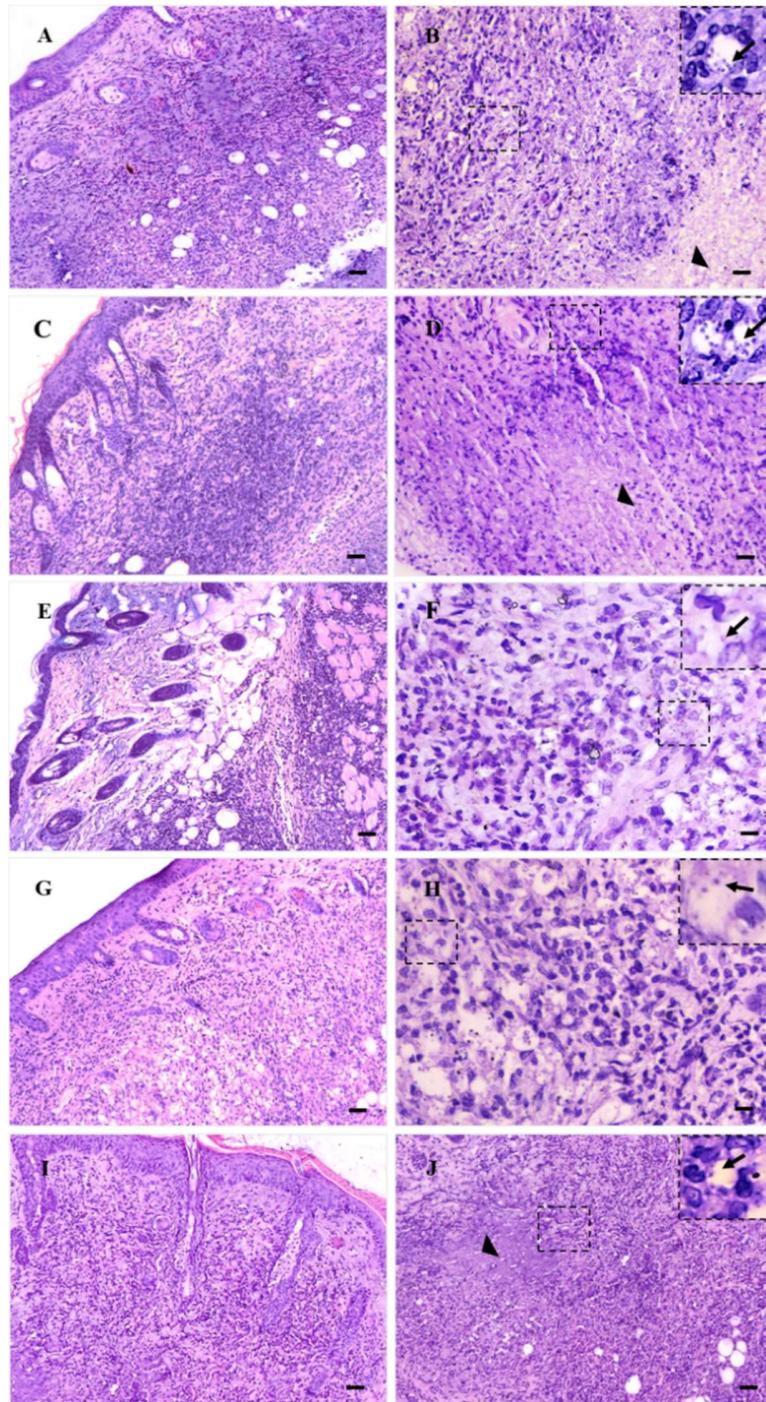


Figura 13. Fragmentos de pele de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) amazonensis* foram submetidos ao processamento histológico e corados com Hematoxilina e eosina (HE). A prancha histológica demonstra o controle infectado (A e B); o tratamento tópico com creme 1% de 8-HQ (C e D); tratamento tópico com creme 2% de 8-HQ (E e F); tratamento por via intralesional com 50 mg/kg de Glucantime® (G e H). A estrutura da derme e epiderme de cada grupo é detalhada em A, C, E e G; o parasitismo tecidual é detalhado em B, D, F e G. A necrose pode ser observada na ponta das setas (Barras: 40 μ m).

A histopatologia na infecção por *L. (L.) amazonensis* é geralmente caracterizada por um infiltrado inflamatório intenso e difuso por toda pele causado predominantemente por macrófagos altamente infectados, muitas células polimorfonucleares e poucos linfócitos (136–138); o que corrobora com nossos achados.

Neste sentido, numa infecção progressiva as células polimorfonucleares como os neutrófilos estão relacionadas aos momentos iniciais de infecção, pois são células que se dirigem rapidamente ao local do inóculo, sugerindo atuação das alarminas (moléculas endógenas que sinalizam dano tecidual) (139). Apesar de serem capazes de eliminar formas promastigotas pelas armadilhas extracelulares de neutrófilos- NETS, produzindo um ambiente pró-inflamatório (140); essas células podem facilitar a propagação do parasito durante a infecção, transferindo promastigotas silenciosamente para macrófagos, através da fagocitose de neutrófilos apoptóticos (30).

Os neutrófilos também foram encontrados em lesões cutâneas não cicatrizadas de pacientes, indicando induzir uma patologia tecidual imunomediada (141). Além disso, em achados histopatológicos o aumento no recrutamento de neutrófilos está relacionado a um processo inflamatório intenso e a necrose (142); Do mesmo modo, o acúmulo de macrófagos altamente infectados pode resultar em necrose tecidual (143).

Deste modo fica evidente que os infiltrados polimorfonucleares e mononucleares identificados na histopatologia dos animais infectados podem indicar um processo inflamatório agudo e contribuir para a propagação do protozoário no hospedeiro resultando na persistência da doença. Assim, compostos capazes de diminuir o parasitismo tecidual e induzir a polarização das células Th1 podem ser importantes para o desenvolvimento de um tratamento eficaz.

Por outro lado, um perfil de resistência à infecção pode ser caracterizado por meio dos infiltrados de células mononucleares, uma vez que ao sofrerem estímulos de citocinas pró-inflamatórias, as células T ativam os macrófagos que por sua vez produzem NO eliminando o protozoário (144); o que justifica o intenso número de linfócitos, macrófagos e o baixo parasitismo tecidual encontrados na histopatologia de animais onde houve a efetivação da resposta imune adquirida polarizada para o perfil Th1.

Deste modo os achados na histopatologia da pele dos animais tratados com creme 1 ou 2% e Glucantime® indicam fortemente a mudança do perfil da infecção, tanto pela ausência de

infiltrados de neutrófilos, quanto pelo aumento de linfócitos e macrófagos e a redução expressiva de formas amastigotas no tecido.

É importante ressaltar também que, a ausência de neutrófilos nos animais tratados pode ter contribuído para um perfil de resistência à infecção, pois foi demonstrado que promastigotas de *Leishmania* internalizadas por neutrófilos bloqueiam a produção da quimiocinas (CXC e proteína-10) que diminuem o recrutamento de células NK e Th1, contribuindo para a multiplicação do parasito (145). Além disso, ao avaliar biopsias de pacientes com leishmaniose cutânea um estudo anterior demonstrou que os neutrófilos consistiam em 95% das células com expressão de arginase, prejudicando a disponibilidade de L-arginina no ambiente extracelular, inviabilizando a produção de NO (146).

Em um estudo anterior foi observado que o tratamento com 8-HQ intralesional leva à diminuição expressiva do processo inflamatório que passa a ser restrito a pequenos focos de área na derme, com infiltrado moderado de linfócitos, poucas células polimorfonucleares e amastigotas (135). Da mesma forma, compostos estruturalmente correlacionados, como os alcaloides quinolínicos, tiveram o mesmo efeito nas infecções por *Leishmania* (121). Portanto, esses dados indicam que a 8-HQ formulada como creme também é capaz de exercer efeito leishmanicida.

4.9. Avaliação da produção de IL-4 e IFN- γ .

Na avaliação de produção de citocinas, uma elevada produção de IL-4 foi observada nos linfonodos dos animais controle infectados e nos tratados com creme base de Beeler. Em contraste, tanto o tratamento intralesional com Glucantime[®] quanto o tratamento tópico com cremes contendo 1 ou 2% de 8-HQ resultaram em uma expressiva redução na produção de IL-4 em comparação com os animais infectados e tratados com o creme base de Beeler ($p < 0,05$). Os níveis de IL-4 nos grupos submetidos aos tratamentos assemelharam-se aos dos animais não infectados e não tratados, conforme mostrado na Figura 14 A.

Em relação ao IFN- γ (Figura 14 B), verificou-se que o grupo infectado e o grupo tratado com base de Beeler produziram baixos níveis da citocina. Os animais tratados com Glucantime[®] por via intralesional, e com creme contendo 1 ou 2% de 8-HQ, no entanto, apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) na produção de IFN- γ .

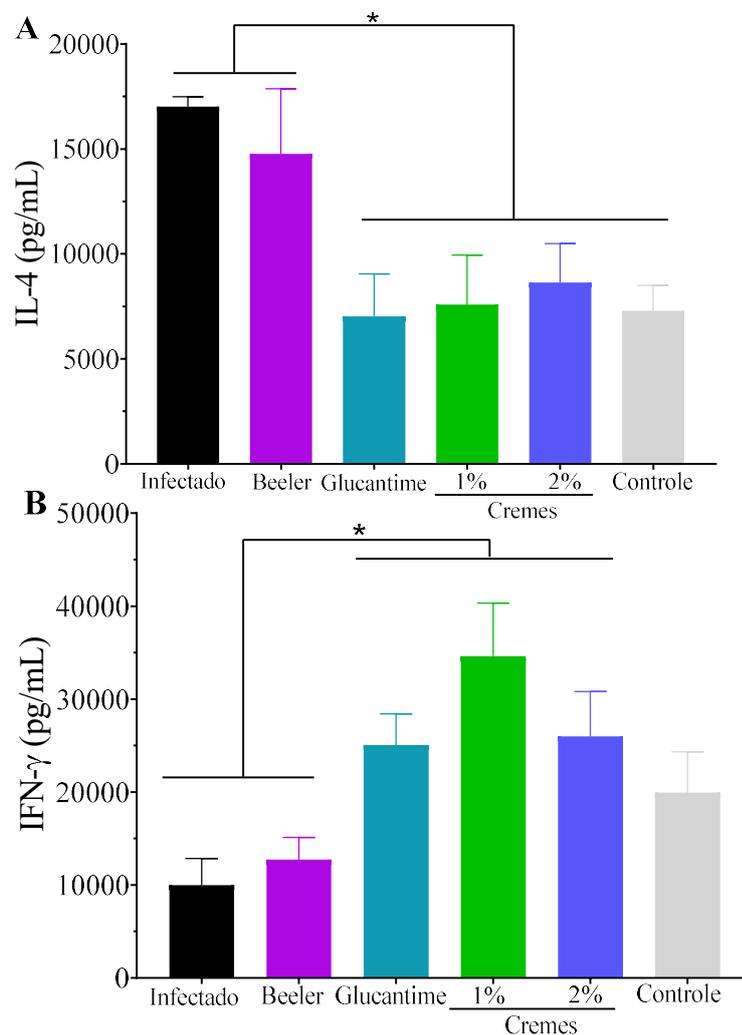


Figura 14. A quantificação de citocinas foi realizada pelo ensaio de ELISA sanduíche. Para tanto os linfonodos inguinais de camundongos BALB/c saudáveis, infectados, e infectados e tratados com creme (1 e 2% de 8-HQ) ou Glucantime[®] (50 mg/kg) foram macerados, centrifugados e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de citocinas IFN- γ e IL-4. * $p < 0,05$.

Durante a progressão da infecção por *L. (L.) amazonensis*, a resposta imunológica do hospedeiro é caracterizada pela alta produção da citocina IL-4, que resulta em uma resposta imune Th2, levando os animais à suscetibilidade da infecção, e neste caso os parasitas sobrevivem e podem se espalhar pelo tecido (23,136). Porém, os componentes anti-inflamatórios como a citocina IL-10 também podem controlar a injúria tecidual nos momentos iniciais da infecção (147). Por outro lado, em uma resposta exacerbada da doença, o aumento da liberação de IL-4 e IL-10 pode adicionalmente suprimir a produção de IFN- γ , limitar a resposta Th1 e mediar uma resposta

regulatória e imunossupressora por meio de linfócitos Treg, podendo ocasionar a progressão da infecção ou ainda na infecção assintomática (30,33).

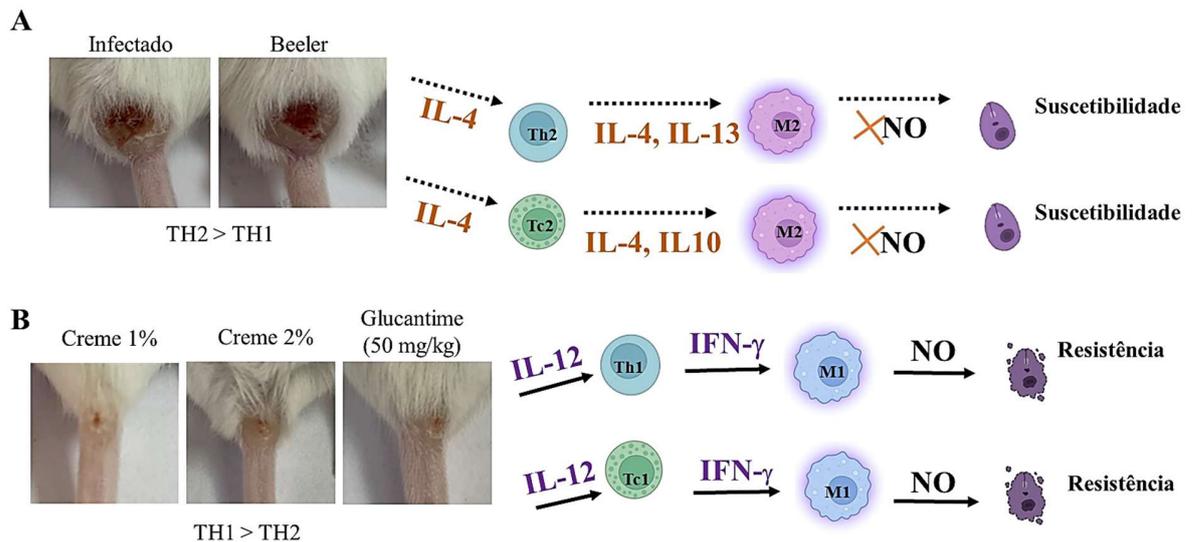


Figura 15. Esquema da resposta imune nos grupos experimentalmente infectados por *L. (L.) amazonensis* demonstrando a polarização da resposta Th2 no grupo controle infectado e grupo tratado com base de Beeler (A); e a polarização da resposta imune Th1 nos grupos infectados e tratados com creme 1% ou 2% de 8-HQ, e grupo tratado com Glucantime® (B).

No presente estudo, constatou-se que os animais controles desenvolveram uma resposta imune Th2 clássica, caracterizada pela presença elevada de IL-4 e baixa de IFN- γ . Portanto, essa configuração de resposta imune está altamente correlacionada com a progressão da doença (148). Por outro lado, a polarização da resposta imune Th1 tem grande relevância para a resistência da infecção. Após a maturação, os linfócitos são capazes de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias como (IL-12, TNF- α e IFN- γ), que participam da ativação de macrófagos para um estado leishmanicida, e consequentemente levam os parasitas à morte por NO (23).

Por contraste, os animais submetidos ao tratamento com Glucantime®, cremes 1% e 2%, manifestaram uma resposta imune Th1, caracterizada pela elevada produção de IFN- γ e a reduzida presença de IL-4. Esse padrão sugere uma polarização da resposta imune em direção ao polo Th1. Deste modo, sugere-se que a 8-HQ apresenta a capacidade de induzir as células a um estado leishmanicida através do polo Th1, o que acaba por reduzir o parasitismo tecidual, eliminando formas promastigotas e amastigotas. Esses resultados corroboram com os achados da histopatologia cutânea e do teste de diluição limitante descritos no presente trabalho.

Estudos anteriores mostram que a imidazoquinolina, um composto estruturalmente relacionado à 8-HQ, pode exercer função de agonista de Toll like receptor-7 (TLR-7) e apresentar atividade leishmanicida estimulando o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, ERO e NO (132,149). Neste caso, a ligação de imidazoquinolina ao TLR-7 estimula a ativação do fator de diferenciação mieloide (MyD88) que induz a produção de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-12, levando a produção de NO (119).

Durante o experimento foi observado também que com o aumento da produção de IFN- γ houve a redução significativa de IL-4 em todos os grupos tratados. Sabe-se que as citocinas IFN- γ e IL-4 são antagonistas (150). A IL-4 estimula a ativação alternativa de macrófagos M2, relacionada ao estímulo do crescimento celular, formação de colágeno e reparo tecidual (7,21). Em contrapartida, esses macrófagos produzem altos níveis de arginase, alterando a via metabólica de NO e comprometendo o desenvolvimento da atividade leishmanicida no organismo do hospedeiro (139). Além disso, a citocina IL-4 suprime a expressão genica do fator regulador de interferon 1 (IRF-1), responsável pela produção de IFN- γ (150,151).

Esses dados podem indicar que a redução de IL-4 tenha ocorrido em razão de um mecanismo compensatório da resposta imune, que suprimiu a resposta Th2 através da redução de IL-4, em função do aumento de IFN- γ , reforçando a polarização da resposta Th1 encontrada nos animais tratados. Adicionalmente, a não cicatrização das lesões e a falta de resposta à quimioterapia nos pacientes foram relacionadas à alta produção de citocinas IL-4 na infecção por *Leishmania*, demonstrando que na doença ativa, além da alta produção de IFN- γ induzindo macrófagos a um estado leishmanicida, a diminuição dos níveis de IL-4 durante a infecção é relevante para recuperação de pacientes (152).

Considerando os dados aqui apresentados, sugere-se que os cremes contendo 1 ou 2% de 8-HQ possuem atividade imunomoduladora no modelo experimental murino de leishmaniose cutânea, pois os mesmos uma polarização da resposta Th1, que é caracterizada pela resistência à infecção.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Deste modo, conclui-se que:

1) A 8-HQ é um composto que apresenta atividade leishmanicida multiespectral *in vitro*, com maior suscetibilidade para espécies do subgênero *Viannia*, adicionalmente este efeito pode ser potencializado pela atividade imunomoduladora do composto;

2) Os cremes contendo 8-HQ apresentaram características físicas que permitiram a solubilização das partículas na emulsão resultando na permeação do composto pela membrana, sugerindo a capacidade de permeação de 8-HQ na pele;

3) Os cremes não induziram alteração histológica nos testes *in vitro*, e os animais não infectados tratados com o creme não demonstraram qualquer toxicidade aparente, sugerindo que a utilização do tratamento tópico com 8-HQ é um método seguro;

4) O tamanho de lesão e parasitismo tecidual foi reduzido durante o tratamento com tópico com os cremes contendo 8-HQ, sugerindo que além de permear a pele o composto possui atividade leishmanicida *in vivo*;

5) Os animais tratados com 8-HQ produziram altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-4, indicando que o composto induziu uma resposta polarizada Th1, que indica a resistência à infecção.

6. Referências Bibliográficas*

1. Gurel MS, Tekin B, Uzun S. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. *Clin Dermatol* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 May 17];38(2):140–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X19301841>
2. Aronson NE, Joya CA. Cutaneous Leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2019 Mar;33(1):101–17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552018300916>
3. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. Bañuls A-L, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Mar 3;10(3):43–9. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
4. van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2012 Jun 1 [cited 2023 May 16];26(2):309–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552012000141>
5. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors* [Internet]. 2017 Dec 15 [cited 2023 May 16];10(1):82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/312593/>
6. World Health Organization W. Leishmaniasis [Internet]. 2022. Available from: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1
7. Akbari M, Oryan A, Hatam G. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. *Immunol Lett* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2023 May 19];233:80–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247821000493>
8. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet* [Internet]. 2018 Sep;392(10151):951–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673618312042>
9. de Freitas Milagres T, López-de-Felipe M, da Silva WJ, Martín-Martín I, Gálvez R, da Silva OS. Same parasite, different outcomes: unraveling the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Brazil and Spain. *Trends Parasitol*. 2023 Sep 1;39(9):774–85.
10. World Health Organization W. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas N° 7—March 2019. [Internet]. Department of Neglected Infectious Diseases. WHO/PAHO. 2019. Available from: https://www.who.int/leishmaniasis/resources/who_paho_era7/en/
11. Ministério da Saude M. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [Internet]. 2017. Available from: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf
12. Riva MM, Pastor FM, Almeida YV, Duarte LM, Souza LIS, Zanini MS, et al. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in bats from Espírito Santo, Brazil (2018–2019). *Parasitol Res* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2023 Oct 4];120(11):3857–63. Available from:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-020-07042-2>

13. Silveira FT. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2019 Sep 6 [cited 2023 May 19];113(9):505–16. Available from: <https://academic.oup.com/trstmh/article/113/9/505/5505396>
14. Costa JML, Costa AAUML, Elkhoury AN, Bezerril ACR, Barral A, Saldanha ACR. Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. *Gaz Médica da Bahia* [Internet]. 2009 [cited 2023 Oct 17];79(Supl. 3):16–24. Available from: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/9762>
15. Roberts J. Current perspectives on preeclampsia. *J Nurse Midwifery*. 1994;39(2):70–90.
16. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research* [Internet]. 2017 May 26;6:750. Available from: <https://f1000research.com/articles/6-750/v1>
17. Mokni M. [Cutaneous leishmaniasis]. *Ann Dermatol Venereol* [Internet]. 2019 Mar;146(3):232–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30879803>
18. Center for disease Control C. Leishmaniasis, Parasites [Internet]. 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
19. Zamora-Chimal J, Hernández-Ruiz J, Becker I. NKT cells in leishmaniasis. *Immunobiology* [Internet]. 2017 Apr;222(4):641–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298516304545>
20. Volpedo G, Pacheco-Fernandez T, Bhattacharya P, Oljuskin T, Dey R, Gannavaram S, et al. Determinants of Innate Immunity in Visceral Leishmaniasis and Their Implication in Vaccine Development. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA; 2021.
21. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stangé G, Van Bossche J Den, et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Jul 15 [cited 2023 Nov 1];70(14):5728–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20570887/>
22. Linhares Queiroz S, Azevedo Batista A. Biological functions of nitric oxide. *Quim Nova*. 1999;22(4):584–90.
23. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2002 Nov [cited 2023 Jun 20];2(11):845–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12415308/>
24. Strehl B, Seifert U, Krüger E, Heink S, Kuckelkorn U, Kloetzel P. Interferon- γ , the functional plasticity of the ubiquitin–proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* [Internet]. 2005 Oct 23 [cited 2023 Sep 14];207(1):19–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16181324/>
25. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, et al. Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of <sc>l</sc> -

- Arginine Metabolism. *J Immunol* [Internet]. 2001 Dec 1 [cited 2023 Nov 1];167(11):6533–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11714822/>
26. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011 Aug 11;9(8):604–15. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2608>
 27. Samant M, Sahu U, Pandey SC, Khare P. Role of Cytokines in Experimental and Human Visceral Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021 Feb 18;11:624. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.624009/full>
 28. Gomes CM, Ávila LR, Pinto SA, Duarte FB, Pereira LIA, Abrahamssohn IA, et al. *Leishmania braziliensis* amastigotes stimulate production of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TGF- β by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residents. *Parasite Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2023 Nov 17];36(5):225–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24575815/>
 29. Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F. The Prominent Role of Neutrophils during the Initial Phase of Infection by *Leishmania* Parasites. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2010 [cited 2023 Oct 5];2010. Available from: </pmc/articles/PMC2768872/>
 30. Gonçalves-de-Albuquerque S da C, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, de Goes TC, de Moraes RCS, Oliveira CN d. C, et al. The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Oct 30 [cited 2023 Oct 5];8(OCT):1437. Available from: </pmc/articles/PMC5670345/>
 31. Rojas C, Campos-Mora M, Cárcamo I, Villalón N, Elhusseiny A, Contreras-Kallens P, et al. T regulatory cells-derived extracellular vesicles and their contribution to the generation of immune tolerance. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2023 Oct 5];108(3):813–24. Available from: <https://dx.doi.org/10.1002/JLB.3MR0420-533RR>
 32. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2016 Sep 18 [cited 2023 Oct 5];16(9):581–92. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri.2016.72>
 33. Toepp AJ, Petersen CA. The Balancing Act: Immunology of Leishmaniasis. *Res Vet Sci* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2023 Oct 5];130:19. Available from: </pmc/articles/PMC7141962/>
 34. Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4+ CD25+ Regulatory T Cells in Reactivation of Persistent Leishmaniasis and Control of Concomitant Immunity. *J Exp Med* [Internet]. 2004 Jul 7 [cited 2023 Sep 14];200(2):201. Available from: </pmc/articles/PMC2212012/>
 35. Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2023 Sep 15];174(11):7147–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15905558/>
 36. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death

- pathway. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2002 Oct 1 [cited 2023 Sep 14];2(10):735–47. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri911>
37. Mittrücker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2023 Oct 27];62(6):449–58. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00005-014-0293-y>
 38. Passero LFD. Avaliação da resposta imune celular desencadeada por antígenos protéicos isolados de *Leishmania (Viannia) shawi* [Internet]. [São Paulo]: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-24082011-164748/>
 39. Dobrzanski MJ, Reome JB, Hollenbaugh JA, Dutton RW. Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses. *J Immunol* [Internet]. 2004 Feb 1 [cited 2023 Sep 14];172(3):1380–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14734713/>
 40. Scott P. Long-Lived Skin-Resident Memory T Cells Contribute to Concomitant Immunity in Cutaneous Leishmaniasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Sep 14];12(10):1–11. Available from: <https://pmc/articles/PMC7528853/>
 41. van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2019 Mar;33(1):79–99. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552018300928>
 42. Wilhelm TJ. Viszerale Leishmaniose. *Der Chir*. 2019 Jul;90(10):833–7.
 43. Sandoval Pacheco CM, Araujo Flores GV, Favero Ferreira A, Sosa Ochoa W, Ribeiro da Matta VL, Zúniga Valeriano C, et al. Histopathological features of skin lesions in patients affected by non-ulcerated or atypical cutaneous leishmaniasis in Honduras, Central America. *Int J Exp Pathol*. 2018 Oct;99(5):249–57.
 44. Araujo Flores GV, Sandoval Pacheco CM, Tomokane TY, Sosa Ochoa W, Zúniga Valeriano C, Castro Gomes CM, et al. Evaluation of Regulatory Immune Response in Skin Lesions of Patients Affected by Nonulcerated or Atypical Cutaneous Leishmaniasis in Honduras, Central America. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2018;2018:1–7. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2018/3487591/>
 45. McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2023 May 22];107(1):7–14. Available from: <https://academic.oup.com/qjmed/article/107/1/7/1513262>
 46. Volpedo G, Pacheco-Fernandez T, Holcomb EA, Cipriano N, Cox B, Satoskar AR. Mechanisms of Immunopathogenesis in Cutaneous Leishmaniasis And Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2021 Jun 8;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.685296/full>
 47. Ramesh V, Kaushal H, Mishra AK, Singh R, Salotra P. Clinico-epidemiological analysis of Post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) cases in India over last two decades: a

- hospital based retrospective study. *BMC Public Health* [Internet]. 2015 Dec 26 [cited 2023 Oct 5];15(1):1092. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26503551/>
48. Pal B, Murti K, Siddiqui NA, Das P, Lal CS, Babu R, et al. Assessment of quality of life in patients with post kalaazar dermal leishmaniasis. *Health Qual Life Outcomes* [Internet]. 2017 Dec 24 [cited 2023 Oct 5];15(1):148. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28738881/>
 49. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect*. 2014 Nov 1;69(S1):10–8.
 50. Morrison B, Mendoza I, Delgado D, Reyes Jaimes O, Aranzazu N, Paniz Mondolfi AE. Diffuse (anergic) cutaneous leishmaniasis responding to amphotericin B: Clinical dermatology • Concise report. *Clin Exp Dermatol* [Internet]. 2010 Jun 1 [cited 2023 Oct 17];35(4):116–9. Available from: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2230.2009.03737.x>
 51. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2004 May [cited 2023 May 19];99(3):239–51. Available from: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/QphpbBrw8JqD3fsCj9CLpRD/?lang=en>
 52. Reithinger R, Dujardin J-C, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2007 Sep 1 [cited 2023 May 19];7(9):581–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309907702098>
 53. Sabzevari S, Mohebbali M, Hashemi SA. Mucosal and mucocutaneous leishmaniasis in Iran from 1968 to 2018: a narrative review of clinical features, treatments, and outcomes. *Int J Dermatol*. 2020 May;59(5):606–12.
 54. Abadías-Granado I, Diago A, Cerro PA, Palma-Ruiz AM, Gilaberte Y. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Actas Dermosifiliogr* [Internet]. 2021 Jul;112(7):601–18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001731021001083>
 55. Suqati AA, Pudszuhn A, Hofmann VM. Mucocutaneous leishmaniasis: Case report and literature review of a rare endonasal infection. *Pan Afr Med J*. 2020 May;36(292):1–4.
 56. Pradhan S, Schwartz RA, Patil A, Grabbe S, Goldust M. Treatment options for leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* [Internet]. 2022 Mar 20 [cited 2023 May 22];47(3):516–21. Available from: <https://academic.oup.com/ced/article/47/3/516/6693189>
 57. Sundar S, Chakravarty J. Antimony Toxicity. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2010 [cited 2023 Sep 17];7(12):4267. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20103037/>
 58. Frézard F, Demicheli C, Ribeiro R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules* [Internet]. 2009 Jun 30;14(7):2317–36. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/14/7/2317>
 59. Scarpini S, Dondi A, Totaro C, Biagi C, Melchionda F, Zama D, et al. Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. *Microorganisms* [Internet]. 2022 Sep 21 [cited 2023 May 16];10(10):1887. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36296164/>

60. Baiocco P, Colotti G, Franceschini S, Ilari A. Molecular basis of antimony treatment in Leishmaniasis. *J Med Chem*. 2009 Apr;52(8):2603–12.
61. Flohé L. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. *Biotechnol Adv*. 2012 Jan 1;30(1):294–301.
62. Pita SS da R, Pascutti PG. Pharmacophore Analysis of Trypanosoma cruzi Trypanothione Reductase (TR) Complexed with Peptide Mimetic Inhibitors. *Rev Virtual Química [Internet]*. 2012 [cited 2023 Oct 19];4(6):788–804. Available from: <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/310/262>
63. Linares G, Ravaschino E, Rodriguez J. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. *Curr Med Chem [Internet]*. 2006 Jan 30 [cited 2023 Oct 19];13(3):335–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16475941/>
64. Ilari A, Genovese I, Fiorillo F, Battista T, De Ionna I, Fiorillo A, et al. Toward a Drug Against All Kinetoplastids: From LeishBox to Specific and Potent Trypanothione Reductase Inhibitors. *Mol Pharm*. 2018 Aug;15(8):3069–78.
65. Battista T, Colotti G, Ilari A, Fiorillo A. Targeting Trypanothione Reductase, a Key Enzyme in the Redox Trypanosomatid Metabolism, to Develop New Drugs against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Molecules [Internet]*. 2020 Apr 21;25(8):1924. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/8/1924>
66. de Moura TR, Santos MLB, Braz JM, Santos LFVC, Aragão MT, de Oliveira FA, et al. Cross-resistance of Leishmania infantum isolates to nitric oxide from patients refractory to antimony treatment, and greater tolerance to antileishmanial responses by macrophages. *Parasitol Res*. 2016 Feb;115(2):713–21.
67. Rauf MK, Shaheen U, Asghar F, Badshah A, Nadhman A, Azam S, et al. Antileishmanial, DNA Interaction, and Docking Studies of Some Ferrocene-Based Heteroleptic Pentavalent Antimonials. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2016 Jan;349(1):50–62.
68. de Melo EC, Fortaleza CMCB. Challenges in the Therapy of Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Public Health Perspective. *J Trop Med [Internet]*. 2013 [cited 2023 Aug 5];2013:1–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23870087/>
69. Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin J-C, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. Maes L, editor. *PLoS Negl Trop Dis [Internet]*. 2017 Dec 14;11(12):6052. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
70. Roatt BM, de Oliveira Cardoso JM, De Brito RCF, Coura-Vital W, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Reis AB. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl Microbiol Biotechnol [Internet]*. 2020 Nov 2 [cited 2023 May 22];104(21):8965–77. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-020-10856-w>
71. Yamamoto ES, de Jesus JA, Bezerra-Souza A, Brito JR, Lago JHG, Laurenti MD, et al. Tolnaftate inhibits ergosterol production and impacts cell viability of Leishmania sp. *Bioorg Chem [Internet]*. 2020 Sep;102:104056. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206820313535>

72. Balasegaram M, Ritmeijer K, Lima MA, Burza S, Ortiz Genovese G, Milani B, et al. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. *Expert Opin Emerg Drugs* [Internet]. 2012 Dec 20;17(4):493–510. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728214.2012.748036>
73. Coelho AC, Oliveira JC, Espada CR, Reimão JQ, Trinconi CT, Uliana SRB. A Luciferase-Expressing *Leishmania braziliensis* Line That Leads to Sustained Skin Lesions in BALB/c Mice and Allows Monitoring of Miltefosine Treatment Outcome. Milon G, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 May 4;10(5). Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004660>
74. Groll AH, Rijnders BJA, Walsh TJ, Adler-Moore J, Lewis RE, Brüggemann RJM. Clinical Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Safety and Efficacy of Liposomal Amphotericin B. *Clin Infect Dis*. 2019 May;68(Suppl 4):260–74.
75. Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2017 Dec;12:25–40. Available from: <https://www.dovepress.com/leishmaniasis-in-humans-drug-or-vaccine-therapy-peer-reviewed-article-DDDT>
76. Hamill RJ. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2023 May 22];73(9):919–34. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40265-013-0069-4>
77. Wang X, Mohammad IS, Fan L, Zhao Z, Nurunnabi M, Sallam MA, et al. Delivery strategies of amphotericin B for invasive fungal infections. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2021 Aug;11(8):2585–604. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211383521001374>
78. Adler-Moore J, Proffitt RT. AmBisome: Liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Jan;49(SUPL. S1):21–30.
79. Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2012 Nov 1;67(11):2576–97. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dks275>
80. Palić S, Beijnen JH, Dorlo TPC. An update on the clinical pharmacology of miltefosine in the treatment of leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2022 Jan;59(1):106459. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857921012929>
81. Berbert TRN, Mello TFP De, Wolf Nassif P, Mota CA, Silveira AV, Duarte GC, et al. Pentavalent Antimonials Combined with Other Therapeutic Alternatives for the Treatment of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review. *Dermatol Res Pract* [Internet]. 2018 Dec 24 [cited 2023 May 16];2018:1–21. Available from: </pmc/articles/PMC6323433/>
82. Srivastava S, Mishra J, Gupta AK, Singh A, Shankar P, Singh S. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasites and Vectors*. 2017 Jan;10(1):1–11.

83. Goto H. Review of the current treatments for leishmaniasis. *Res Rep Trop Med*. 2012 Jul;3:69.
84. Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World Leishmania Infections. *Dermatol Clin* [Internet]. 2015 Jul;33(3):579–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733863515000315>
85. Organization WH. Treatment of leishmaniasis [Internet]. 2023 [cited 2023 May 16]. Available from: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_3
86. Scariot DB, Staneviciute A, Zhu J, Li X, Scott EA, Engman DM. Leishmaniasis and Chagas disease: Is there hope in nanotechnology to fight neglected tropical diseases? *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Sep;12.
87. Drugs for Neglected Diseases Initiative. Target product profile for cutaneous leishmaniasis [Internet]. 2022 [cited 2023 May 23]. Available from: <https://dndi.org/diseases/cutaneous-leishmaniasis/target-product-profile/>
88. Silva EJ, Bezerra-Souza A, Passero LF, Laurenti MD, Ferreira GM, Fujii DGV, et al. Synthesis, leishmanicidal activity, structural descriptors and structure-activity relationship of quinoline derivatives. *Future Med Chem*. 2018 Aug;10(17):2069–85.
89. Yadav P, Shah K. Quinolines, a perpetual, multipurpose scaffold in medicinal chemistry. *Bioorg Chem* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2023 May 25];109:104639. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206821000158>
90. Prajapati SM, Patel KD, Vekariya RH, Panchal SN, Patel HD. Recent advances in the synthesis of quinolines: A review. *RSC Adv*. 2014;4(47):24463–76.
91. Matada BS, Pattanashettar R, Yernale NG. A comprehensive review on the biological interest of quinoline and its derivatives. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2021 Feb 15 [cited 2023 Sep 17];32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089620308038>
92. Senerovic L, Opsenica D, Moric I, Aleksic I, Spasić M, Vasiljevic B. Quinolines and quinolones as antibacterial, antifungal, anti-virulence, antiviral and anti-parasitic agents. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2020 [cited 2023 Oct 6];1282:37–69. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/5584_2019_428
93. Wiesner J, Ortmann R, Jomaa H, Schlitzer M. New Antimalarial Drugs. *Angew Chemie Int Ed* [Internet]. 2003 Nov 10 [cited 2023 Oct 6];42(43):5274–93. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.200200569>
94. Shang XF, Morris-Natschke SL, Liu YQ, Guo X, Xu XS, Goto M, et al. Biologically active quinoline and quinazoline alkaloids part I. *Med Res Rev* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2023 Oct 6];38(3):775–828. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/med.21466>
95. Manske RH. The Chemistry of Quinolines. *Chem Rev* [Internet]. 1942 Feb 1;30(1):113–44. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr60095a006>
96. Oliveri V, Vecchio G. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural

- perspective. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2016 Sep 14 [cited 2023 May 25];120:252–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523416303737>
97. Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA. Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J Am Chem Soc*. 1966;88(16):3888–90.
 98. Manske RHF, Kulka M. The α -krap Synthesis of Quinolines. In: *Organic Reactions* [Internet]. Wiley; 2011. p. 59–98. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471264180.or007.02>
 99. Saadeh H, Sweidan K, Mubarak M. Recent Advances in the Synthesis and Biological Activity of 8-Hydroxyquinolines. *Molecules* [Internet]. 2020 Sep 21 [cited 2023 May 25];25(18):4321. Available from: [/pmc/articles/PMC7571046/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34811446/)
 100. National Center for Biotechnology Information. 8-hydroxyquinoline. Summary for CID 1923, 8-Hydroxyquinoline. [Internet]. PubChem Compound. 2022. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8-Hydroxyquinoline>
 101. Scalese G, Machado I, Fontana C, Risi G, Salinas G, Pérez-Díaz L, et al. New heteroleptic oxidovanadium(V) complexes: synthesis, characterization and biological evaluation as potential agents against *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Inorg Chem* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2023 Jul 6];23(8):1265–81. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00775-018-1613-1>
 102. Rivas F, Medeiros A, Comini M, Suescun L, Rodríguez Arce E, Martins M, et al. Pt-Fe ferrocenyl compounds with hydroxyquinoline ligands show selective cytotoxicity on highly proliferative cells. *J Inorg Biochem* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2023 Jul 6];199. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013419302806>
 103. Allam G, Eweas AF, Abuelsaad ASA. In vivo schistosomicidal activity of three novels 8-hydroxyquinoline derivatives against adult and immature worms of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* [Internet]. 2013 Sep 22 [cited 2023 Jul 6];112(9):3137–49. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-013-3490-4>
 104. Costa Duarte M, dos Reis Lage LM, Lage DP, Mesquita JT, Salles BCS, Lavorato SN, et al. An effective in vitro and in vivo antileishmanial activity and mechanism of action of 8-hydroxyquinoline against *Leishmania* species causing visceral and tegumentary leishmaniasis. *Vet Parasitol* [Internet]. 2016 Feb 15 [cited 2023 May 25];217:81–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401716300024>
 105. Duarte MC, Lage LM dos R, Lage DP, Martins VT, Carvalho AMRS, Roatt BM, et al. Treatment of murine visceral leishmaniasis using an 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system. *Parasitol Int* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2023 May 25];65(6):728–36. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383576916302240>
 106. Tavares GSV, Mendonça DVC, Pereira IAG, Oliveira-da-Silva JA, Ramos FF, Lage DP, et al. A clioquinol-containing Pluronic® F127 polymeric micelle system is effective in the treatment of visceral leishmaniasis in a murine model. *Parasite* [Internet]. 2020 Apr 30 [cited 2023 May 25];27:29. Available from: [/pmc/articles/PMC7191975/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34811446/)

107. Tavares GSV, Mendonça DVC, Miyazaki CK, Lage DP, Soyer TG, Carvalho LM, et al. A Pluronic® F127-based polymeric micelle system containing an antileishmanial molecule is immunotherapeutic and effective in the treatment against *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitol Int* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2023 May 25];68(1):63–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383576918303751>
108. Passero LFD, Tomokane TY, Corbett CEP, Laurenti MD, Toyama MH. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. *Parasitol Res*. 2007 Jul;101(5):1365–71.
109. Passero LFD, Assis RR, da Silva TNF, Nogueira PM, Macedo DH, Pessoa NL, et al. Differential modulation of macrophage response elicited by glycoinositolphospholipids and lipophosphoglycan from *Leishmania (Viannia) shawi*. *Parasitol Int*. 2015 Aug;64(4):32–5.
110. Serrano DR, Gordo MJ, Matji A, González S, Lalatsa A, Torrado JJ. Tuning the Transdermal Delivery of Hydroquinone upon Formulation with Novel Permeation Enhancers. *Pharmaceutics* [Internet]. 2019 Apr 4 [cited 2023 Jul 21];11(4):167. Available from: [/pmc/articles/PMC6523612/](https://pmc/articles/PMC6523612/)
111. Silva IR, Lima FA, Reis ECO, Ferreira LAM, Goulart GAC. Stepwise Protocols for Preparation and Use of Porcine Ear Skin for in Vitro Skin Permeation Studies Using Franz Diffusion Cells. *Curr Protoc* [Internet]. 2022 Mar 15 [cited 2023 Sep 20];2(3):391. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cpz1.391>
112. Merck Kg. Pioneering Skin Testing - Experience the Unmatched Predictability of Strat-M® Membrane [Internet]. Vols. 1–8. 2018. Available from: https://dicsa.es/assets/downloads/2018-13609_Strat-M_membrane_product_brochure_MRK_Web_DP.pdf
113. Haq A, Goodyear B, Ameen D, Joshi V, Michniak-Kohn B. Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. *Int J Pharm* [Internet]. 2018 Aug 25 [cited 2023 Sep 20];547(1–2):432–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29890259/>
114. Lalatsa A, Patel P V., Sun Y, Kiun CC, Karimi F, Zekonyte J, et al. Transcutaneous anaesthetic nano-enabled hydrogels for eyelid surgery. *Int J Pharm* [Internet]. 2020 Mar 15 [cited 2023 May 25];577. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517319310646>
115. Passero LFD, Da Costa Bordon MLA, De Carvalho AK, Martins LM, Corbett CEP, Laurenti MD. Exacerbation of *Leishmania (Viannia) shawi* infection in BALB/c mice after immunization with soluble antigen from amastigote forms. *APMIS*. 2010 Dec;118(12):973–81.
116. Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol* [Internet]. 2013 Sep;59(3):583–94. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827813002134>
117. Mukbel RM, Patten C, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop*

- Med Hyg. 2007 Apr;76(4):669–75.
118. Coimbra ES, Antinarelli LMR, Silva NP, Souza IO, Meinel RS, Rocha MN, et al. Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. *Chem Biol Interact*. 2016 Dec;260:50–7.
 119. Kaushik D, Granato JT, Macedo GC, Dib PRB, Piplani S, Fung J, et al. Toll-like receptor-7/8 agonist kill *Leishmania amazonensis* by acting as pro-oxidant and pro-inflammatory agent. *J Pharm Pharmacol*. 2021 Sep;73(9):1180–90.
 120. Calixto SL, Glanzmann N, Xavier Silveira MM, da Trindade Granato J, Gorza Scopel KK, Torres de Aguiar T, et al. Novel organic salts based on quinoline derivatives: The in vitro activity trigger apoptosis inhibiting autophagy in *Leishmania* spp. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2018 Sep 25 [cited 2023 Nov 1];293:141–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30098941/>
 121. Suarez ET, Granados-Falla DS, Robledo SM, Murillo J, Upegui Y, Delgado G. Antileishmanial activity of synthetic analogs of the naturally occurring quinolone alkaloid N-methyl-8-methoxyflindersin. *PLoS One* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Aug 31];15(12). Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0243392>
 122. Perrotta I, Carito V, Russo E, Tripepi S, Aquila S, Donato G. Macrophage Autophagy and Oxidative Stress: An Ultrastructural and Immunoelectron Microscopical Study. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2011 [cited 2023 Nov 1];2011:1–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21922037/>
 123. Forman HJ, Torres M. Signaling by the respiratory burst in macrophages. *IUBMB Life* [Internet]. 2001 [cited 2023 Nov 1];51(6):365–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11758804/>
 124. Franzol A, Rezende MC. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. *Polímeros* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2023 Nov 6];25:1–9. Available from: <https://www.scielo.br/j/po/a/3zgzkZ5GKyNRYfqVqZYTBM9z/>
 125. Baroli B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? *J Pharm Sci* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2023 Aug 24];99(1):21–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916303434>
 126. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2004 Mar 27 [cited 2023 Jul 20];56(5):603–18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X03002412>
 127. Barry BW. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J Control Release* [Internet]. 1987 Dec [cited 2023 Jul 20];6(1):85–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168365987900666>
 128. Arce FJ, Asano N, See GL, Itakura S, Todo H, Sugibayashi K. Usefulness of Artificial Membrane, Strat-M®, in the Assessment of Drug Permeation from Complex Vehicles in Finite Dose Conditions. *Pharmaceutics* [Internet]. 2020 Feb 19 [cited 2023 Sep

- 21];12(2):173. Available from: [/pmc/articles/PMC7076464/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6229586/)
129. Riviere JE, Brooks JD. Predicting skin permeability from complex chemical mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2005 Oct 15 [cited 2023 May 26];208(2):99–110. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X05001110>
 130. Stohs SJ, Ezzedeen FW, Anderson AK, Baldwin JN, Makoid MC. Percutaneous absorption of iodochlorhydroxyquin in humans. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1984 Feb [cited 2023 Nov 5];82(2):195–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6229586>
 131. Fischer T, Fagerlund C, Hartvig P. View of Absorption of 8-hydroxyquinolines through the human skin. *Acta Dermatovener* [Internet]. 1978 [cited 2023 Nov 5];58:407–11. Available from: <https://medicaljournalssweden.se/actadv/article/view/17289/21141>
 132. Saha P, Mukhopadhyay D, Chatterjee M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2011 Nov 1 [cited 2023 Aug 30];11(11):1668–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576911003043>
 133. Baneth G, Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2002 Jul 2;106(4):315–24.
 134. Lage LM dos R, Barichello JM, Lage DP, Mendonça DVC, Carvalho AMRS, Rodrigues MR, et al. An 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system is effective for the treatment of murine tegumentary leishmaniasis. *Parasitol Res* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2023 May 25];115(11):4083–95. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-016-5181-4>
 135. Lima SKS de, Jesus JA, Raminelli C, Laurenti MD, Passero LFD. High Selectivity of 8-Hydroxyquinoline on *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* Species Correlates with a Potent Therapeutic Activity In Vivo. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2023 May 7 [cited 2023 Jun 14];16(5):707. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8247/16/5/707/htm>
 136. Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CEP. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* [Internet]. 2009 Aug 1 [cited 2023 Jun 20];31(8):423–31. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3024.2009.01116.x>
 137. Passero LFD, Marques C, Vale-Gato I, Corbett CEP, Laurenti MD, Santos-Gomes G. Histopathology, humoral and cellular immune response in the murine model of *Leishmania (Viannia) shawi*. *Parasitol Int* [Internet]. 2010 Jun [cited 2023 Sep 29];59(2):159–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20060062/>
 138. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2005 Aug 31 [cited 2023 Nov 5];100(5):525–34. Available from: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/355sxDHhrZQrJfcKVz9QdWN/?lang=en>

139. von Stebut E, Tenzer S. Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*. *Int J Med Microbiol*. 2018 Jan 1;308(1):206–14.
140. Santos-Mateus D, Passero F, Rodrigues A, Valério-Bolas A, Silva-Pedrosa R, Pereira M, et al. The Battle between *Leishmania* and the Host Immune System at a Glance. *Int Trends Immun* [Internet]. 2016 [cited 2023 Nov 5];4:28. Available from: <https://novaresearch.unl.pt/en/publications/the-battle-between-leishmania-and-the-host-immune-system-at-a-gla>
141. Gabriel Á, Valério-Bolas A, Palma-Marques J, Mourata-Gonçalves P, Ruas P, Dias-Guerreiro T, et al. Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. *J Immunol Res* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 Nov 5];2019:1–16. Available from: [/pmc/articles/PMC6913332/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35411332/)
142. De Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* [Internet]. 2005 Sep [cited 2023 Nov 5];73(9):5827–34. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.73.9.5827-5834.2005>
143. Moraes MA, Silveira FT. Histopathology of the localized form of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 1994 [cited 2023 Nov 5];36(5):459–63. Available from: <https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/pKht5CWFZZTNwJjg4LTPPdy/abstract/?format=html&lang=en>
144. Seyed N, Rafati S. Th1 concomitant immune response mediated by IFN- γ protects against sand fly delivered *Leishmania* infection: Implications for vaccine design. *Cytokine*. 2021 Nov;147.
145. Laskay T, Van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2023 Nov 3];11(5):210–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12781523/>
146. Abebe T, Hailu A, Woldeyes M, Mekonen W, Bilcha K, Cloke T, et al. Local increase of arginase activity in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis in ethiopia. Correa-Oliveira R, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2012 Jun 12 [cited 2023 Nov 4];6(6). Available from: [/pmc/articles/PMC3373636/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22411332/)
147. Pereira BAS, Alves CR. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol*. 2008 Dec 20;158(4):239–55.
148. Rolão N, Cortes S, Gomes-Pereira S, Campino L. *Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. *Exp Parasitol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2023 Aug 30];115(3):270–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17087930/>
149. Peine KJ, Gupta G, Brackman DJ, Papenfuss TL, Ainslie KM, Satoskar AR, et al. Liposomal resiquimod for the treatment of *Leishmania donovani* infection. *J Antimicrob*

- Chemother [Internet]. 2014 Jan [cited 2023 Oct 30];69(1):168. Available from: /pmc/articles/PMC3861330/
150. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nat* 1996 383(6603) [Internet]. 1996 Oct 31 [cited 2023 Aug 31];383(6603):787–93. Available from: <https://www.nature.com/articles/383787a0>
 151. Sundar S, Reed SG, Sharma S, Mehrotra A, Murray HW. Circulating T Helper 1 (Th1) Cell- and Th2 Cell-Associated Cytokines in Indian Patients with Visceral Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1997 May 1 [cited 2023 Aug 31];56(5):522–5. Available from: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/56/5/article-p522.xml>
 152. Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect Immun* [Internet]. 2000 Apr [cited 2023 Aug 31];68(4):1760–4. Available from: /pmc/articles/PMC97345/

ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Tratamento tópico da leishmaniose cutânea experimental com 8-hidroxiquinolina**”, registrada com o nº **1648/2022**, sob a responsabilidade de **Luiz Felipe Domingues Passero** e **Sarah Kymberly Santos De Lima**, apresentada pelo Departamento de Patologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 16/03/2022.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 30-04-2021 Término: 30-05-2023
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Balb/c
Nº de animais	90
Peso/Idade	4 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 16 de março de 2022

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO B - ARTIGO PUBLICADO

High Selectivity of 8-Hydroxyquinoline on *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* Species Correlates with a Potent Therapeutic Activity *In Vivo*

pharmaceuticals



Article

High Selectivity of 8-Hydroxyquinoline on *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* Species Correlates with a Potent Therapeutic Activity In VivoSarah Kymberly Santos de Lima ^{1,2}, Jéssica Adriana Jesus ¹, Cristiano Raminelli ³, Márcia Dalastra Laurenti ² and Luiz Felipe Domingues Passero ^{1,4,*}¹ Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Praça Infante Dom Henrique, s/n, São Vicente 11330-900, Brazil; sarahkslima@gmail.com (S.K.S.d.L.); jessica.dolly@hotmail.com (J.A.J.)² Laboratory of Pathology of Infectious Diseases (LIM50), Department of Pathology, Medical School of São Paulo University, São Paulo 01246-903, Brazil; mdlauten@usp.br³ Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacéuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema 09920-000, Brazil; raminelli@unifesp.br⁴ Institute for Advanced Studies of Ocean, São Paulo State University (UNESP), Rua João Francisco Bendorp, 1178, São Vicente 11350-011, Brazil

* Correspondence: felipe.passero@unesp.br; Tel.: +55-13-3569-7100

Abstract: Leishmaniasis is a neglected disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which causes different clinical manifestations. Drugs currently used in the treatment such as pentavalent antimonial and amphotericin B cause severe side effects in patients, and parasite resistance has been reported. Thus, it is necessary and urgent to characterize new and effective alternative drugs to replace the current chemotherapy of leishmaniasis. In this regard, it has been experimentally demonstrated that quinoline derivatives present significant pharmacological and parasitic properties. Thus, the aim of this work was to demonstrate the leishmanicidal activity of 8-hydroxyquinoline (8-HQ) in vitro and in vivo. The leishmanicidal activity (in vitro) of 8-HQ was assayed on promastigote and intracellular amastigote forms of *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, and *L. (V.) shawi*. Additionally, the levels of nitric oxide and hydrogen peroxide were analyzed. The therapeutic potential of 8-HQ was analyzed in BALB/c mice infected with a strain of *L. (L.) amazonensis* that causes anergic cutaneous diffuse leishmaniasis. In vitro data showed that at 24 and 72 h, 8-HQ eliminated promastigote and intracellular amastigote forms of all studied species and this effect may be potentialized by nitric oxide. Furthermore, 8-HQ was more selective than miltefosine. Infected animals treated with 8-HQ by the intralésional route dramatically reduced the number of tissue parasites in the skin, and it was associated with an increase in IFN- γ and decrease in IL-4, which correlated with a reduction in inflammatory reaction in the skin. These results strongly support the idea that 8-HQ is an alternative molecule that can be employed in the treatment of leishmaniasis, given its selectivity and multispectral action in parasites from the *Leishmania* genus.

Keywords: leishmaniasis; cutaneous leishmaniasis; treatment

Citation: Lima, S.K.S.d.; Jesus, J.A.; Raminelli, C.; Laurenti, M.D.; Passero, L.F.D. High Selectivity of 8-Hydroxyquinoline on *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* Species Correlates with a Potent Therapeutic Activity In Vivo. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 707. <https://doi.org/10.3390/ph16050707>

Academic Editor: Christophe Dardonville

Received: 12 April 2023

Revised: 4 May 2023

Accepted: 5 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by a protozoa of the genus *Leishmania*, and at least 20 species can infect and cause the disease in humans, domestic, and wild animals [1]. During the life cycle of *Leishmania* sp., two different forms of the parasite can be characterized such as promastigotes that are flagellated forms, adapted to live extracellularly attached to the intestinal epithelium of sand fly vectors of the genera *Phlebotomus* or *Lutzomyia*, and amastigote forms, which are adapted to survive intracellularly in special compartments known as parasitophorous vacuoles that are assembled in macrophages and dendritic cells rapidly after infection. *Leishmania* parasites are transmitted to vertebrates

during the blood meal of a female sand fly as promastigote forms, which are rapidly phagocytosed by macrophages; in the parasitophorous vacuoles, promastigotes differentiate into amastigote [2,3]. After some cycles of asexual reproduction, the excessive number of intracellular amastigotes lyses macrophages, and extracellular amastigotes infect nearby macrophages in the skin, or even reach other parts of the tegument as well as visceral organs such as the liver, spleen, or bone marrow [4,5]. However, other mechanisms of macrophage infection have been described; in this case, amastigote forms surrounded by the host cell membrane are transferred from an infected cell to another cell; this silent way of infection may be an important tactic to evade the immune response of the host [6].

Depending on the infecting species and localization of parasites in the body, different clinical forms of leishmaniasis can be diagnosed such as cutaneous or visceral leishmaniasis. In particular, cutaneous leishmaniasis (CL) exhibits a wide spectrum of clinical manifestations such as localized cutaneous leishmaniasis (LCL), which usually develops as an ulcerated lesion at the site of the sandfly bite, is painless and generally self-healing, but eventually leads to the development of a permanent scar, creating a stigma in patients [7,8]. Furthermore, LCL caused by *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* can progress to a more severe manifestation such as anergic cutaneous diffuse leishmaniasis (ACDL) and mucocutaneous leishmaniasis (ML), respectively [9].

Despite the undoubted epidemiological and medical significance of *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis*, other species also exhibit great medical and scientific importance in the South and Central Americas because they are ethological agents of CL such as *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (L.) lainsoni*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) naiffi*, and *L. (L.) infantum chagasi*, which was isolated from the skin of Honduran patients exhibiting atypical cutaneous leishmaniasis [10,11]. In general, parasites multiply and persist within tissue macrophages because they are able to suppress the development of a Th1 immune response, in particular, intracellular parasites suppress the production of IFN- γ and TNF- α cytokines, which activate macrophages to a leishmanicidal state. In contrast, the acquired immune response observed in patients with leishmaniasis is related to a Th2 immune response with a high production of IL-4, IL-10, or TGF- β , cytokines that are not protective to the vertebrate host. Therefore, downregulation of the Th1 immune response with a consequent upregulation of the Th2 immune response allows the parasite to multiply in tissues, and consequently, lesions spread along the cutaneous surface [12].

Although the importance of Th1 and Th2 immune responses in leishmaniasis has been widely discussed, no immunoprophylactic products such as vaccines have been produced to inhibit leishmanial infection and disease progression in humans [13,14]. Thus, conventional drugs such as pentavalent antimonial, amphotericin B, and miltefosine are the only approach to restrain the parasite and inhibit disease.

Pentavalent antimonials, originally developed as antiemetic drugs, have been used as first-line treatment for leishmaniasis since 1940 [15]. In the intracellular environment, pentavalent antimonials become active only after their reduction into trivalent antimonials, which can inhibit leishmanial trypanothione reductase (TR), an enzyme responsible for protecting trypanosomatids from oxidative damage [16–18]. In this way, pentavalent antimonials keep trypanothione in its oxidized state, making it impossible to scavenge reactive oxygen species (ROS), leading to the death of the parasite [19]. Treatment with pentavalent antimonial is performed by intravenous or intramuscular routes, however, even in systemic administration, this drug displays low selectivity in humans, causing several local and systemic side effects including abdominal cramps, nausea, weakness, cardiotoxicity, hepatotoxicity, and pancreatitis [20–22]. The emergence of parasites resistant to antimonials is a constant concern that impacts the cure rates, as observed in Bihar (India), where 60% of cases were refractory to antimonial treatment [23,24]. In Brazil, recent studies showed a variation of 60% to 90% in the cure rate, associated with 15% of cases that developed cardiotoxicity, hepatotoxicity, and pancreatitis during treatment [25].

Amphotericin B has been used as a second-line treatment for leishmaniasis, mainly in cases where antimonials are not effective due to the presence of resistant parasites or by low

patient compliance to the treatment [26]. This drug is an antifungal antibiotic that binds to *Leishmania* ergosterol, leading to the formation of pores in the cell membrane, which allow the passage of ions, macromolecules, and water through the lipid bilayer; this hydric and ionic disbalance causes the death of *Leishmania* sp. Although a high rate of efficacy has been observed during the treatment of leishmaniasis, amphotericin B also binds to cholesterol, the main component of the mammalian cell membrane, causing severe side effects in humans that include fever, chills, arthralgia, nausea, vomiting, and headache, in addition to nephrotoxicity, which is observed in approximately 53% of patients [27]. Furthermore, this treatment is prolonged and requires medical monitoring, making it unsatisfactory to patients. On the other hand, amphotericin B entrapped into liposomes such as Ambisome[®] exhibits low toxicity while maintaining efficacy in comparison to conventional amphotericin B [28,29]; this happens because liposomes are able to penetrate into the main organs affected by parasites, especially the spleen and liver, which in fact minimize the interaction of amphotericin B with cholesterol from the host cell membrane, and as a consequence, the toxicity is reduced in patients. However, the costs associated with this treatment limit the use of such formulations in low-income countries [27].

Miltefosine has been considered another second-line drug to treat leishmaniasis, and it is only available to be employed as an oral treatment. This drug is an alkylphosphocholine that was originally developed in 1940 as an anti-tumoral drug [30]. In *Leishmania*, miltefosine affects the phospholipid metabolism of the cell membrane, modifies the mitochondrial membrane potential, and induces programmed cell death [31], possibly by inhibiting cytochrome C oxidase [32]. Despite being initially considered a drug with high therapeutic activity, cases reported in India and Nepal showed an increased resistance to treatment, suggesting that the efficacy of treatment depends on the species of *Leishmania* involved in the infection [33]. However, in countries where *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) mexicana* are predominant, the cure rate for miltefosine is only 53%, significantly lower than the cure rate for antimonials [34]. Although oral treatment is attractive, miltefosine can also induce significant side effects including gastrointestinal, renal, and liver toxicity, besides teratogenicity in pregnant women [35].

Thus, it is possible to observe that none of the drugs employed in the therapy was developed specifically for leishmaniasis. Additionally, the efficacy of such drugs depends on the clinical form, infecting species, immunity, and health conditions of the patients; furthermore, the presence of resistant strains in nature may aggravate this scenario. Therefore, it is crucial and urgent to characterize new alternative drugs to be introduced in the therapy of leishmaniasis [36].

Quinoline is a heterocyclic molecule displaying a diversity of pharmacological activities such as antibacterial, anti-inflammatory, and antiparasitic properties [37]. The quinoline core allows the synthesis of different structures such as 8-hydroxyquinoline (8-HQ), which was first synthesized in 1953 [38], and so far, different works have shown that this molecule exhibits considerable pharmacological activities such as anticancer, antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, and antiparasitic properties [39]. In leishmaniasis, a recent study demonstrated that 8-HQ as well as other quinoline derivatives were able to eliminate promastigote and amastigote forms of *L. (L.) amazonensis* with high selectivity [40]. Furthermore, 8-HQ was also active on promastigote and amastigote forms of *L. (L.) infantum* and *L. (V.) braziliensis* [41], suggesting that this molecule has multispectral activity on *Leishmania* parasites. In addition, in vivo studies have shown that the subcutaneous injection of 8-HQ in BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis* reduced tissue parasitism [41–43]. Despite such elegant studies, to the best of our knowledge, the activity of 8-HQ has not been explored in other etiological agents of leishmaniasis or even administered as an intralosomal drug. Once the multispectral property of such molecules and the therapeutic activity as an intralosomal drug are proven, data may enlighten the importance of 8-HQ as an alternative antileishmanial agent.

Considering the urgency to characterize new drugs with antileishmanial activity, the present study demonstrated for the first time that 8-HQ is able to eliminate, with

high selectivity, parasites that cause cutaneous leishmaniasis, and once administered by the intralésional route, is effective to decrease the lesion size and parasite load in experimental animals infected with a strain of *L. (L.) amazonensis*, which causes anergic diffuse leishmaniasis in humans. Furthermore, animals treated with 8-HQ upregulated the levels of the IFN- γ cytokine, which may support the elimination of parasites. Thus, this study demonstrates that 8-HQ is an interesting prototype drug to be used in leishmaniasis.

2. Results

2.1. In Vitro Studies

In promastigote forms, it has been observed that at 24 h, *L. (V.) shawi* was the most susceptible to treatment with 8-HQ, displaying an effective concentration 50% (EC₅₀) of $0.2 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ (Table 1), and at 72 h, *L. (V.) lainsoni* was the most affected, with an EC₅₀ of $0.06 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ (Figure 1). Although 8-HQ also eliminated *L. (L.) amazonensis*, it was the most resistant amongst all of the assayed species at 24 and 72 h, showing an EC₅₀s of 2.9 ± 0.3 and $1.1 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$, respectively (Table 1 and Figure 1). At 24 h and 72 h, 8-HQ eliminated promastigote forms of *L. (L.) infantum* with EC₅₀ 2.1 ± 0.2 and $0.34 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$, *L. (V.) guyanensis* with 0.3 ± 0.08 and $0.1 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$, and *L. (V.) naiffi* with 0.8 ± 0.1 and $0.5 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$, respectively, and also *L. (V.) shawi* with an EC₅₀ of 0.2 ± 0.03 and $0.31 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$ (Table 1). Miltefosine, a standard drug, eliminated all parasite species at 24 and 72 h of incubation; promastigote forms of *L. (V.) shawi* were the most sensitive at 24 h of incubation, and *L. (V.) guyanensis* at 72 h, while *L. (V.) naiffi* were the most resistant at 24 h and *L. (L.) amazonensis* at 72 h (Table 1).

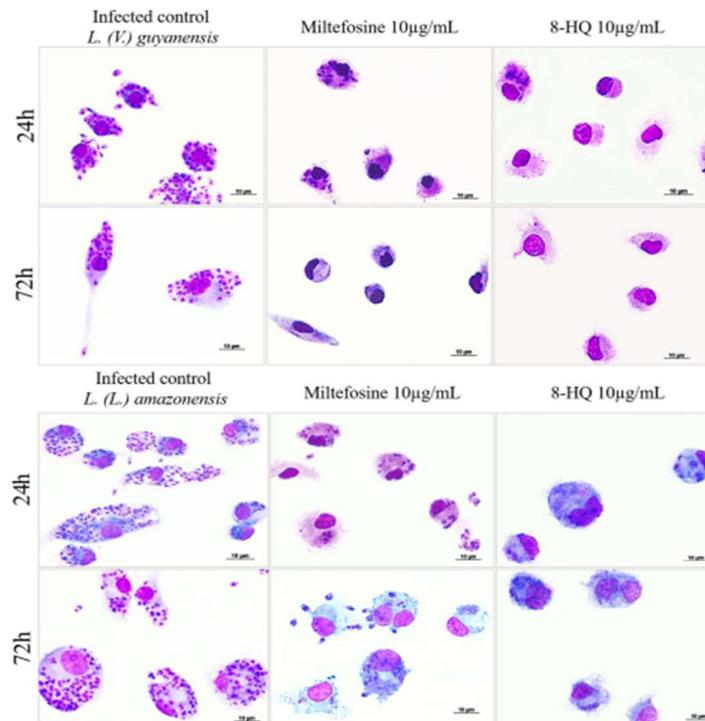


Figure 1. Bone marrow derived macrophages were infected with *L. (V.) guyanensis* or *L. (L.) amazonensis* for 24 h, followed by incubation with different concentrations of 8-HQ (1.25–10 $\mu\text{g/mL}$) or miltefosine (2.5–10 $\mu\text{g/mL}$) at 24 h or 72 h. The figures displayed here illustrate the morphology of macrophages and amastigote within macrophages treated with 10 $\mu\text{g/mL}$ of 8-HQ or miltefosine.

Table 1. Promastigote and amastigote forms of *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, and *L. (V.) shawi* as well as bone-marrow differentiated macrophages were incubated with 8-HQ or miltefosine (a standard drug used in the treatment of leishmaniasis) for 24 or 72 h. Cytotoxic concentration 50 (CC₅₀) on macrophages, effective concentration 50 (EC₅₀) on promastigotes, and intracellular amastigotes were estimated. Selectivity indexes (SI) were calculated using the ratio between CC₅₀ to EC₅₀. Results were expressed as the mean ± standard error of three independent experiments. 8-HQ—8 hydroxyquinoline; Milt—miltefosine.

		EC ₅₀ (µg/mL)				CC ₅₀ (µg/mL)	
		(Selective Index—SI)					
		Promastigote Forms		Amastigote Forms		Macrophages	
		24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
<i>L. (L.) amazonensis</i>	8-HQ	2.9 ± 0.3 SI (12.5)	1.1 ± 0.1 SI (30.5)	1.9 ± 0.1 SI (19.1)	0.9 ± 0.09 SI (37.3)		
	Milt	8.5 ± 0.4 SI (5.0)	16.1 ± 0.1 SI (2.0)	6.5 ± 0.06 SI (6.6)	3.5 ± 0.2 SI (9.3)		
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	8-HQ	2.1 ± 0.2 SI (17.3)	0.34 ± 0.1 SI (98.8)	2.0 ± 0.8 SI (18.1)	0.05 ± 0.001 SI (672)		
	Milt	19.3 ± 1.6 SI (2.2)	7.5 ± 1.5 SI (4.4)	4.1 ± 0.2 SI (10.4)	0.05 ± 0.01 SI (656)		
<i>L. (V.) guyanensis</i>	8-HQ	0.3 ± 0.08 SI (121)	0.1 ± 0.03 SI (336)	0.8 ± 0.1 SI (45.3)	0.03 ± 0.002 SI (1120)		
	Milt	5.0 ± 1.3 SI (8.6)	1.8 ± 0.63 SI (18.2)	4.9 ± 1.4 SI (8.8)	0.8 ± 0.2 SI (41)		
<i>L. (V.) lainsoni</i>	8-HQ	0.6 ± 0.1 SI (60.5)	0.06 ± 0.01 SI (560)	0.1 ± 0.09 SI (363)	0.5 ± 0.01 SI (67.2)		
	Milt	5.3 ± 0.1 SI (8.1)	2.4 ± 0.2 SI (13.7)	0.5 ± 0.03 SI (85.8)	1.8 ± 1.04 SI (18.2)		
<i>L. (V.) naiffi</i>	8-HQ	0.8 ± 0.1 SI (45.4)	0.5 ± 0.08 SI (67.2)	0.45 ± 0.02 SI (80.6)	0.03 ± 0.0002 SI (1120)		
	Milt	23.5 ± 5.7 SI (1.8)	13.7 ± 0.5 SI (2.4)	2.0 ± 0.3 SI (21.4)	0.1 ± 0.08 SI (328)		
<i>L. (V.) shawi</i>	8-HQ	0.2 ± 0.03 SI (181)	0.31 ± 0.08 SI (108.4)	0.1 ± 0.01 SI (363)	0.2 ± 0.001 SI (168)		
	Milt	1.7 ± 0.09 SI (25.2)	2.4 ± 0.69 SI (13.7)	3.9 ± 0.4 SI (11)	1.6 ± 0.5 SI (20.5)		
Host cell	8-HQ					36.3 ± 2.7	33.6 ± 2.2
	Milt					42.9 ± 1.3	32.8 ± 12.0

In macrophages, 8-HQ displayed a cytotoxic concentration 50% (CC₅₀) of 36.3 ± 2.7 and 33.6 ± 2.2 µg/mL at 24 and 72 h of incubation, respectively. At the same time points, miltefosine eliminated macrophages with CC₅₀ of 42.9 ± 1.3 and 32.8 ± 12.0 µg/mL, respectively.

In the amastigote forms, it was observed that at 24 h of incubation with 8-HQ, *L. (V.) lainsoni* and *L. (V.) shawi* were the most sensitive species (EC₅₀ = 0.1 ± 0.09 and 0.1 ± 0.01 µg/mL) while *L. (L.) infantum* amastigote was the most resistant (EC₅₀ = 2.0 ± 0.8 µg/mL); 8-HQ induced an intermediate leishmanicidal activity on *L. (L.) amazonensis* (EC₅₀ = 1.9 ± 0.1 µg/mL), *L. (V.) guyanensis* (EC₅₀ = 0.8 ± 0.1 µg/mL), and *L. (V.) naiffi* (EC₅₀ = 0.45 ± 0.02 µg/mL). At 72 h of incubation, *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) guyanensis* displayed high sensitivity to 8-HQ (EC₅₀ = 0.03 ± 0.0002, and 0.03 ± 0.002 µg/mL, respectively), followed by and *L. (L.) infantum* and *L. (V.) shawi*; comparatively, *L. (L.) amazonensis* amastigote forms were the most resistant species to 8-HQ (Table 1). Intracellular amastigote forms of *L. (V.) lainsoni* treated with miltefosine were the most sensitive parasite and *L. (L.) amazonensis* was the most resistant at 24 h of incubation. At

72 h, intracellular amastigote forms of *L. (L.) infantum* were more sensitive and *L. (L.) amazonensis* was more resistant to miltefosine (Table 1).

Figure 1 illustrates the efficacy of 8-HQ and miltefosine at 10 µg/mL on intracellular amastigote forms of *L. (V.) lainsoni* (the most susceptible species to 8-HQ) and *L. (L.) amazonensis* (the most resistant species to 8-HQ) at 24 and 72 h.

The levels of hydrogen peroxide (H₂O₂) and intracellular nitric oxide (NO) were quantified in infected macrophages treated and non-treated with 8-HQ. In this regard, the levels of H₂O₂ were below the limit of detection, however, significant changes were observed in the intracellular NO.

In macrophages infected with *L. (L.) amazonensis* (Figure 2A), *L. (L.) infantum* (Figure 2B), and treated with 8-HQ, it was observed that at 24 h of incubation, the treatment with 1.25–5 µg/mL reduced the levels of NO compared to the infected control (iMΦ) and control macrophages (MΦ), however, the infected macrophages treated with 10 µg/mL of 8-HQ restored the ability to produce NO in comparison to the controls. At 72 h of treatment, macrophages infected with *L. (L.) amazonensis* and treated with 10 µg/mL of 8-HQ was able to increase the levels of intracellular NO in comparison to the infected macrophages ($p < 0.05$), but in the infection caused by *L. (L.) infantum chagasi*, all concentrations of 8-HQ stimulated the production of NO in comparison to the infected control ($p < 0.05$). Comparatively, the levels of NO produced by macrophages were higher at 24 h than 72 h of incubation with 8-HQ ($p < 0.05$).

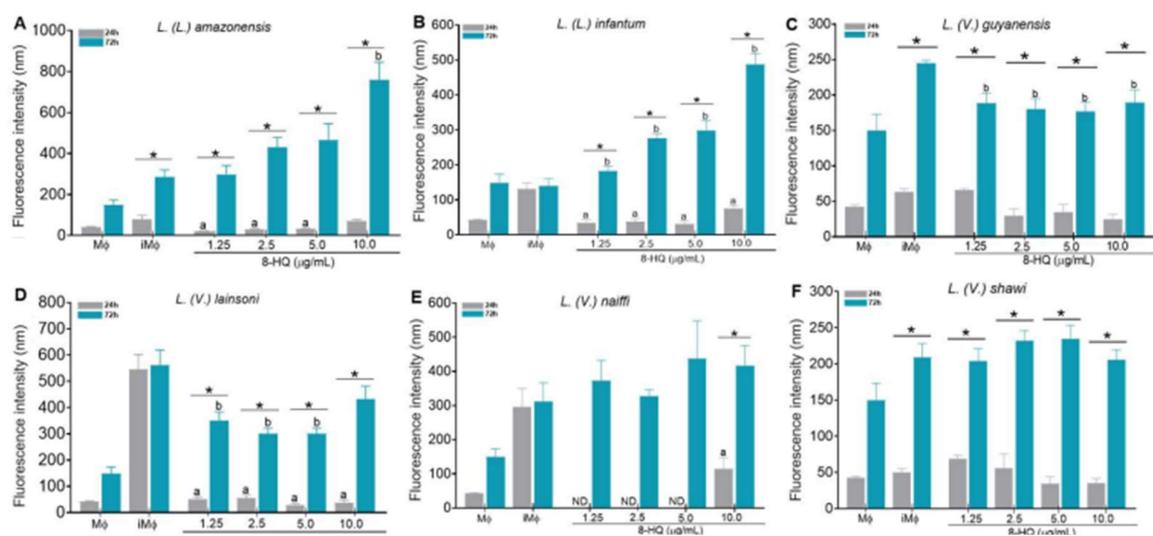


Figure 2. Intracellular nitric oxide production in macrophages (MΦ); infected macrophages (iMΦ); infected and treated macrophages. Macrophages were infected by *L. (L.) amazonensis* (A); *L. (L.) infantum* (B); *L. (V.) guyanensis* (C); *L. (V.) lainsoni* (D); *L. (V.) naiffi* (E); *L. (V.) shawi* (F) treated with different concentrations of 8-HQ during 24 h or 72 h, and the level of NO was analyzed using the probe DAF-FM. * Represents significant differences ($p < 0.05$) between 24 h and 72 h. Significant difference ($p < 0.05$) in relation to iMΦ and the other groups is represented by the letter “a” at 24 h and the letter “b” at 72 h of incubation. All data were expressed through the mean and standard error. LPS was used as a positive control.

In the infection with *L. (V.) guyanensis* (Figure 2C), *L. (V.) lainsoni* (Figure 2D), *L. (V.) naiffi* (Figure 2E), and *L. (V.) shawi* (Figure 2F), a different pattern of NO production was observed. At 24 h of incubation, macrophages infected with *L. (V.) lainsoni* or *L. (V.) naiffi* that were submitted to incubation with all concentrations of 8-HQ showed a significant reduction in NO production compared to the respective infected controls. On the contrary, in infections caused by *L. (V.) guyanensis* or *L. (V.) shawi*, no modifications in NO were observed. At 72 h, macrophages infected with *L. (V.) lainsoni* and treated with 1.25–5 µg/mL exhibited a significant reduction in NO levels in comparison with the infected control, however, when infected cells were treated with 10 µg/mL, a restoration in the NO levels was observed compared to the levels of the iMΦ group. At 72 h, 8-HQ did not change the NO production in infections caused by *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, and *L. (V.) shawi* in comparison with the respective infected controls.

Furthermore, in treated cells, the levels of NO were higher at 72 h than at 24 h of incubation with 8-HQ. Macrophages incubated with LPS produced higher levels of NO during 24 (650 ± 53 fluorescence unities) or 72 h (820 ± 41 fluorescence unities) in comparison to all of the experimental conditions.

The production of NO from the control macrophages (MΦ) were considered the background of the reaction.

2.2. Efficacy of 8-HQ Administered by the Intralesional Route

In the present study, the efficacy of 8-HQ given by the intralesional route was assayed in the experimental cutaneous leishmaniasis caused by a strain of *L. (L.) amazonensis* that causes anergic diffuse cutaneous leishmaniasis in humans. In this case, the treatment of BALB/c was started in the sixth week post infection (PI). Glucantime was used as a standard treatment.

At 7- and 8-weeks PI, a significant decrease in the lesion size of animals treated with 10 and 20 mg/kg of 8-HQ was observed in comparison with the infected group ($p < 0.05$). Animals treated by the intralesional route with 50 mg/kg of glucantime also presented a significant decrease in the cutaneous lesions (Figure 3A). It was not possible to observe significant differences between animals treated with 8-HQ and glucantime because all treatments were able to decrease the cutaneous lesions to similar values ($p > 0.05$).

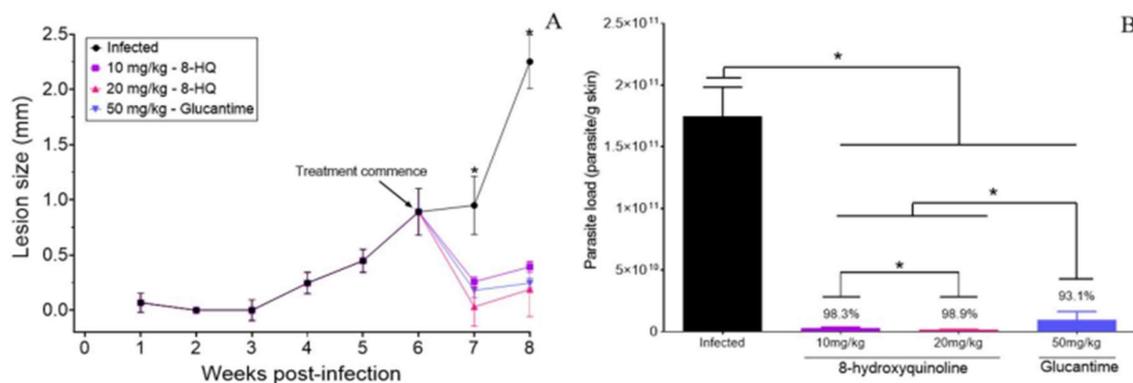


Figure 3. BALB/c mice were infected with 10^6 promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* at the base of the tail; at the sixth week PI, intralesional treatment was started with 8-hydroxyquinoline (10 and 20 mg/kg) or glucantime (50 mg/kg). Animals were treated once a day for 10 days. Lesion development was monitored with a micrometer (A) and at the eighth week PI, parasite loads (B) were determined by the limiting dilution assay technique. * $p < 0.05$ between infected and treated groups at 0.05.

In comparison to the infected group, the skin parasite load decreased by 98.3, 98.9, and 93.1% in animals treated with 8-HQ (10 or 20 mg/kg) and glucantime (50 mg/kg) by the intralesional route, respectively ($p < 0.05$), as observed in Figure 3B. Comparatively, the treatment with 10 and 20 mg/kg of 8-HQ by the intralesional route was more effective at decreasing the number of amastigote forms than 50 mg/kg of glucantime ($p < 0.05$). Furthermore, animals treated with 20 mg/kg exhibited lower parasites than the group treated with 10 mg/kg of 8-HQ ($p < 0.05$), as demonstrated in Figure 3B.

2.3. Histopathological Changes

The infected control group showed an intense and diffuse inflammatory infiltrate spread through the dermis (Figure 4A), characterized by a large number of heavily infected macrophages (Figure 4B, detailed in inset in B), with few polymorphonuclear cells and lymphocytes (Figure 4B). Compared to the control, the animals treated by the intralesional route with 10 or 20 mg/kg of 8-HQ (Figure 4C, E, respectively) presented a mixed inflammatory infiltrate predominantly composed of lymphocytes with few polymorphonuclear cells and a reduced number of infected macrophages, demonstrating the therapeutic potential of this molecule. Furthermore, animals treated with 10 mg/kg of 8-HQ showed focal areas of a moderated inflammatory infiltrate (Figure 4C) with fewer morphologically recognizable amastigote forms than the control (Figure 4D, inset in D). In contrast, animals treated with 20 mg/kg exhibited an inflammatory infiltrate limited to the deep dermis (Figure 4E), with few suggestive amastigote forms (inset in Figure 4F). This histopathological feature suggests regression of the inflammatory process, which correlates with a very low tissue parasitism observed in the histological sections and in limiting dilution assays (Figure 3). Similarly, animals treated with 50 mg/kg of glucantime, administered by the intralesional route, exhibited focal areas of inflammation in the skin, which was characterized by the presence of mononuclear cells such as lymphocytes and macrophages, some of them infected with a low number of amastigote forms (Figure 4H, inset in H).

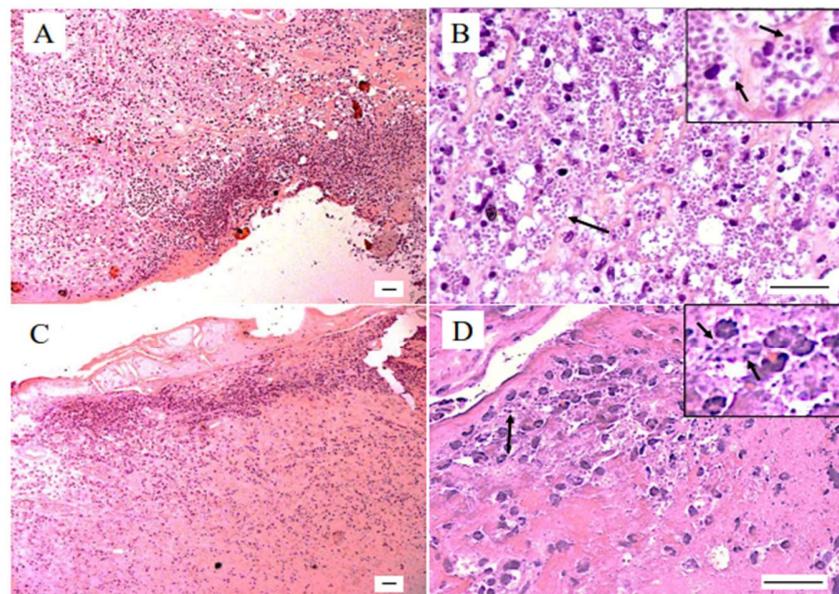


Figure 4. Cont.

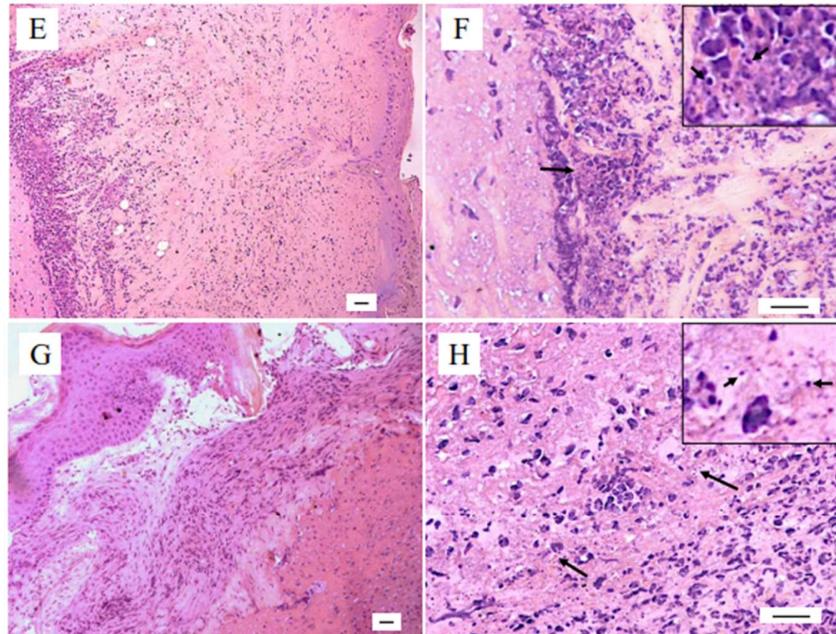


Figure 4. Histological skin sections of BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis*. (A,B) Infected control (C,D) treated by the intralesional route with 10 mg/kg of 8-hydroxyquinoline; (E,F) treated by the intralesional route with 20 mg/kg of 8-hydroxyquinoline; (G,H) treated by the intralesional route with 50 mg/kg of glucantime. (A,C,E,G) show details of the epidermis and dermis of each group while figures (B,D,F,G) show the details mainly on the parasitism, illustrated by the black arrows (bars: 20 μ m).

2.4. Immunological Studies

In the supernatant of mononuclear cells from infected animals, the IFN- γ cytokine was not detected (Figure 5A); in contrast, it was possible to detect high levels of IFN- γ in the supernatant of mononuclear cells from animals treated with 10 or 20 mg/kg of 8-HQ. Although the levels of IFN- γ in the supernatant of the mononuclear cells of animals treated with glucantime were upregulated compared to the infected group, the amount produced represents only a basal level of this cytokine, as observed in the control animals.

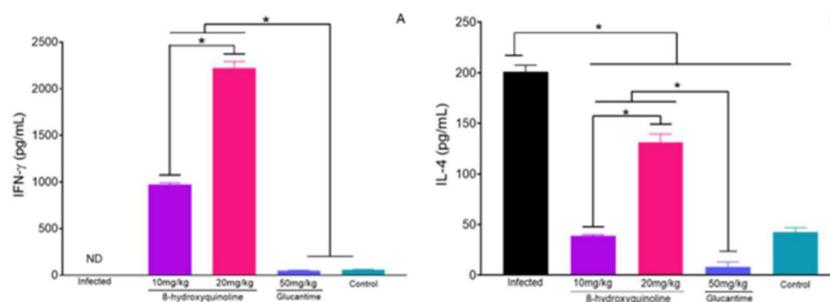


Figure 5. The draining lymph nodes of all of the experimental animals were collected, a single cell suspension was produced, adjusted to 5×10^6 cell/well, and cultured under stimulation with 5μ g of whole antigen of *L. (L.) amazonensis* for 72 h, when the supernatants were collected to quantify the amounts of IFN- γ (A) and IL-4 (B) by ELISA. * $p < 0.05$.

Mononuclear cells from the infected group produced high amounts of IL-4 cytokine (Figure 5B), however, mononuclear cells from animals treated with 8-HQ or glucantime produced reduced levels of this cytokine ($p < 0.05$). Comparatively, higher levels of IL-4 were detected in the supernatant of cells isolated from the lymph nodes of animals treated with 20 mg/kg of 8-HQ than in the cells from animals treated with 10 mg/kg of 8-HQ or glucantime, although it is important to highlight that mononuclear cells from animals treated with 20 mg/kg produced higher IFN- γ than IL-4, suggesting the development of a potent Th1 immune response.

Cells cultured with concanavalin A produced an elevated concentration of IFN- γ (3720 ± 189 pg/mL) and IL-4 (1089 ± 244 pg/mL), while cells cultured only with the medium did not produce detectable levels of such cytokines.

3. Discussion

Current treatments used in leishmaniasis cause severe side effects in patients, and in some areas around the world, the lack of adherence to medical treatment may lead to the emergence of parasites resistant to the main classes of drugs used in leishmaniasis. Thus, the characterization of new compounds and treatment schemes with a leishmanicidal effect on the majority of pathogenic species of *Leishmania* has become urgent. In this sense, 8-HQ is an interesting molecule to develop new and effective drugs for the treatment of neglected tropical diseases because its parasitocidal effect has already been demonstrated in infections caused by *Schistosoma mansoni* [44], *Toxoplasma gondii* [45], and *Leishmania* sp. [42,46–48]. Furthermore, the antileishmanial activity of 8-HQ alone or in combination has already been tested and the results published [49]. In the present manuscript, we expand the current knowledge on the activity of 8-HQ by showing the multispectral activity of this molecule on *Leishmania* sp. and demonstrate its efficacy in in vivo experiments by administering this alternative drug by the intralésional route to animals infected with a strain of *L. (L.) amazonensis* that causes anergic diffuse leishmaniasis in humans.

Experiments performed in vitro carried out with *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, and *L. (V.) shawi* showed that 8-HQ was able to eliminate promastigote and amastigote forms of all analyzed species at 24 and 72 h of incubation. In this regard, it was observed that promastigote and amastigote forms of the *Viannia* subgenus were the most susceptible species to 8-HQ, eliminating both forms of the protozoan with high selectivity. In addition, at 72 h of treatment, the compound was 18.36 and 11.02 times more selective for promastigotes of *L. (V.) lainsoni* and *L. (V.) guyanensis* than *L. (L.) amazonensis*, respectively, and 30 times more selective for amastigotes of *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) guyanensis* than for *L. (L.) amazonensis*, the least susceptible species treated with 8-HQ. Similarly, *L. (V.) shawi* was the third most susceptible to the prototype drug in comparison to the other species evaluated, however, *L. (L.) infantum chagasi* was the second most resistant parasite to 8-HQ.

Although parasites from the subgenus *Leishmania* were less sensible to the action of 8-HQ than the *Viannia* parasites, they were still eliminated with high selectivity, mostly when compared to miltefosine, a standard drug used in leishmaniasis therapy. Previous studies carried out with promastigote forms demonstrated that at 48 h of incubation, 8-HQ eliminated *L. (L.) amazonensis* with an EC_{50} of 0.05 $\mu\text{g/mL}$ (SI 328), and *L. (L.) infantum* with an EC_{50} of 0.26 $\mu\text{g/mL}$ (SI 62) [41]. Similarly, *L. (V.) braziliensis* promastigotes were eliminated by the action of 8-HQ with an EC_{50} of 0.35 $\mu\text{g/mL}$ (SI ~47). Furthermore, 8-HQ reduced intracellular amastigote forms of *L. (V.) braziliensis* with higher efficacy in comparison to amphotericin B [41]. Thus, the data presented herein corroborate the solid efficacy and selectivity of 8-HQ to eliminate *Leishmania* sp., and reinforce the inherent potential of such molecules to produce new and effective drugs to combat this infection. Furthermore, the SI, defined as the ratio between the cytotoxic concentration (CC_{50}) and effective concentration 50% (EC_{50}), estimated herein and in previous studies, indicated that 8-HQ has high leishmanicidal effect while inducing low cytotoxicity in macrophages. In the present study, at 24 h, the SI for 8-HQ in the in vitro infections ranged from 12.5 to 363;

and at 72 h from 30.5 to 1120, while miltefosine at 24 h ranged from 1.8 to 85.8 and at 72 h from 2 to 656. These findings show the superior activity of 8-HQ over miltefosine.

Considering the high selectivity of 8-HQ toward *Leishmania* sp., it was investigated whether such activity is dependent on hydrogen peroxide and/or nitric oxide production. Some natural products increase the respiratory activity of host cells during phagocytosis and infectious processes, leading to the production of reactive oxygen and/or nitrogen species [50], which trigger a large spectrum of biological activities such as the elimination of intracellular pathogens [51]. In this regard, it was observed that 8-HQ did not stimulate the production of hydrogen peroxide in infected macrophages, but a curious behavior was observed with respect to NO production. In general, at 24 h of incubation with 8-HQ, a reduction or no changes in the NO levels in macrophages infected with *Leishmania* sp. was detected in comparison to the respective controls. It is possible that 8-HQ destroyed significant numbers of intracellular parasites, and the low number of amastigote forms was not enough to elicit NO production in such host cells, as observed in Figure 1. On the other hand, infected macrophages treated with 10 µg/mL of 8-HQ, which presented a very low number of amastigote forms, tended to normalize the levels of NO, suggesting that the high concentration of 8-HQ may present some modulatory activity at 24 h of incubation. In particular, such modulatory activity was potentialized at 72 h in infections caused by *Leishmania* subgenus. As observed in Table 1 and Figure 1, the species *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) infantum chagasi* were less susceptible to 8-HQ, which suggests that more intracellular parasites were viable than in infections caused by the *Viannia* subgenus, and as a consequence, macrophages already activated by 8-HQ produced more NO than the infected controls, which indeed suffered a massive intracellular infection.

In contrast, at 72 h of treatment, it was observed that infected macrophages with *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) lainsoni* treated with 8-HQ decreased the levels of NO, but no changes in NO levels were observed in macrophages infected with *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) shawi*. Despite these events, all macrophages displayed a very low number of intracellular amastigotes, suggesting that the pro-inflammatory activity of such cells tends to be normalized. However, compared to the non-infected macrophages, such levels of NO should still be considered high, but it is possible that such effect might be related to the immunomodulatory activity induced by 8-HQ.

Previous studies have shown that *L. (L.) infantum*- and *L. (L.) amazonensis*-infected macrophages incubated with 8-HQ did not produce NO at 48 h of incubation [41,52]. The absence of intracellular NO in such studies should indicate that the production of NO is a late process in the treatment with 8-HQ, furthermore, it also suggests that immunomodulatory activity may play a secondary role in leishmanicidal mechanisms. However, BALB/c mice peritoneal macrophages infected with *L. (L.) amazonensis* and treated with an imidazoquinoline-based TLR7/8 agonist, a quinoline derivative, were able to eliminate amastigote forms of *L. (L.) amazonensis* associated with the production of NO and H₂O₂ after 72 h of incubation [53], suggesting that structurally-related molecules may share similar biological properties, and that NO stimulation is possibly a late process, as observed herein.

Considering that 8-HQ exhibited multispecies action that was more active and selective than miltefosine and was still able to modulate the microbicidal potential of macrophages, the therapeutic property of this molecule was assayed in the experimental model of cutaneous leishmaniasis caused by *L. (L.) amazonensis*. In this regard, BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis* were treated with 10 mg/kg and 20 mg/kg of 8-HQ by the intralesional route; in addition, 50 mg/kg glucantime given via the intralesional route was used as the conventional drug used in human treatment. Both treatments were efficient at reducing the lesion size and tissue parasitism. However, the number of parasites in the skin was lower in animals treated with 10 and 20 mg/kg of 8-HQ in comparison with animals treated with the conventional treatment, suggesting that 8-HQ is an interesting prototype drug to be used in the treatment of leishmaniasis. In addition, 20 mg/kg of 8-HQ was more active at decreasing the parasite load in the skin than 10 mg/kg. Previous studies showed that

BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis* and treated with 8-HQ (10 mg/kg/day) was more active to eliminate tissue parasites than amphotericin B (5 mg/kg/day) [41,48].

In addition to the low parasitism observed in infected animals treated with 8-HQ, histopathology studies in the skin showed that this drug decreased the inflammatory infiltrate to focal areas that were characterized by a low number of macrophages with suggestive bodies, resembling amastigote forms. The histological pattern observed in the animals treated mainly with 20 mg/kg of 8-HQ suggests that the skin of the animals is in a healing process, in fact, the limiting-dilution assay allows us to conclude that very few parasites persisted in the skin, which may account for this. Although animals treated with glucantime exhibited a significant decrease in lesion size and low parasitism, in the histopathology analysis, amastigote forms could be easily recognized, which, in turn, had a correlation with a significant inflammatory response, composed of macrophages with a low number of amastigote forms. Corroborating our results, a previous study showed that synthetic quinoline alkaloids were active in hamsters infected with *L. (V.) panamensis* and in histopathological studies, it was observed that there was a significant reduction in the inflammatory infiltrate in comparison with the non-treated animals [54], suggesting that the high leishmanicidal activity induced by quinolines leads to a reduction in the inflammatory infiltrate.

In addition to a direct effect of 8-HQ on promastigote and amastigote forms, it was also observed that macrophages incubated with 8-HQ for 72 h exhibited an elevated production of NO in comparison with the controls. To analyze if this immunomodulatory property was kept in vivo, the production of the IFN- γ and IL-4 cytokines were quantified in the supernatant of mononuclear cells isolated from the lymph nodes of animals infected and treated with 8-HQ. These cytokines were strategically quantified in the murine model of leishmaniasis because the IL-4 cytokine induces the polarization of the immune response to a Th2 immune pole, in which macrophages become permissive to parasite multiplication. On the other hand, the IFN- γ cytokine induces the polarization of the immune response to a Th1 immune pole, causing the activation of infected macrophages to a leishmanicidal state by the action of NO [55,56]. In the present study, it was observed that mononuclear cells from animals treated with 10 and 20 mg/kg of 8-HQ produced high levels of IFN- γ in comparison to the infected animals, and it seems that the production of this cytokine was proportional to the concentration of the administered dose of 8-HQ. On the other hand, animals treated with glucantime produced only basal levels of IFN- γ .

In contrast to IFN- γ , it was seen that animals treated with 8-HQ exhibited a reduction in IL-4 levels compared to the infected control; despite a low concentration of IL-4 in the treatment, it is also important to observe that treatment with 20 mg/kg of 8-HQ increased the IL-4 levels, but even so, this group still produced higher amounts of IFN- γ than IL-4. Previous studies conducted with quinoline derivatives entrapped in micelle systems pointed to a high therapeutic activity associated with the development of a Th-1 immune response [47,57], which clearly potentialized the leishmanicidal activity of the treatment. These data reinforce that 8-HQ as well as other structurally related molecules can be used as an alternative molecule to treat cutaneous leishmaniasis.

4. Materials and Methods

4.1. Culture Media and Drugs

Schneider medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 10 μ g/mL of gentamicin, and 1000 U/mL of penicillin (S10). RPMI 1640 medium (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% 100 \times pyruvate, 1% of MEM solution of non-essential amino acids, 10 μ g/mL of gentamicin, 1000 U/mL penicillin, and 0.1% of 2-mercaptoethanol (R10). Miltefosine and 8-hydroxyquinoline (purity >99%) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Glucantime was obtained from Sanofi-Aventis (São Paulo, Brazil).

4.2. Animals

Six- to eight-week-old male BALB/c mice were obtained from the animal facility center of the Medical School of São Paulo University. This study was performed in accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Institutional Animal Care and Use Committee at the Medical School of São Paulo University (CEUA1648/2022). For all experimental procedures, the animals were anaesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg).

4.3. Parasite Strains

The parasites *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269), *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/HND/2017/AMA-65), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1775/M4147), *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/1981/M6426), *L. (V.) naiffi* (MHOM/BR/1981/M6426), and *L. (V.) shawi* (MCEB/BR1984/M8408) were identified using monoclonal antibodies and isoenzyme electrophoretic profiles at the Leishmaniasis Laboratory of the Evandro Chagas Institute (Belém, Pará State, Brazil). Parasite species were grown in S10 medium at 25 °C. In all experiments, parasites were in a stationary phase of growth, and they were in the first passage of culture to perform in vivo experiments.

4.4. Promastigote Assay

Promastigote forms of *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, and *L. (V.) shawi* in the stationary phase of growth were collected from the medium by centrifugation (1200 × *g*, 10 min, 4 °C), and the parasite concentration was adjusted to 2 × 10⁶ parasite/well in a 96-well culture plate at 25 °C in S10 medium. Parasites were incubated with different concentrations of 8-HQ or miltefosine (0.08 to 100 µg/mL). Control parasites were incubated only with S10. At 24 and 72 h of incubation, the parasites were centrifuged at 1200 × *g*, 10 min, 4 °C, and the supernatants were discarded. Parasites were washed three times with 200 µL of PBS and the viability was analyzed using PrestoBlue reagent (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). After being added to the cells, PrestoBlue (resazurin-based reagent) passively accesses the intracellular environment of *Leishmania* parasites and is converted in the intracellular environment by the redox machinery of viable cells into resorufin, a highly fluorescent compound. Therefore, the intensity of intracellular fluorescence is correlated with the number of viable parasites. After 30 min of incubation, plates were read in an ELISA reader at 416 nm excitation and 574 nm emission. For each parasite species, the drug concentration that eliminated 50% of parasites—effective concentration 50% (EC₅₀)—was estimated using simple correlation analysis in GraphPad Prism 5.0 software [58].

4.5. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMMs)

Bone marrow was flushed from the femurs and tibias of 7-week-old BALB/c mice using Hanks' balanced salt solution (HBSS). After 2 wash steps at 2000 RPM, 5 min, 4 °C, red blood cells were lysed at 4 °C with 0.17 M NH₄Cl, pH 7.4, for 5 min. The reaction was stopped by the addition of HBSS. Cells were centrifuged at 2000 RPM, 5 min, 4 °C, the supernatant was discharged, and cells were plated in a tissue culture-treated Petri dish with RPMI 1640 supplemented with 15% (vol/vol) of L929 cell-conditioned medium (LCM) as a source of colony-stimulating factor-1 (CSF-1) in a 37 °C incubator with 5% CO₂. Twenty-four hours later, non-adherent cells were collected and cultured in sterile Petri dishes with R10 plus 15% of LCM for a week; at days 2, 3, 5, and 7, 15% of LCM was added to the culture. On day 8, adherent cells were collected with a cell scraper, counted, and plated in sterile 96-well plates or in round cover slips in 24-well plates.

4.5.1. Cytotoxicity Assay

The BMMs were adjusted to 10^6 macrophages/well in a 96-well plate; 24 h later, serial dilutions of 8-HQ or miltefosine (0.08 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added to the cells that were cultivated in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO_2 . Cell cytotoxicity was analyzed at 24 and 72 h later. Control cells were incubated with R10 only. At each time point, cells were centrifuged at $1200 \times g$, 10 min, 4 °C, and the supernatants were discarded. Macrophages were washed three times with 200 μL of PBS. Then, the cell viability was assessed using PrestoBlue according to Section 4.4. In summary, resazurin passively accesses the intracellular environment of macrophages; if they are viable, resazurin will be converted intracellularly into resorufin, a highly fluorescent compound. Thus, the intensity of intracellular fluorescence is correlated with the number of viable cells. Drug concentration that eliminated 50% of cell population—cytotoxic concentration 50% (CC_{50})—was estimated using simple correlation analysis in GraphPad Prism 5.0 software. The selectivity index (SI) of 8-HQ was estimated by the ratio between CC_{50} and EC_{50} [59].

4.5.2. Intracellular Infection and Treatment (In Vitro)

BMMs were cultured in round coverslips (10^5 macrophage/coverslip) in 24-well plates for 24 h, followed by infection with *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, and *L. (V.) shawi* promastigote forms at a ratio of 10 parasites per 1 macrophage in a humidified incubator with 5% CO_2 at 35 °C. Twenty-four hours later, each well was washed three times with warm PBS to withdraw the free parasites. Then, 8-HQ or miltefosine (1.25–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to the infected cells during 24 and 72 h. Infected controls were cultured only with R10. After the incubation periods, wells were washed three times with warm PBS, coverslips were dried at room temperature, fixed with methanol, and stained by Giemsa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). At least 100 cells/coverslip were quantified and the infection indices were estimated according to the expression:

$$\text{II} = \% \text{ Infected macrophages} \times \text{Internalized amastigotes/Infected Macrophages}$$

4.6. Determination of Intracellular Nitric Oxide Production

BMMs were plated in a 96-well black plate in R10 and placed in a humidified incubator with 5% CO_2 , 35 °C for 24 h. After this period, macrophages were infected with *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) shawi* promastigote forms at a ratio of 10 parasites per 1 macrophage for 24 h. Twenty-four hours later, the wells were washed three times with warm PBS to remove free parasites and cells were incubated with 1.25 to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of 8-HQ; controls were incubated with R10 only. Positive controls were incubated with 100 ng/mL of LPS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) during 24 and 72 h. At these time points, cells were washed three times with 200 μL of warm PBS, followed by incubation with 5 mM of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM), which is a probe able to detect intracellular nitric oxide (NO). It reacts with NO and forms a highly fluorescent molecule, benzotriazole, which is detected by fluorescence readers. Cells were incubated for 60 min with DAF-FM, followed by three washes with warm PBS. Plates were read with 515 nm emission and 495 nm excitation. Blank controls, built with PBS, R10, and R10 plus drugs or LPS did not interfere with the fluorescence spectra of the reaction.

4.7. Infection and Treatment

Twenty male BALB/c mice were subcutaneously infected in the base of the tail with 10^6 promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* in the stationary phase of growth. Five animals received only sodium chloride 0.9% (*w/v*) under the same route (healthy group). Four weeks after infection, *L. (L.) amazonensis*-infected BALB/c mice were divided into five groups: group 1 (G1) and group 2 (G2) were constituted by infected animals injected by the intralesional route with 10 or 20 mg/kg of 8-HQ, respectively; group 3 (G3) was injected

with 100 mg/kg of glucantime by the intralesional route; group 4 (G4) was the infected control, injected with the vehicle solution by the intralesional route; group 5 (G5) was constituted by non-infected, non-treated animals. The treatment was started in the sixth week post-infection, and the animals were treated for 10 consecutive days, once daily. The physical conditions of the animals were monitored once a week. One week after the last dose, the animals were euthanized with thiopental. Skin fragments were collected, fixed in formalin, and stained with hematoxylin and eosin to analyze the histological changes. There was no dead prior to the endpoint.

Of note, the species *L. (L.) amazonensis* was selected to analyze the efficacy of 8-HQ in vivo because it was the most resistant to the action of 8-HQ and importantly, this parasite reproduces a debilitating and progressive disease in BALB/c mice, that in fact mimics the most severe clinical forms of cutaneous leishmaniasis in humans. Therefore, this model is significant for experiments involving chemotherapy.

Clinical Course of Lesion Development and Determination of Parasite Burden in the Skin of Infected and Treated Animals

The clinical course of lesion development was evaluated once a week by recording the average diameter of the skin lesions using a caliper.

The parasite load in the skin was determined using the quantitative limiting dilution assay as previously described [60]. Briefly, a skin fragment from the base of the tail was aseptically excised, weighted, and homogenized in S10. The skin suspensions were diluted 1000 times and subjected to 12 serial dilutions (1:4) with four replicate wells. The number of viable parasites was determined based on the highest dilution that the promastigotes could be grown after 10 days of incubation at 25 °C in S10.

4.8. Quantification of Cytokines

The subiliac and popliteal lymph nodes from different groups were aseptically collected, macerated in the R10 medium, and the number of cells was estimated under Trypan blue exclusion dye. Mononuclear cells were adjusted at 5×10^5 cells/well and stimulated with 5.0 µg of whole antigen of *L. (L.) amazonensis* or 1.0 µg of concanavalin A (positive control) for 72 h; negative controls were cultivated only with the R10 medium. Cells were cultured in a humidified incubator, 37 °C, 5% CO₂. Following this experimental time, the supernatants were collected, and the amounts of IL-4 and IFN-γ (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) in the supernatant of the cells were quantified by the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in accordance with the manufacturer's recommendations.

4.9. Statistical Analysis

Values were expressed as the mean ± standard error. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software, and the ANOVA test was used to analyze the differences between groups. Statistical significance was set at a $p < 0.05$.

5. Conclusions

In conclusion, the results presented herein reinforce that 8-HQ exhibits significant antileishmanial activity in vitro and high selectivity for all of the species studied. It is important to emphasize that the *Leishmania (Viannia)* species were more susceptible to the compound. Although species belonging to the subgenus *Leishmania* were relatively more resistant, they were successfully eliminated by the action of 8-HQ, and this effect was probably potentialized by the production of intracellular NO. Furthermore, the in vitro data reinforce that 8-HQ is more selective than miltefosine, an approved drug for leishmaniasis treatment. Finally, the in vivo data confirm that 8-HQ inhibited the progression of cutaneous disease in BALB/c and polarized the immune response toward a Th1 immune pole that was also associated with a reduction in the inflammatory reaction in the dermis of infected animals. Thus, the data presented herein suggest that 8-HQ is an interesting drug with high potential to be employed in the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Author Contributions: Conceptualization, S.K.S.d.L. and L.F.D.P.; Methodology, S.K.S.d.L., J.A.J., L.F.D.P., M.D.L. and C.R.; Software, S.K.S.d.L. and L.F.D.P.; Validation, S.K.S.d.L., L.F.D.P., M.D.L. and C.R.; Formal analysis, S.K.S.d.L., L.F.D.P., M.D.L. and C.R.; Investigation, S.K.S.d.L., L.F.D.P., M.D.L. and C.R.; Resources, S.K.S.d.L., L.F.D.P., M.D.L. and C.R.; Data curation, L.F.D.P.; Writing—original draft preparation, S.K.S.d.L., J.A.J., L.F.D.P., M.D.L. and C.R.; Writing—review and editing, S.K.S.d.L., L.F.D.P., M.D.L. and C.R.; Visualization, S.K.S.d.L., J.A.J. and L.F.D.P.; Supervision, L.F.D.P.; Project administration, L.F.D.P.; Funding acquisition, L.F.D.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), grant number 2018/24077-6, and HCFMUSP-LIM50. We also thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the grant awarded to L.F.D.P. and M.D.L.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of the Institutional Committee of Animal Care and Use at the Medical School of São Paulo University (protocol code 1648/2022, approved: 16 March 2022).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Gurel, M.S.; Tekin, B.; Uzun, S. Cutaneous Leishmaniasis: A Great Imitator. *Clin. Dermatol.* **2020**, *38*, 140–151. [\[CrossRef\]](#)
- Saha, B.; Bhattacharjee, S.; Sarkar, A.; Bhor, R.; Pai, K.; Bodhale, N. Conundrums in Leishmaniasis. *Cytokine* **2021**, *145*, 155304. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Saha, B.; Bhattacharjee, S.; Sarkar, A.; Bhor, R.; Pai, K.; Bodhale, N.; Serafim, T.D.; Coutinho-Abreu, I.V.; Dey, R.; Kissinger, R.; et al. Leishmaniasis: The Act of Transmission. *Cytokine* **2021**, *37*, 976–987. [\[CrossRef\]](#)
- Kaushal, R.S.; Naik, N.; Prajapati, M.; Rane, S.; Raulji, H.; Ngo, F.A.; Upadhyay, T.K.; Saeed, M. Leishmania Species: A Narrative Review on Surface Proteins with Structural Aspects Involved in Host-pathogen Interaction. *Chem. Biol. Drug Des.* **2023**, *1*, 1–25. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Reithinger, R.; Dujardin, J.C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, S. Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* **2007**, *7*, 581–596. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Real, F.; Florentino, P.T.V.; Reis, L.C.; Ramos-Sanchez, E.M.; Veras, P.S.T.; Goto, H.; Mortara, R.A. Cell-to-Cell Transfer of Leishmania Amazonensis Amastigotes Is Mediated by Immunomodulatory LAMP-Rich Parasitophorous Extrusions. *Cell. Microbiol.* **2014**, *16*, 1549–1564. [\[CrossRef\]](#)
- Burza, S.; Croft, S.L.; Boelaert, M. Leishmaniasis. *Lancet* **2018**, *392*, 951–970. [\[CrossRef\]](#)
- Ghatee, M.A.; Taylor, W.R.; Karamian, M. The Geographical Distribution of Cutaneous Leishmaniasis Causative Agents in Iran and Its Neighboring Countries, A Review. *Front. Public Health* **2020**, *8*, 11. [\[CrossRef\]](#)
- Silveira, F.T.; Lainson, R.; De Castro Gomes, C.M.; Laurenti, M.D.; Corbett, C.E.P. Immunopathogenic Competences of Leishmania (V.) braziliensis and L. (L.) amazonensis in American Cutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **2009**, *31*, 423–431. [\[CrossRef\]](#)
- Laurenti, M.D.; Sosa-Ochoa, W.; Araujo Flores, G.V.; Sandoval Pacheco, C.M.; Tomokane, T.Y.; Oliveira, L.M.d.S.; Zúñiga, C.; Silveira, F.T.; Corbett, C.E.P. Evaluation of Systemic Immunity in Atypical Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania (L.) Infantum Chagasi. *Parasite Immunol.* **2022**, *44*, 1–2. [\[CrossRef\]](#)
- Campos, M.B.; De Castro Gomes, C.M.; De Souza, A.A.A.; Lainson, R.; Corbett, C.E.P.; Silveira, F.T. In Vitro Infectivity of Species of Leishmania (Viannia) Responsible for American Cutaneous Leishmaniasis. *Parasitol. Res.* **2008**, *103*, 771–776. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Silveira, F.T. What Makes Mucosal and Anergic Diffuse Cutaneous Leishmaniasis so Clinically and Immunopathologically Different? A Review in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *113*, 505–516. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ghorbani, M.; Farhoudi, R. Leishmaniasis in Humans: Drug or Vaccine Therapy? *Drug Des. Devel. Ther.* **2018**, *12*, 25–40. [\[CrossRef\]](#)
- Taslimi, Y.; Zahedifard, F.; Rafati, S. Leishmaniasis and Various Immunotherapeutic Approaches. *Parasitology* **2018**, *145*, 497–507. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Frézard, F.; Demicheli, C.; Ribeiro, R.R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules* **2009**, *14*, 2317–2336. [\[CrossRef\]](#)
- Baiocco, P.; Colotti, G.; Franceschini, S.; Ilari, A. Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2603–2612. [\[CrossRef\]](#)
- Ilari, A.; Genovese, I.; Fiorillo, F.; Battista, T.; De Ionna, I.; Fiorillo, A.; Colotti, G. Toward a Drug Against All Kinetoplastids: From LeishBox to Specific and Potent Trypanothione Reductase Inhibitors. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 3069–3078. [\[CrossRef\]](#)

18. Battista, T.; Colotti, G.; Ilari, A.; Fiorillo, A. Targeting Trypanothione Reductase, a Key Enzyme in the Redox Trypanosomatid Metabolism, to Develop New Drugs against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Molecules* **2020**, *25*, 8. [[CrossRef](#)]
19. Basu, J.M.; Mookerjee, A.; Sen, P.; Bhaumik, S.; Sen, P.; Banerjee, S.; Naskar, K.; Choudhuri, S.K.; Saha, B.; Raha, S.; et al. Sodium Antimony Gluconate Induces Generation of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide via Phosphoinositide 3-Kinase and Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Leishmania Donovanii-Infected Macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1788–1797. [[CrossRef](#)]
20. Garza-Tovar, T.F.; Sacriste-Hernández, M.I.; Juárez-Durán, E.R.; Arenas, R. An Overview of the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Fac. Rev.* **2020**, *9*, 28. [[CrossRef](#)]
21. Sundar, S.; Chakravarty, J. Antimony Toxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2010**, *7*, 4267–4277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Oliveira, L.F.; Schubach, A.O.; Martins, M.M.; Passos, S.L.; Oliveira, R.V.; Marzochi, M.C.; Andrade, C.A. Systematic Review of the Adverse Effects of Cutaneous Leishmaniasis Treatment in the New World. *Acta Trop.* **2011**, *118*, 87–96. [[CrossRef](#)]
23. Chakravarty, J.; Sundar, S. Current and Emerging Medications for the Treatment of Leishmaniasis. *Expert Opin. Pharmacother.* **2019**, *20*, 1251–1265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Van Griensven, J.; Diro, E. Visceral Leishmaniasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2012**, *26*, 309–322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. De Melo, E.C.; Fortaleza, C.M.C.B. Challenges in the Therapy of Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Public Health Perspective. *J. Trop. Med.* **2013**, *2013*. [[CrossRef](#)]
26. Ponte-Sucre, A.; Gamarro, F.; Dujardin, J.C.; Barrett, M.P.; López-Vélez, R.; García-Hernández, R.; Pountain, A.W.; Mwenechanya, R.; Papadopoulou, B. Drug Resistance and Treatment Failure in Leishmaniasis: A 21st Century Challenge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, 12. [[CrossRef](#)]
27. Hamill, R.J. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs* **2013**, *73*, 919–934. [[CrossRef](#)]
28. Mosimann, V.; Neumayr, A.; Paris, D.H.; Blum, J. Liposomal Amphotericin B Treatment of Old World Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis: A Literature Review. *Acta Trop.* **2018**, *182*, 246–250. [[CrossRef](#)]
29. van Griensven, J.; Diro, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2019**, *33*, 79–99. [[CrossRef](#)]
30. Dorlo, T.P.C.; Balasegaram, M.; Beijnen, J.H.; de vries, P.J. Miltefosine: A Review of Its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2576–2597. [[CrossRef](#)]
31. Palić, S.; Beijnen, J.H.; Dorlo, T.P.C. An Update on the Clinical Pharmacology of Miltefosine in the Treatment of Leishmaniasis. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2022**, *59*, 106459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Sundar, S.; Singh, B. Emerging Therapeutic Targets for Treatment of Leishmaniasis. *Expert Opin. Ther. Targets* **2018**, *22*, 467–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Srivastava, S.; Mishra, J.; Gupta, A.K.; Singh, A.; Shankar, P.; Singh, S. Laboratory Confirmed Miltefosine Resistant Cases of Visceral Leishmaniasis from India. *Parasites Vectors* **2017**, *10*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Goto, H. Review of the Current Treatments for Leishmaniasis. *Res. Rep. Trop. Med.* **2012**, *3*, 69. [[CrossRef](#)]
35. Pradhan, S.; Schwartz, R.A.; Patil, A.; Grabbe, S.; Goldust, M. Treatment Options for Leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* **2022**, *47*, 516–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Passero, L.F.D.; Brunelli, E.d.S.; Sauini, T.; Amorim Pavani, T.F.; Jesus, J.A.; Rodrigues, E. The Potential of Traditional Knowledge to Develop Effective Medicines for the Treatment of Leishmaniasis. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 690432. [[CrossRef](#)]
37. Gupta, O.; Pradhan, T.; Bhatia, R.; Monga, V. Recent Advancements in Anti-Leishmanial Research: Synthetic Strategies and Structural Activity Relationships. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *223*, 113606. [[CrossRef](#)]
38. Pippi, B.; Joaquim, A.R.; Lopes, W.; Machado, G.R.M.; Bergamo, V.Z.; Giuliani, L.M.; Abegg, M.A.; Cruz, L.; Vainstein, M.H.; Fuentesfria, A.M.; et al. 8-Hydroxyquinoline-5-Sulfonamides Are Promising Antifungal Candidates for the Topical Treatment of Dermatophytosis. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *128*, 1038–1049. [[CrossRef](#)]
39. Gupta, R.; Luxami, V.; Paul, K. Insights of 8-Hydroxyquinolines: A Novel Target in Medicinal Chemistry. *Bioorg. Chem.* **2021**, *108*, 104633. [[CrossRef](#)]
40. Silva, E.J.; Bezerra-Souza, A.; Passero, L.F.; Laurenti, M.D.; Ferreira, G.M.; Fujii, D.G.V.; Trossini, G.H.G.; Raminelli, C. Synthesis, Leishmanicidal Activity, Structural Descriptors and Structure-Activity Relationship of Quinoline Derivatives. *Future Med. Chem.* **2018**, *10*, 2069–2085. [[CrossRef](#)]
41. Costa Duarte, M.; dos Reis Lage, L.M.; Lage, D.P.; Mesquita, J.T.; Salles, B.C.S.; Lavorato, S.N.; Menezes-Souza, D.; Roatt, B.M.; Alves, R.J.; Tavares, C.A.P.; et al. An Effective in Vitro and in Vivo Antileishmanial Activity and Mechanism of Action of 8-Hydroxyquinoline against Leishmania Species Causing Visceral and Tegumentary Leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* **2016**, *217*, 81–88. [[CrossRef](#)]
42. Tavares, G.S.V.; Mendonça, D.V.C.; Miyazaki, C.K.; Lage, D.P.; Soyer, T.G.; Carvalho, L.M.; Ottoni, F.M.; Dias, D.S.; Ribeiro, P.A.F.; Antinarelli, L.M.R.; et al. A Pluronic®F127-Based Polymeric Micelle System Containing an Antileishmanial Molecule Is Immunotherapeutic and Effective in the Treatment against Leishmania Amazonensis Infection. *Parasitol. Int.* **2019**, *68*, 63–72. [[CrossRef](#)]
43. Tavares, G.d.S.V.; Mendonça, D.V.C.; Lage, D.P.; Granato, J.d.T.; Ottoni, F.M.; Ludolf, F.; Chávez-Fumagalli, M.A.; Duarte, M.C.; Tavares, C.A.P.; Alves, R.J.; et al. Antileishmanial Activity, Cytotoxicity and Mechanism of Action of Clioquinol Against Leishmania Infantum and Leishmania Amazonensis Species. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2018**, *123*, 236–246. [[CrossRef](#)]

44. Allam, G.; Eweas, A.F.; Abuelsaad, A.S.A. In Vivo Schistosomicidal Activity of Three Novels 8-Hydroxyquinoline Derivatives against Adult and Immature Worms of *Schistosoma Mansoni*. *Parasitol. Res.* **2013**, *112*, 3137–3149. [[CrossRef](#)]
45. Kadri, D.; Crater, A.K.; Lee, H.; Solomon, V.R.; Ananvoranich, S. The Potential of Quinoline Derivatives for the Treatment of *Toxoplasma Gondii* Infection. *Exp. Parasitol.* **2014**, *145*, 135–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Duarte, M.C.; Lage, L.M.d.R.; Lage, D.P.; Martins, V.T.; Carvalho, A.M.R.S.; Roatt, B.M.; Menezes-Souza, D.; Tavares, C.A.P.; Alves, R.J.; Barichello, J.M.; et al. Treatment of Murine Visceral Leishmaniasis Using an 8-Hydroxyquinoline-Containing Polymeric Micelle System. *Parasitol. Int.* **2016**, *65*, 728–736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Tavares, G.S.V.; Mendonça, D.V.C.; Pereira, I.A.G.; Oliveira-da-Silva, J.A.; Ramos, F.F.; Lage, D.P.; Machado, A.S.; Carvalho, L.M.; Reis, T.A.R.; Perin, L.; et al. A Clioquinol-Containing Pluronic®F127 Polymeric Micelle System Is Effective in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in a Murine Model. *Parasite* **2020**, *27*, 63–72. [[CrossRef](#)]
48. Lage, L.M.d.R.; Barichello, J.M.; Lage, D.P.; Mendonça, D.V.C.; Carvalho, A.M.R.S.; Rodrigues, M.R.; Menezes-Souza, D.; Roatt, B.M.; Alves, R.J.; Tavares, C.A.P.; et al. An 8-Hydroxyquinoline-Containing Polymeric Micelle System Is Effective for the Treatment of Murine Tegumentary Leishmaniasis. *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 4083–4095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Chanmol, W.; Siriyasatien, P.; Intakhan, N. In Vitro Anti-Leishmania Activity of 8-Hydroxyquinoline and Its Synergistic Effect with Amphotericin B Deoxycholate against *Leishmania Martiniquensis*. *PeerJ* **2022**, *10*, 12813. [[CrossRef](#)]
50. Sousa-Franco, J.; Araújo-Mendes, É.; Silva-Jardim, I.; Jane, L.; Faria, D.R.; Dutra, W.O.; Horta, M.D.F. Infection-Induced Respiratory Burst in BALB/c Macrophages Kills *Leishmania Guyanensis* Amastigotes through Apoptosis: Possible Involvement in Resistance to Cutaneous Leishmaniasis. *Microbes Infect.* **2006**, *8*, 390–400. [[CrossRef](#)]
51. Mukbel, R.M.; Patten, C.; Gibson, K.; Ghosh, M.; Petersen, C.; Jones, D.E. Macrophage Killing of *Leishmania Amazonensis* Amastigotes Requires Both Nitric Oxide and Superoxide. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *76*, 669–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Coimbra, E.S.; Antinarelli, L.M.R.; Silva, N.P.; Souza, I.O.; Meinel, R.S.; Rocha, M.N.; Soares, R.P.P.; da Silva, A.D. Quinoline Derivatives: Synthesis, Leishmanicidal Activity and Involvement of Mitochondrial Oxidative Stress as Mechanism of Action. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *260*, 50–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kaushik, D.; Granato, J.T.; Macedo, G.C.; Dib, P.R.B.; Piplani, S.; Fung, J.; Da Silva, A.D.; Coimbra, E.S.; Petrovsky, N.; Salunke, D.B. Toll-like Receptor-7/8 Agonist Kill *Leishmania Amazonensis* by Acting as pro-Oxidant and pro-Inflammatory Agent. *J. Pharm. Pharmacol.* **2021**, *73*, 1180–1190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Torres Suarez, E.; Granados-Falla, D.S.; Robledo, S.M.; Murillo, J.; Upegui, Y.; Delgado, G. Antileishmanial Activity of Synthetic Analogs of the Naturally Occurring Quinolone Alkaloid N-Methyl-8-Methoxyflindersin. *PLoS ONE* **2020**, *15*, 0243392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Rodríguez-Serrato, M.A.; Salinas-Carmona, M.C.; Limón-Flores, A.Y. Immune Response to *Leishmania Mexicana*: The Host-Parasite Relationship. *Pathog. Dis.* **2020**, *78*, 60. [[CrossRef](#)]
56. Passero, L.F.D.; Carvalho, A.K.; Bordon, M.L.; Bonfim-Melo, A.; Carvalho, K.; Kallás, E.G.; Santos, B.B.; Toyama, M.H.; Paes-Leme, A.; Corbett, C.E.; et al. Proteins of *Leishmania* (Viannia) *Shawi* Confer Protection Associated with Th1 Immune Response and Memory Generation. *Parasites Vectors* **2012**, *5*, 64. [[CrossRef](#)]
57. Ribeiro Antinarelli, L.M.; Glanzmann, N.; Mendonça, D.V.C.; Lage, D.P.; Oliveira-da-Silva, J.A.; Tavares, G.S.V.; Carvalho, A.M.R.S.; Freitas, C.S.; Martins, V.T.; Duarte, M.C.; et al. Parasitological and Immunological Evaluation of a Quinoline Derivative Salt Incorporated into a Polymeric Micelle Formulation against *Leishmania Infantum* Infection. *Parasitol. Res.* **2022**, *121*, 2129–2140. [[CrossRef](#)]
58. Yamamoto, E.S.; de Jesus, J.A.; Bezerra-Souza, A.; Brito, J.R.; Lago, J.H.G.; Laurenti, M.D.; Passero, L.F.D. Tolnaftate Inhibits Ergosterol Production and Impacts Cell Viability of *Leishmania* sp. *Bioorg. Chem.* **2020**, *102*, 104056. [[CrossRef](#)]
59. Jesus, J.A.; Laurenti, M.D.; Lopes-Silva, M.; Ghilardi Lago, J.H.; Domingues Passero, L.F. Leishmanicidal Activity and Ultrastructural Changes of Maslinic Acid Isolated from *Hyptidendron Canum*. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2021**, 2021. [[CrossRef](#)]
60. Jesus, J.A.; Da Silva, T.N.F.; Yamamoto, E.S.; Lago, J.H.G.; Laurenti, M.D.; Passero, L.F.D. Ursolic Acid Potentializes Conventional Therapy in Experimental Leishmaniasis. *Pathogens* **2020**, *9*, 855. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO

Therapeutic Activity of a Topical Formulation Containing 8-Hydroxyquinoline for Cutaneous Leishmaniasis



Article

Therapeutic Activity of a Topical Formulation Containing 8-Hydroxyquinoline for Cutaneous Leishmaniasis

Sarah Kymberly Santos de Lima ^{1,2}, Ítalo Novaes Cavallone ^{1,2}, Dolores Remedios Serrano ³, Brayan J. Anaya ³, Aikaterini Lalatsa ⁴, Márcia Dalastra Laurenti ², João Henrique Ghilardi Lago ⁵, Dalete Christine da Silva Souza ⁵, Gabriela Pustiglione Marinsek ¹, Beatriz Soares Lopes ¹, Renata de Britto Mari ¹ and Luiz Felipe Domingues Passero ^{1,6,*}

- ¹ Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Praça Infante Dom Henrique, s/n, São Vicente 11330-900, SP, Brazil; sarahslima@gmail.com (S.K.S.d.L.); id.cavallone@gmail.com (Í.N.C.); gabriela.marinsek@unesp.br (G.P.M.); bs.lopes@unesp.br (B.S.L.); renata.mari@unesp.br (R.d.B.M.)
 - ² Laboratory of Pathology of Infectious Diseases (LIM50), Department of Pathology, Medical School, São Paulo University, São Paulo 01246-903, SP, Brazil; mdlauraen@usp.br
 - ³ Department of Pharmaceutics and Food Science, Faculty of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramon y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain; dserran@ucm.es (D.R.S.); branaya@ucm.es (B.J.A.)
 - ⁴ CRUK Formulation Unit, Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Strathclyde, 161 Cathedral Street, Glasgow G4 0RE, UK; aikaterini.lalatsa@strath.ac.uk
 - ⁵ Center for Natural and Human Science (CCNH), Federal University of ABC, Santo André, São Paulo 09210-580, SP, Brazil; joaohglago@gmail.com (J.H.G.L.); christinesilva@gmail.com (D.C.d.S.S.)
 - ⁶ Institute for Advanced Studies of Ocean, São Paulo State University (UNESP), Rua João Francisco Bendsorp, 1178, São Vicente 11350-011, SP, Brazil
- * Correspondence: felipe.passero@unesp.br; Tel.: +55-13-3569-7100



Citation: de Lima, S.K.S.; Cavallone, Í.N.; Serrano, D.R.; Anaya, B.J.; Lalatsa, A.; Laurenti, M.D.; Lago, J.H.G.; da Silva Souza, D.C.; Marinsek, G.P.; Lopes, B.S.; et al. Therapeutic Activity of a Topical Formulation Containing 8-Hydroxyquinoline for Cutaneous Leishmaniasis. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 2602. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112602>

Academic Editor: Bozena B. Michniak-Kohn

Received: 11 October 2023

Revised: 31 October 2023

Accepted: 6 November 2023

Published: 8 November 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Cutaneous leishmaniasis exhibits a wide spectrum of clinical manifestations; however, only a limited number of drugs are available and include Glucantime® and amphotericin B, which induce unacceptable side effects in patients, limiting their use. Thus, there is an urgent demand to develop a treatment for leishmaniasis. Recently, it was demonstrated that 8-hydroxyquinoline (8-HQ) showed significant leishmanicidal effects in vitro and in vivo. Based on that, this work aimed to develop a topical formulation containing 8-HQ and assess its activity in experimental cutaneous leishmaniasis. 8-HQ was formulated using a Beeler base at 1 and 2% and showed an emulsion size with a D_{50} of 25 and 51.3 μm , respectively, with a shear-thinning rheological behaviour. The creams were able to permeate artificial Strat-M membranes and excised porcine skin without causing any morphological changes in the porcine skin or murine skin tested. In BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis*, topical treatment with creams containing 1 or 2% of 8-HQ was found to reduce the parasite burden and lesion size compared to infected controls with comparable efficacy to Glucantime® (50 mg/kg) administered at the site of the cutaneous lesion. In the histological section of the skin from infected controls, a diffuse inflammatory infiltrate with many heavily infected macrophages that were associated with areas of necrosis was observed. On the other hand, animals treated with both creams showed only moderate inflammatory infiltrate, characterised by few infected macrophages, while tissue necrosis was not observed. These histological characteristics in topically treated animals were associated with an increase in the amount of IFN- γ and a reduction in IL-4 levels. The topical use of 8-HQ was active in decreasing tissue parasitism and should therefore be considered an interesting alternative directed to the treatment of leishmaniasis, considering that this type of treatment is non-invasive, painless, and, importantly, does not require hospitalisation, improving patient compliance by allowing the treatment to be conducted.

Keywords: topical treatment; 8-hydroxyquinoline; quinolines; *L. (L.) amazonensis*; cutaneous leishmaniasis

1. Introduction

Natural or synthetic quinolines are a group of bioactive compounds with high chemical versatility and diverse pharmacological activities [1,2]. The 8-hydroxyquinoline (8-HQ) molecule is a subclass of quinoline, that is considered a chelating agent, a property associated with most bioactivities of this compound [3,4]. Consequently, interest in 8-HQ has grown exponentially in the last two decades, as this molecule has shown a wide variety of pharmacological activities such as neuroprotection, anticancer, antimicrobial, and antiparasitic agents [5,6].

As an antiparasitic agent, 8-HQ was already demonstrated to be active on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, the aetiologic agent of Chagas disease, and showed similar efficacy to Nifurtimox, a reference drug used in the treatment of Chagas disease [7]. In sleep sickness, 8-HQ derivatives were active in blood forms of *Trypanosoma brucei*, showing selective indexes between 11 and 48, which were superior in comparison to the reference drug. Furthermore, all derivatives were also observed to interact with DNA and eliminate parasites by oxidative stress [8].

Furthermore, male MF1 mice infected with *Schistosoma mansoni* were found to show a reduction in liver parasitism of 65% after oral 8-HQ administration. Histologically, a decrease in the volume of liver granulomas was observed in treated animals, and an increase in anti-*S. mansoni* IgG antibodies was observed. Comparatively, praziquantel, a reference drug used in the treatment of human schistosomiasis, reduced the parasite burden by 62%, but did not reduce the volume of liver granulomas or elevate the levels of anti-*S. mansoni* IgG antibodies, suggesting that immunomodulatory activity could have helped the antiparasitic activity of 8-HQ [9].

In leishmaniasis, several studies have shown that 8-HQ and its derivatives were active on promastigotes and intracellular amastigotes of *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, and *L. (L.) braziliensis*, and that activity was higher than amphotericin B, a reference drug used in the treatment of leishmaniasis [10]. Furthermore, it was shown that such a molecule was able to depolarise the mitochondrial membrane, leading to the death of leishmania parasites. Further studies also verified that BALB/c mice infected with *L. (L.) infantum* or *L. (L.) amazonensis* submitted to subcutaneous treatment with 8-HQ and cloiquinol showed a significant reduction in the size of cutaneous lesions and the number of tissue parasites; furthermore, the efficacy of 8-HQ in a mouse model of cutaneous leishmaniasis was associated with an increase in the Th1 immune response [11,12]. Importantly, 8-HQ and cloiquinol induced no liver or renal damage in experimental animals [13], suggesting that 8-HQ is an interesting molecule to develop a new and effective drug directed to leishmaniasis.

Recently, 8-HQ showed a wide range of leishmanicidal activity on promastigotes and intracellular amastigotes of *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, and *L. (V.) shawi*, demonstrating multispectral activity and higher selectivity than miltefosine. This is likely attributed to the leishmanicidal activity of 8-HQ and the production of nitric oxide (NO) in macrophages. Furthermore, the administration of 8-HQ by an intralésional route at 10 and 20 mg/kg caused a significant reduction in parasite burden in the skin of BALB/c mice infected with a strain of *L. (L.) amazonensis* that was isolated from a patient with anergic diffuse leishmaniasis. Additionally, these animals produced higher levels of IFN- γ and lower levels of IL-4 cytokines, indicating an immunomodulatory response stimulated by 8-HQ during leishmania infection [14].

Taken together, these studies indicated that 8-HQ had higher bioactivity in *Leishmania* sp., which is more selective than drugs conventionally used in the treatment of leishmaniasis, suggesting that 8-HQ is indeed a hit alternative drug. It is of the utmost importance to characterise new treatments for both visceral (VL) and cutaneous leishmaniasis (CL), considering the existence of a limited arsenal of chemotherapeutic possibilities that are based on pentavalent antimonials, amphotericin B, and miltefosine.

Pentavalent antimonials (Sb^v) were recommended by the WHO as the first-line drug for the treatment of leishmaniasis [15], and can be administered in doses of 20 mg/kg⁻¹ subcutaneously for 28–30 days [16,17]. However, antimonials showed variable responses

to disease (35% to 95%); in addition, this treatment is limited, considering all side effects that are induced in patients, including cardio and hepatotoxicity [18,19]. Amphotericin B is recommended as the second-line drug for the treatment of leishmaniasis, mainly in regions where patients are resistant to antimony [20]. Administration is given daily or on alternate days with 1 mg/kg^{-1} during 15–20 intravenous infusions, resulting in high efficacy [21]. Despite its high efficacy, the treatment causes significant side effects, including fever, hypokalaemia, and nephrotoxicity; in addition, the treatment is costly and requires prolonged hospitalisation [22]. Lipid formulations of amphotericin B were developed to minimise the severe side effects of amphotericin B [23,24], but they are still expensive, primarily for low-income countries [25,26]. Miltefosine is an alkyl phosphocholine derivative with antineoplastic activity and a significant leishmanicidal effect. It is the only drug administered orally that is currently approved for the treatment of leishmaniasis [27]. Treatment is given for 28 days at variable doses, depending on geographic location and the clinical form of leishmaniasis. The main problem associated with miltefosine treatment is the long half-life in the human body that can cause gastrointestinal toxicity; teratogenicity is another concern related to the treatment. Furthermore, the cure rate is variable depending on the infecting species, but a lack of efficacy has also been described in human infections [28,29], suggesting the existence of parasites resistant to miltefosine [30].

Despite the pharmacological effect of such drugs on leishmaniasis, it is important to note that none of them was originally developed to treat human leishmaniasis, so the current treatment is based on repurposed drugs whose toxic effects in patients remain unacceptable while remaining highly invasive and requiring hospitalisation [31]. In this case, the development of a topical therapy would represent an important milestone in the treatment of cutaneous leishmaniasis; however, until now, there has been no effective topical treatment. Taking into account the scarcity of topical treatments, this work aims to develop a low-cost cream containing 8-HQ, a compound with a multispectral effect on *Leishmania* species, and to evaluate its preclinical efficacy in an experimental cutaneous leishmaniasis model. Prepared creams exhibited significant rheological, physical, and permeability features, while no toxic events were observed in the skin of BALB/c treated mice. 8-HQ creams were able to reduce the size of the lesion and tissue parasitism in experimental cutaneous leishmaniasis. Our data support that 8-HQ topical formulations can be extemporaneous readily translatable low-cost topical treatments for cutaneous leishmaniasis that can be easily translated into industrially scalable topical therapies for cutaneous leishmaniasis.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

RPMI 1640 medium (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was supplemented with 10% inactivated foetal bovine serum (Thermo Scientific), 1% pyruvate, 1% of non-essential amino acids, $10 \text{ }\mu\text{g/mL}$ of gentamicin and 1000 U/mL penicillin, and 0.1% of 2-mercaptoethanol (R10). Schneider medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), $10 \text{ }\mu\text{g/mL}$ of gentamicin, and 1000 U/mL of penicillin (S10). The 8-hydroxyquinoline molecule 8-hydroxyquinoline (purity > 99%) was obtained from Sigma-Aldrich (USA). Glucantime[®] was obtained from Sanofi-Aventis (São Paulo, Brazil).

2.2. Preparation of Creams Containing 8-HQ

To prepare the Beeler's base (10 g), firstly, the oily phase was prepared by melting cetyl alcohol (1.5 g) and white wax (0.1 g) (Sigma) in a water bath at $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Subsequently, butylhydroxytoluene (2 mg) was added as the oily phase. The aqueous phase, composed of sodium lauryl sulphate (0.2 g), propylene glycol (1 g), and distilled water (q.s. 10 g), was then heated up to the same temperature as the oil phase and mixed with the oily components to produce the Beeler base cream. 8-HQ was dispersed in $50 \text{ }\mu\text{L}$ of propylene glycol at 1% (0.1 g) or 2% (0.2 g) prior to being incorporated into the Beeler's base using

a mortar and pestle. The creams were packaged in 30 mL amber glass bottles and no changes in the physical appearance of the creams were observed for six months at room temperature (~25 °C).

2.3. Physical Characterisation of Creams

Samples of all creams were diluted in deionised water (1:100 *w/w*), and 300 µL aliquots of the diluted creams were added to the integrated cuvette of the laser particle analyser with a detection range between 1 and 135,000 µm (Microtrac S3500, Microtrac, PA, USA) to determine the particle size and distribution of 8-HQ creams. The size and distribution of the prepared creams were expressed by the median diameter of the volume (MV) and the D₁₀, D₅₀, and D₉₀ (indicating the percentages of particles having 10%, 50%, and 90% of the diameter equal to or lower than the given value) [32]. Measurements were performed in triplicate.

2.4. Viscosity Analysis

The viscosity of the creams prepared was evaluated in triplicate using a Brookfield Rheometer (Middleborough, MA, USA), model DV-III, fitted with a temperature control probe. A 5 cm cone–plate measuring geometry was used (Spindle CP-42). The temperature of all measurements was maintained at 25 °C. Viscosity (cP) and shear stress ($D \times \text{cm}^{-2}$) were determined over a speed rate from 0 to 0.5 rpm and from 0.5 to 0 rpm, and a shear rate from 0 to 1.92 (1/s). Before measurements, a standard of 30,000 cp was analysed. The fluidity parameter was calculated using linear regression from the slope of the shear stress versus the shear rate plot.

2.5. Permeation Studies with Creams Containing 8-HQ

A Strat-M[®] artificial membrane (Transdermal Diffusion Test, 25 mm, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) with 0.33 mm thickness, engineered to mimic human skin, was initially used. This multi-layer artificial membrane possesses a tight top layer coated with a lipid blend resembling the lipid chemistry of the human stratum corneum (SC) and a porous lower layer resembling the epidermis and dermis layers [33]. This membrane possesses equivalency to human skin for the skin permeation of many drugs and claims to have better correlations compared with other biological membranes [34]. Strat-M[®] was mounted between the donor and receptor chamber of Franz diffusion cells with a diffusion area of 1.766 cm² and a cell volume of 12 mL capacity. The receptor chamber was filled with a mixture of phosphate buffer (pH 5.5) and methanol (1:1, *v:v*). The donor compartment was filled with PBS for 30 min until the system reached 35 °C. The PBS in the receptor chamber was removed and 100 mg of creams containing 1% or 2% 8-HQ were added to the donor compartment in strict contact with the membrane. Samples of 1 mL were withdrawn from the receptor chamber at the following time points, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, and 360 min, and samples were analysed using HPLC, as described below. The receptor chamber was immediately replenished with pre-warmed buffer. Cumulative amounts of 8-HQ permeated through the artificial membrane were analysed at 360 min. Additionally, permeability studies were performed using porcine skin from the ear of 3-month-old male pigs obtained from the slaughterhouse. The skin (thickness: 1.66 ± 0.16 mm) was prepared as previously described [35]. At the end of each permeability study (360 min), the skin samples were wiped with an ethanol-impregnated cotton bud to remove the excess formulation. Skin samples were cut in half and one half was fixed using 4% paraformaldehyde (pH 7) for histological studies, while the other half was weighed and homogenised with 2 mL of PBS pH 7.4 buffer, diluted 1:2 with methanol, vortexed, and centrifuged (10 min, 10,000 rpm) [32]. The supernatant was analysed for HPLC.

The collected samples were analysed using UHPLC (Ultimate 3000 standard Quaternary System). The integration of the peaks was performed using the program Chromeleon 7.3.1.6535). An Analytic Kinetex EVO 5 mm C18 reverse phase HPLC column (150 × 4.6 mm) was used for analysis. Isocratic elution was used with a mobile phase consisting of acetonitrile

and methanol (52:48). The flow rate was set at 1 mL/min, and the injection volume was 10 μ L. Detection was carried out at 246 nm, the retention time was detected in 2.25 min of run, and a linear calibration curve was achieved between 0.38 and 400 μ g/mL⁻¹ ($R^2 > 0.9906$).

A standard curve was constructed with 8-HQ and regression analysis was used to calculate the slopes and intercepts of the linear portion of each graph. The steady-state flux (JSS), the permeability coefficient (P), the diffusion coefficient, and the lag time were estimated as previously described by Lalatsa et al. [36].

Each formulation was tested in triplicate. Regression analysis was used to calculate the slopes and intercepts of the linear portion of each graph, and the following equations were applied to each formulation.

To calculate the steady-state flux,

$$j_{ss} = \frac{dC}{dX} \times A \quad (1)$$

where j_{ss} is the steady-state flux (μ g/cm²/h), dC/dX is the amount of 8-HQ permeating the membrane over time (μ g/h), and A is the surface area of contact of the formulation.

To calculate the permeability coefficient (P), the following Equation (2) was employed:

$$P = j_{ss}/cd \quad (2)$$

where cd is amount of drug applied in the donor compartment

The diffusion coefficient (μ m/h) was calculated by using Equation (3):

$$j_{ss} = \frac{D \times k}{h} cd \quad (3)$$

where h is the thickness of the membrane (μ m²) [36].

2.6. Animals

Six- to eight-week-old male BALB/c mice were obtained from the Animal Facility Center of the Medical School of São Paulo University, housed in accordance with Animal Welfare Committee standards, and had access to food and water ad libitum throughout the study under a 12 h light cycle. This study was carried out following the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Institutional Animal Care and Use Committee at the Medical School of São Paulo University (CEP1648/2022). For all experimental procedures, the animals were anaesthetised with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg).

2.7. Cutaneous Toxicity Studies with Creams Containing 8-HQ

Twenty five healthy male BALB/c mice were divided into five groups: group 1 (G1) constituted control mice; group 2 (G2) constituted animals treated with 1.7 mg of blank Beeler's base cream by the topical route at the base of the tail, with a surface area approximately of 5.2 mm²; groups 3 (G3) and 4 (G4) constituted animals treated with 1.7 mg of cream containing 1% or 2 of 8-HQ by the topical route at the base of the tail, respectively; group 5 (G5) was treated with 50 mg/kg of Glucantime[®] by the intralesional route. Animals were treated during 14 consecutive days, once daily. The physical conditions of the animals were monitored once a week. One week after the last dose, the animals were euthanised with a lethal dose of thiopental. Skin fragments and inguinal lymph nodes were collected to perform different assays. All animals survived till the end of the study.

2.8. Parasite

The *L. (L.) amazonensis* parasite (MHOM/BR/73/M2269) was identified using monoclonal antibodies and isoenzyme electrophoretic profiles at the Leishmaniasis Laboratory of the Evandro Chagas Institute (Belém, PA, Brazil). Parasite species were grown in S10

medium at 25 °C. In all experiments, the parasites were in a stationary phase of growth and were in the first passage of culture to perform in vivo experiments.

2.9. Infection and Experimental Treatment

Thirty male BALB/c mice were subcutaneously infected at the base of the tail with 10^6 promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* in the stationary phase of growth. Five animals received only sodium chloride 0.9% (*w/v*) under the same route (healthy group). Four weeks after infection, *L. (L.) amazonensis*-infected BALB/c mice were divided into six groups: group 1 (G1) and group 2 (G2) constituted infected animals treated with 1.7 mg of cream containing 1% or 2 of 8-HQ by the topical route at the base of the tail, with a surface area approximately of 5.2 mm², respectively; group 3 (G3) was treated only with Beeler's base cream by the topical route; group 4 (G4) was treated with 50 mg/kg of Glucantime[®] by the intralesional route; group 5 (G5) was the infected control; and group 6 (G6) constituted non-infected, non-treated animals. Treatment was started in the fifth week post-infection (PI), and the animals were treated for 14 consecutive days, once daily. The physical conditions of the animals were monitored once a week. One week after the last dose, the animals were euthanised with a lethal dose of thiopental. Skin fragments and inguinal lymph nodes were collected to perform different assays. All animals survived the infection till the end of the study.

2.10. Development of Lesions and Determination of Tissue Parasitism

The clinical course of the development of the lesion was assessed once a week with the aid of a digital micrometer with range of 0–25 mm and 0.001 mm accuracy (Mitutoyo, Aurora, IL, USA). The skin parasite load was determined using the quantitative limiting dilution assay. Briefly, a skin fragment from the base of the tail and inguinal lymph nodes was collected aseptically, weighed, and homogenised in S10 medium. The tissue suspensions were subjected to 12 serial dilutions with four replicate wells. The number of viable parasites was determined based on the highest dilution in which the promastigotes could grow after 10 days of incubation at 25 °C.

2.11. Cytokine Production Studies

Inguinal lymph nodes and skin fragments from different groups were collected aseptically, weighed, macerated in R10 medium, and centrifuged at 10,000 rpm, 6 min, 4 °C. The supernatants were collected, and the amounts of IL-4 and IFN- γ (ThermoFischer, Waltham, MA, USA) were quantified by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's recommendations. The concentrations of cytokines were normalised by the weight of each organ collected.

2.12. Statistical Analysis

All experiments were repeated at least three times and the values obtained were expressed as mean \pm standard error. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software and the ANOVA test was used to rate differences between groups. Statistical significance was established at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Measurement of Particle Size

Physical characterisation demonstrated that the distribution of all creams was arranged in such a way that 10% of the particles (D10) had a size of ~ 10 μm (Figure 1). Beeler's base and the cream containing 1% of 8-HQ exhibited a D₅₀ of 25 μm ; however, the cream containing 2% of 8-HQ showed a significant increase in D₅₀ (51.27 μm) in comparison with Beeler's base and cream 1%. Beeler's base and 1% cream showed a similar D₉₀, with a particle size of 92.84 and 89.93 μm , respectively, but the cream 2% presented the highest D₉₀ (146.77 μm) in comparison to all creams.

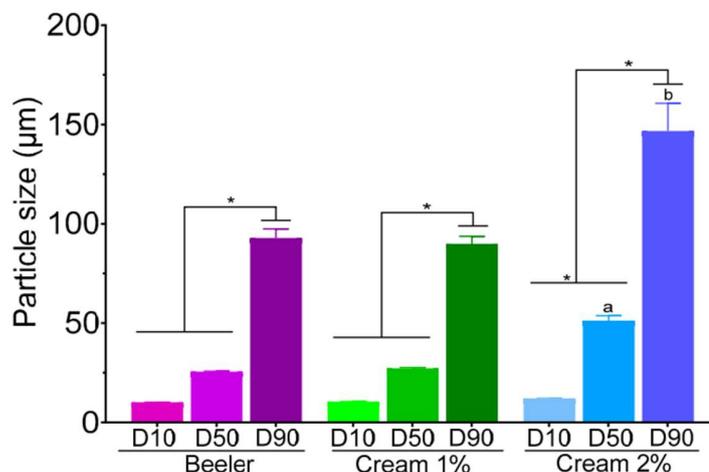


Figure 1. Particle size distribution of Beeler's base and creams containing 1 or 2% of 8-HQ. Data are expressed as mean \pm standard deviation of three independent experiments. * $p < 0.05$ indicates statistical significance between the indicated groups. The letters "a" and "b" indicate statistical significance among D₅₀ and D₉₀ of cream 2% with Beeler base and cream 1%, respectively.

3.2. Viscosity

No statistical differences were observed in the viscosity values between the blank Beeler's base cream and creams containing 1 or 2% of 8-HQ at any of the rpm tested (Figure 2A). All three creams showed a shear-thinning rheological behaviour (Figure 2B), referring to the decrease in shear stress at higher shear rates. This behaviour is optimal for topical pharmaceutical products, since upon application on the skin the extensibility improves, allowing an easier application and, hence, better patient compliance.

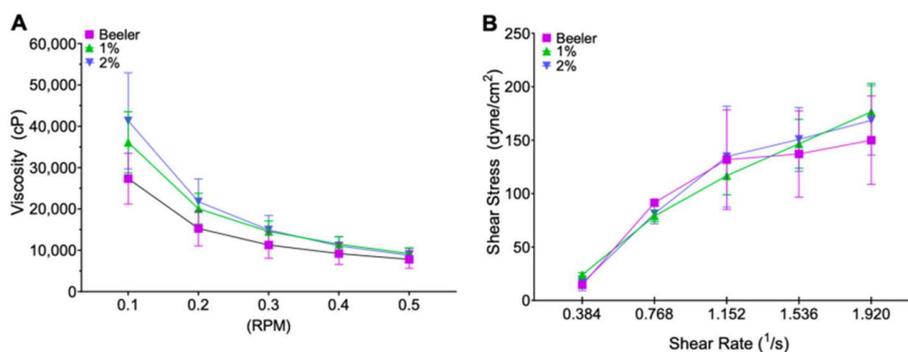


Figure 2. Viscosity versus applied rpm (A), from 0.5 to 0 rpm. Blank Beeler's base cream, 1%, and 2% 8-HQ cream. Shear stress versus shear rate (B), from 0.384 to 1.92 (1/s). Blank Beeler's base cream with a $y = 82.378x + 10.07$ and a $R^2 = 0.8257$, 1% 8-HQ cream with a $y = 97.017x - 3.18$ and a $R^2 = 0.9808$, 2% 8-HQ cream with a $y = 97.404x - 1.9483$ and a $R^2 = 0.914$.

3.3. Franz Cell Diffusion Assay

Permeation studies were performed with 1% and 2% 8-HQ creams using porcine skin, as well as with artificial membranes (Strat-M membrane) engineered to mimic human skin (Table 1). Steady-state flux was observed to be 1.57 higher in porcine skin incubated with

1% cream than with 2% cream ($p < 0.05$). However, in artificial membranes, the steady-state flux was similar when incubated with creams of 1 or 2%.

Table 1. Transdermal diffusion tests were performed with porcine skin and artificial membranes incubated with creams containing 1 or 2% of 8-HQ. * $p < 0.05$ between 1 and 2% creams.

Parameter	Porcine Skin		Artificial Membrane	
	Cream 1%	Cream 2%	Cream 1%	Cream 2%
Steady-state flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	40.24 ± 1.09	$25.55 \pm 1.21^*$	30.66 ± 3.25	33.49 ± 6.09
Lag time (h)	0.46 ± 0.03	0.60 ± 0.16	0.35 ± 0.03	0.24 ± 0.05
Permeability coefficient (mm^2/h)	0.20 ± 0.02	$0.06 \pm 0.003^*$	0.31 ± 0.03	0.24 ± 0.03
Diffusion coefficient ($\mu\text{m}/\text{h}$)	33.83 ± 4.68	$10.63 \pm 0.50^*$	9.20 ± 0.97	7.33 ± 0.87
Cumulative amount of 8-HQ retained ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0.20 ± 0.02	0.17 ± 0.04	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.01

In contrast, the permeability and diffusion coefficient parameters were 3.33 and 3.18 times higher in the skin incubated with the cream of 1% than with the cream of 2%, respectively. On the other hand, artificial membranes incubated with creams of 1 or 2% did not show significant differences between such parameters. The latency time parameters (lag time) were similar in the skin and artificial membranes incubated with 1 or 2% creams.

After 360 min of incubation, porcine skin fragments were collected and fixed in buffered formalin (pH7.4). In this regard, creams containing 1% (Figure 3A) or 2% (Figure 3B) of 8-HQ did not change the morphology of porcine skin, considering that the epidermis, superficial and deep dermis, glands, hair follicles, and capillaries were preserved.

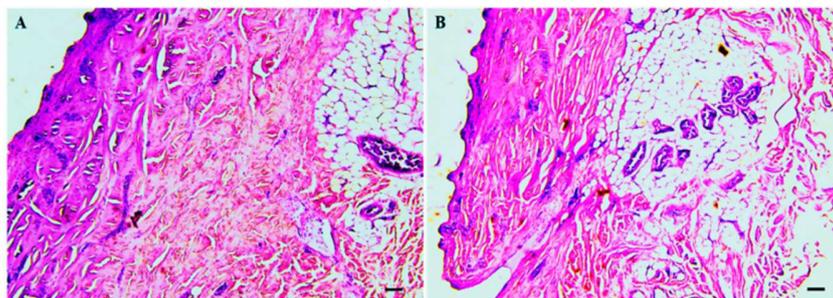


Figure 3. After the skin permeation test, fragments of porcine ear skin were shaved and fixed in 2% buffered formalin and the histological sections were stained with haematoxylin and eosin. (HE). (A) Cream containing 1% 8-HQ; (B) cream containing 2% 8-HQ. The black bar represents 10 μm .

3.4. Histological Changes in the Skin from Healthy BALB/c Mice Treated with Topical Creams Containing 8-HQ

The histological sections of the skin of healthy animals without treatment showed a normal morphology of the epidermis and dermis, as well as of the glands, hair follicles, and capillaries (Figure 4A). Similarly, the skin of animals treated with blank Beeler's base (Figure 4B) or cream containing 1% (Figure 4C) or 2% (Figure 4D) of 8-HQ showed a similar morphology to the control group (Figure 4A). In contrast, the skin of animals treated with Glucantime[®] (50 mg/kg) intralesionally exhibited a focal area of inflammation in the dermis, which was characterised by the infiltration of mononuclear and polymorphonuclear cells (Figure 4E).

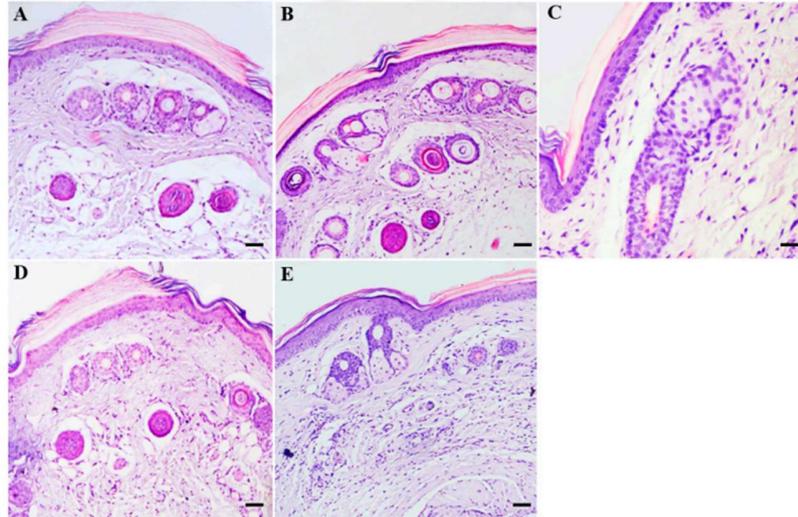


Figure 4. Histological changes in non-infected BALB/c mice submitted to the treatment. Control mice were not submitted to any topical treatment (A); on the other side, groups of mice were treated for 14 days with blank Beeler's base (B) or creams containing 1% (C) or 2% of 8-HQ (D) topically or with Glucantime® (50 mg/kg) by the intralesional route (E). The skin histological section of each group was stained with haematoxylin and eosin (HE) and the main histological changes were compared with the skin histological section collected from untreated BALB/c mice (A). Bars = 20 μ m.

3.5. Efficacy of Topical Treatment

BALB/c mice were infected at the base of the tail, and in the fifth week of infection the experimental animals were treated topically daily with 1.7 mg of creams containing 1% or 2% of 8-HQ, blank Beeler base, and with the reference drug Glucantime® by the intralesional route at the site of cutaneous lesion.

In this regard, it was observed that in the 6th week of PI (Figure 5A), the group treated with the cream containing 1% or 2% of 8-HQ had a significant decrease in the size of the skin lesions (by 34.5% and 49.5%, respectively) compared to infected animals, in which the lesions progressively increased. In the 7th week of PI, animals treated with creams containing 1 or 2% 8-HQ as well as Glucantime® exhibited a significant reduction ($p < 0.05$) in the lesion size compared to infected animals. Additionally, the group of animals treated with 1% cream presented a significant decrease in the lesion size compared to groups treated with 2% cream of 8-HQ or Glucantime® by the intralesional route at the site of lesion development. Lesions of animals treated with Beeler's base cream increased over time.

Limiting the dilution assay showed that the infected group treated with Beeler's base had the highest parasite load in the skin (Figure 5B) and lymph nodes (Figure 5C) among the studied groups. In contrast, animals treated with Glucantime® by the intralesional route or topically with both creams exhibited a significant reduction in skin and lymph node parasitisms ($p < 0.05$). Although not significant, the animals treated with Glucantime® showed lower parasitism than the animals treated topically.

3.6. Histopathological Changes

The histopathological evaluation performed in the skin histological sections of infected BALB/c mice (Figure 6A) and the group treated with blank Beeler's base cream (Figure 6C) showed that both experimental groups had a high number of infected macrophages (de-

tailed in insets Figure 6B,D), and this was associated with an intense and diffuse inflammatory infiltrate containing few lymphocytes, but a large number of mono and polymorphonuclear cells; furthermore, areas of necrosis were observed in the deep dermis (arrowhead).

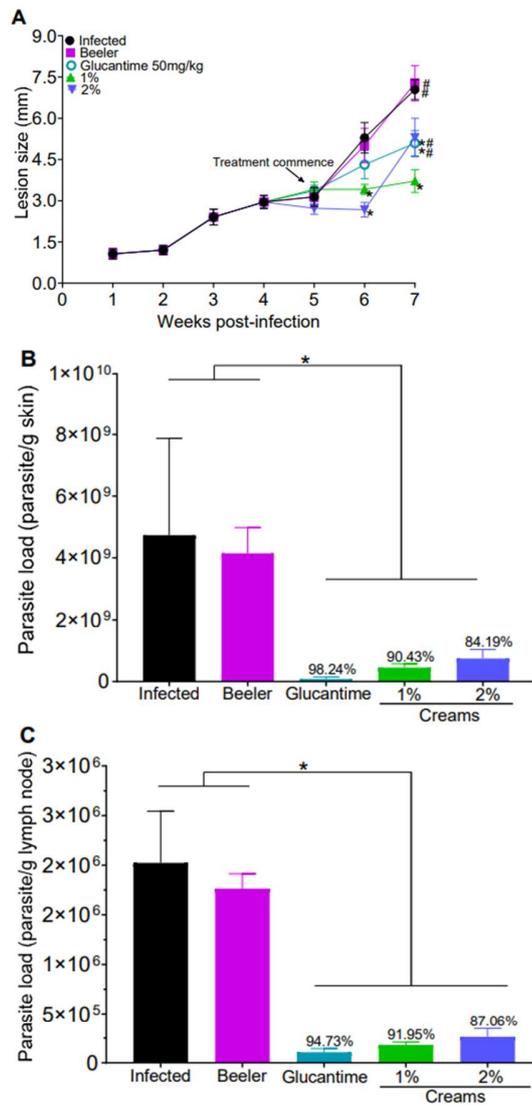


Figure 5. BALB/c mice were infected with 10^6 promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* at the base of the tail; at the 5th week post-infection, topical treatment was started with creams containing 1 or 2% of 8-HQ or Glucantime[®] (50 mg/kg) by the intralesional route at the site of cutaneous lesion. The animals were treated once a day for 14 days. Lesion development (A) was monitored with a micrometer and at the 7th week PI parasite loads in the skin (B) and lymph nodes (C) were determined using a limiting dilution assay. * $p < 0.05$ in comparison to the infected group. # $p < 0.05$ in comparison to the 1% cream.

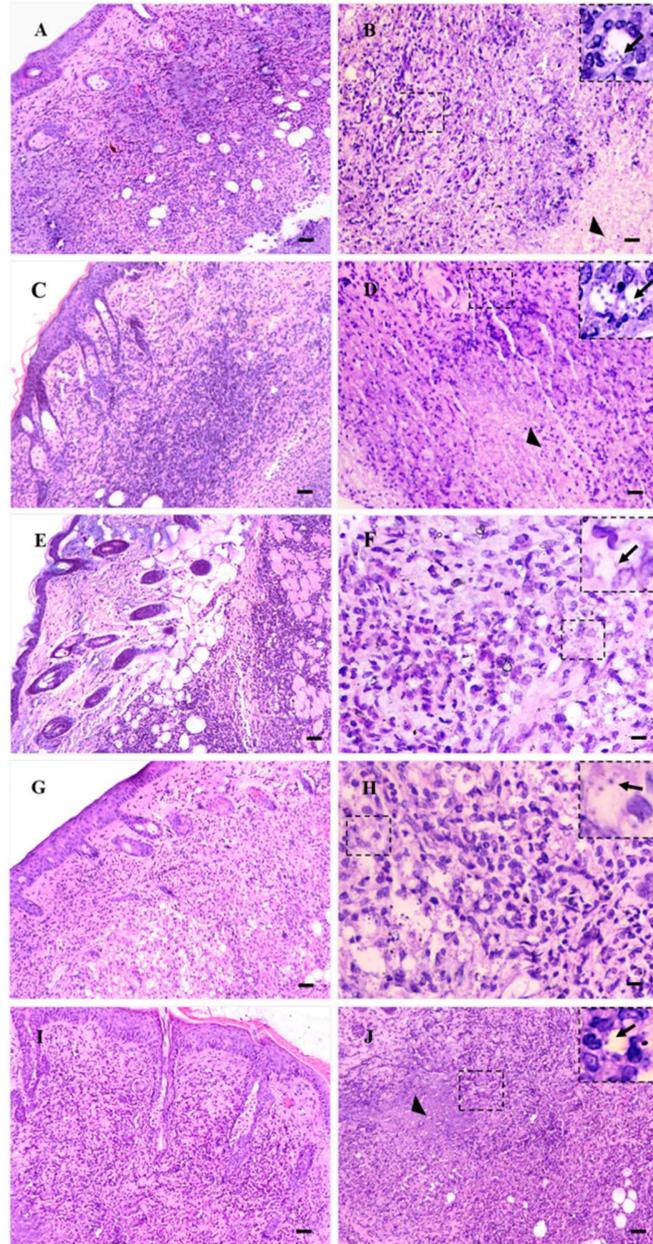


Figure 6. Histological skin sections of BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis*. (A,B) Infected control; (C,D) topical treatment with blank Beeler's base cream; (E,F) topical treatment with cream 1% of 8-hydroxyquinoline; (G,H) topical treatment with cream 2% of 8-hydroxyquinoline; (I,J) treatment by the intralesional route at the site of cutaneous lesion with 50 mg/kg of Glucantime[®]. (A,C,E,G,I) show details of the epidermis and dermis of each group, while (B,D,F,H,J) show details mainly on parasitism, illustrated by the black arrows. Arrowheads indicate areas of necrosis (bars: 40 μ m).

In contrast to these data, groups treated topically with cream 1% (Figure 6E) or 2% (Figure 6G) exhibited, compared to the control, a moderate inflammatory response; additionally, it was composed mainly of lymphocytes and macrophages whose intensities of infection were lower than in the infected group (detailed in insets Figure 6F,H). Rare areas of tissue necrosis were observed. In the same way, the skin of BALB/c mice treated with Glucantime® intralesionally (50 mg/kg) presented an intense and diffuse inflammatory infiltrate composed primarily of mononuclear cells (Figure 6I); also, few amastigote forms were observed within macrophages (detailed in inset Figure 6J). Focal areas of tissue necrosis were observed in the deep dermis (arrowhead in Figure 6J).

3.7. Immunological Studies

In the lymph nodes of the infected control and animals treated with Beeler's base cream, a high production of IL-4 was observed. On the other hand, intralesional treatment with Glucantime® and topical treatment with creams containing 1 or 2% of 8-HQ reduced IL-4 production compared to infected animals and animals treated with Beeler's base ($p < 0.05$). Furthermore, IL-4 levels in the groups submitted to treatments were similar to the control—uninfected, untreated animals (Figure 7A).

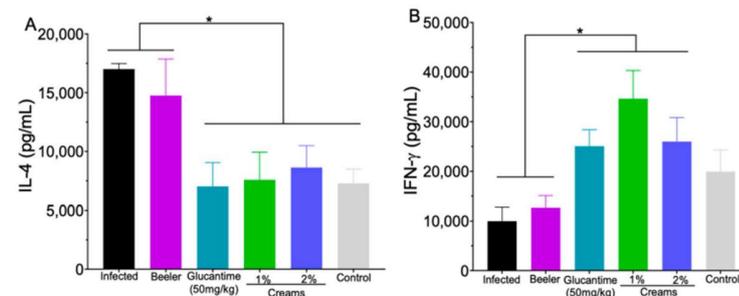


Figure 7. The draining lymph nodes of all experimental animals were collected, a single cell suspension was produced, and the supernatants were collected to quantify the amounts of IL-4 (A) and IFN- γ (B) using ELISA. * $p < 0.05$.

Concerning IFN- γ (Figure 7B), it was verified that the infected group and group treated with Beeler's base produced low levels of IFN- γ . On the other hand, animals treated with Glucantime® or cream containing 1 and 2% of 8-HQ exhibited a significant increase ($p < 0.05$) in IFN- γ production.

4. Discussion

8-HQ has a strong and evident anti-*Leishmania* activity against different species that cause visceral or cutaneous leishmaniasis, with selectivity indexes superior to those of the conventional drug miltefosine [10,12]. Furthermore, it was shown that the subcutaneous and intralesional administration of this molecule in mice infected with dermatropic species of leishmania drastically decreased the size of skin lesions, as well as tissue parasitism [14]. Although the therapeutic activity of 8-HQ has been described, to the best of our knowledge no topical treatment has been developed so far. The fabrication of a cream containing bioactive molecules would be a significant improvement in the treatment of cutaneous leishmaniasis because patients would be able to treat their lesions at home without the need for healthcare professionals and hospitalisation, which might be difficult in rural areas. Additionally, as suggested by the Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi), a topical treatment is a non-invasive, non-painful method of administration and possibly its use in cases of cutaneous leishmaniasis is likely to increase patient compliance and, consequently, the efficacy in comparison to current first-line treatments that are hampered by severe side

effects in patients [26]. Therefore, extemporaneously or industrially manufactured topical therapies will have significant importance in geographic localities where cutaneous leishmaniasis is endemic. Thus, in the present manuscript, a cream containing the bioactive molecule 8-HQ was prepared, characterised, and assessed in terms of safety and efficacy in an animal model of cutaneous leishmaniasis.

The 1% 8-HQ cream showed a similar particle size to that of Beeler's cream, indicating that 8-HQ is homogeneously dispersed by extemporaneous dispensing and likely solubilised within the emulsion. However, the 2% 8-HQ cream showed increased sizes in D_{50} and D_{90} , likely attributed to the large particle size of 8-HQ that, after incorporation in the cream, remained partially unsolubilised, resulting in suspended 8-HQ particles within the cream base. Thus, if 8-HQ remains suspended within the cream base, it might not be able to permeate across the skin and only the solubilised fraction may be able to cross the skin barrier.

Thus, the 1% cream, with more 8-HQ in solubilised form and droplets of lower particle size, was more likely to permeate across the murine and porcine skin tested compared to the 2% cream. A study of the transdermal delivery of hydroquinone demonstrated that the formulation with smaller droplets exhibited higher permeation across a Strat-M membrane and mouse skin [32].

To ensure the creams could be applied and spread on the skin, the rheology of the cream was assessed. 8-HQ creams' shear thinned as the shear rate increased. As viscosity decreases, frictional forces also decrease, and less energy is required for shear, which occurs when a fluid is moved or spread out [37]. Measured viscosity is within the range previously approved for human use in topical formulations, and ensures that the prepared cream can be applied and stay on human skin, while the observed shear thinning behaviour ensures the spreadability of the formulation on the skin surface [36].

Creams were tested for permeability using porcine skin and an artificial membrane (Strat-M membrane). In porcine skin, 1% cream demonstrated a higher flux and diffusion coefficient through the skin compared to the 2%, with similar lag times. This is likely explained by the solubilisation of 8-HQ within the Beeler's cream being nearly complete in the 1% compared to the 2% cream. 8-HQ has a high solubility in propylene glycol and cetyl alcohol (components of Beeler's base), but higher amounts might be above the maximum solubility for the drug per weight of the base, which allows some of the drugs to remain suspended and thus not able to permeate across the skin. Interestingly, no difference was seen in the Strat-M membranes [34,38], which is explained by the infinite dose used in our experiments.

At the end of the permeation studies, it was observed that porcine skin treated with cream containing 1% or 2% 8-HQ accumulated 17.80 or 5.60 times more 8-HQ, respectively, than the required concentration of 8-HQ able to eliminate 50% of the number of amastigote forms (EC_{50}) of *L. (L.) amazonensis*, which was previously estimated in 1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 24 h of incubation [14]. Furthermore, 8-HQ creams did not change the histological structure of porcine skin, suggesting that creams were safe to be used *in vivo*. Considering the Strat-M membrane, the diffusion coefficient of both creams was also higher than the EC_{50} of 8-HQ on *L. (L.) amazonensis* amastigotes. It is still important to note that the differences observed in the permeation of creams through the porcine skin and the Strat-M membranes may be related to the difference in the complex histological structure and thickness of the porcine skin in comparison to the artificial membrane. Nevertheless, results obtained in both experimental conditions strongly support the effectiveness of topical formulations containing 8-HQ.

During permeation experiments (*in vitro*), histological changes in the skin induced by creams containing 1 or 2% of 8-HQ were not observed. Therefore, to validate the absence of skin toxicity in the creams, non-infected BALB/c mice were treated daily for 14 days with cream 1 or 2%. In this regard, topical treatment with blank Beeler or creams containing 8-HQ was shown to not cause a histological alteration in the skin of BALB/c mice or induce an inflammatory response; in contrast, an inflammatory infiltrate was observed in the skin

of BALB/c mice treated with Glucantime[®] by the intralesional route. The results are related to the fact that Glucantime[®] is able to increase the phagocytic capacity of monocytes and neutrophils and increase the generation of superoxide, as well as the production of TNF- α and NO [39], which explains the inflammation observed in the skin. Furthermore, animals treated by the intralesional route, which can cause an inflammatory response due to a mechanical injury, show dissociation oedema that may be responsible for this inflammatory response [40]. In summary, the results showed suggest that creams containing 1 or 2% of 8-HQ did not alter the skin morphology after 14 topical applications, and therefore they can be considered interesting topical formulations to analyse in the experimental model of cutaneous leishmaniasis.

Both creams altered the course of cutaneous lesions in mice, considering that the animals treated exhibited a significative reduction in the size of the cutaneous lesions after the first week of treatment compared to the control and the group treated only with Beeler's cream. Additionally, 1% cream was found to induce the most effective reduction in lesion size compared to animals treated with the 2% topical cream and animals treated intralesional with Glucantime[®] at the site of cutaneous lesion. As previously observed, this biological finding may be related to the higher permeability of 1% cream compared to the cream with 2%.

In addition to a reduction in the size of the skin lesions, a significant reduction was observed in the number of parasites in the skin and lymph nodes of infected mice submitted to topical treatment with 1 or 2% creams. Possibly, this activity may be related to the characteristics of the Beeler's base, which contains permeability enhancers (propylene glycol, sodium lauryl sulphate, and cetyl alcohol) that aid the permeation of 8-HQ through the skin [41]. Sodium lauryl sulphate can reduce the resistance of the stratum corneum facilitating the penetration of the compound [42], and propylene glycol is a good solubiliser for hydrophobic drugs such as 8-HQ, enhancing permeation [43] through the skin, which explains the observed significant efficacy, as previously observed in mice treated with 8-HQ intralesionally [14].

Although cream and Glucantime[®] treatments were effective in reducing the size of the lesions and parasite load, it is still important to emphasise that the animals treated by the intralesional route with Glucantime[®] received an accumulated dose of 21 mg; such an amount reduced parasitism by 98.24 and 94.7% in the skin and lymph node, respectively. On the other hand, animals treated topically with 1% cream received a total dose of 0.24 mg of 8-HQ that decreased by 90.4 and 91.9% of parasites in the skin and lymph nodes, respectively, with comparable efficacy to Glucantime[®] in the model of cutaneous leishmaniasis (88-fold lower dose applied).

Furthermore, it was verified that the infected control and animals treated with blank Beeler's cream exhibited an intense and diffuse inflammatory infiltrate associated with a high number of densely infected macrophages. Areas of necrosis were observed throughout the histological section of the skin. On the other hand, the skin of animals treated with 1 or 2% creams showed a moderate inflammatory infiltrate composed mainly of lymphocytes and few infected macrophages, suggesting that the topical treatments were effective in eliminating intracellular parasites. Even though animals treated with Glucantime[®] (50 mg/kg) demonstrated a reduced number of infected macrophages and amastigotes in tissue, histopathology revealed a significant diffuse inflammatory response, and necrosis in some areas of the skin (arrowhead in Figure 6). It is well known that *L. (L.) amazonensis* infection induces an intense inflammatory infiltrate that is highly correlated with disease progression [44,45]. Therefore, molecules capable of decreasing this inflammatory process and reducing tissue parasitism may be of interest for the development of effective treatment, as observed in studies employing 8-HQ as an intralesional drug in the model of cutaneous leishmaniasis, which was able to reduce tissue parasitism as well as the inflammatory response [46]. Therefore, these data indicate that the action of 8-HQ formulated as a cream exerts a significant leishmanicidal effect.

During the progression of *L. (L.) amazonensis* infection, the host's immunological response is characterised by a high production of IL-4 cytokines, resulting in a polarised Th2 immune response, leading to the survival and spread of parasites through tissues [40,47,48]. In the present study, it was verified that control animals developed a classic Th2 immune response, with high amounts of IL-4 and low amounts of IFN- γ , which is highly correlated with disease progression [49]. On the other hand, animals treated with Glucantime[®] and creams 1 and 2% developed a Th1 immune response marked by a high production of IFN- γ and low IL-4. This polarisation has great relevance for the resistance to infection, which was confirmed by the limiting dilution assay and in the histological section of treated mice. Possibly, 8-HQ exhibits a direct action on parasites and also triggers the production of IFN- γ , which activates macrophages to a microbicidal state, leading to the death of parasites [48]. Furthermore, 8-HQ is structurally related to imidazoquinolinone, which is an agonist of the Toll-like receptor 7 (TLR-7), which has an immunomodulatory action, through the induction of interferons, and acts as an antineoplastic agent [39,50].

At the same time, a significant reduction in IL-4 levels was observed in all treated groups, indicating that the treatments were able to reverse the suppressive immune response observed in active disease [51,52], which is also important to achieve resistance [53]. In a previous study, it was observed that experimental animals with cutaneous leishmaniasis submitted to intralesional treatment with 8-HQ were also able to produce significant levels of IFN- γ [14], which reinforces that this molecule exhibits immunomodulatory activity in cutaneous leishmaniasis. However, it is still important to note that the topical administration of drugs is still an attractive option compared to the other routes of administration, especially in skin diseases, because such a type of treatment can bring the drug to the site of the diseased tissue, and it can also be administered in lower doses to develop a therapeutic effect. The peak plasma level of the drug is avoided, the bioavailability of the drug is increased due to the elimination of hepatic first-pass metabolism, and systemic toxicity is reduced, as well as leading to greater patient compliance by eliminating the need for frequent painful applications [54].

5. Conclusions

In conclusion, the physical characteristics of the cream demonstrated an acceptable particle size for skin permeation and creams exhibited appropriate spreadability, allowing the permeation of 8-HQ through the skin and artificial membranes. 8-HQ creams reduced the size of the lesions and the parasitic load of treated animals, as well as the inflammatory infiltrate and the density of the parasitised macrophages. This therapeutic activity was associated with an immunomodulatory activity of the molecule that stimulated the production of IFN- γ , indicating a polarised Th1 response and consequent resistance to infection. This study enables the facile extemporaneous and potentially industrial manufacture of more tolerable topical therapies for the treatment of leishmaniasis, reducing the need for hospitalisation and enabling wider access, especially to populations living in remote areas.

Author Contributions: Conceptualisation, L.F.D.P., D.R.S. and A.L.; methodology, S.K.S.d.L., Í.N.C., B.J.A., D.R.S., A.L., J.H.G.L., D.C.d.S.S., M.D.L., R.d.B.M., G.P.M., B.S.L. and L.F.D.P.; software, S.K.S.d.L., J.H.G.L., D.C.d.S.S., D.R.S., B.J.A., A.L. and L.F.D.P.; validation, S.K.S.d.L., L.F.D.P., M.D.L., J.H.G.L., R.d.B.M. and D.R.S.; formal analysis, S.K.S.d.L., L.F.D.P., M.D.L., A.L., J.H.G.L. and D.R.S.; investigation, S.K.S.d.L., L.F.D.P., D.R.S., J.H.G.L., M.D.L., A.L. and D.C.d.S.S.; resources, L.F.D.P., D.R.S., J.H.G.L. and A.L.; data curation, S.K.S.d.L., L.F.D.P., D.R.S. and A.L.; writing—original draft preparation, S.K.S.d.L. and L.F.D.P.; writing—review and editing, S.K.S.d.L., Í.N.C., B.J.A., D.R.S., A.L., J.H.G.L., D.C.d.S.S., M.D.L., R.d.B.M., G.P.M., B.S.L. and L.F.D.P.; software, S.K.S.d.L., J.H.G.L., D.C.d.S.S., D.R.S., B.J.A., A.L. and L.F.D.P.; visualisation, S.K.S.d.L., D.R.S., A.L., M.D.L., J.H.G.L., R.d.B.M. and L.F.D.P.; supervision, L.F.D.P.; project administration, L.F.D.P.; funding acquisition L.F.D.P., D.R.S., A.L., R.d.B.M., J.H.G.L. and M.D.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), grant numbers 2018/24077-6, 2021/02392-0, 2021/02789-7 and 2023/01641-1. L.F.D.P., M.D.L. and J.H.G.L. thank

CNPq for productivity grants. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001; International cooperation projects for mobility, Unión Iberoamericana de Universidades (ENF03/2017); PROPE-UNESP (05/2023); HCFMUSP-LIM50.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of the Institutional Committee of Animal Care and Use at the Medical School of São Paulo University (protocol code 1648/2022, approved: 16 March 2022).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Yadav, P.; Shah, K. Quinolines, a Perpetual, Multipurpose Scaffold in Medicinal Chemistry. *Bioorg. Chem.* **2021**, *109*, 104639. [\[CrossRef\]](#)
2. Jain, S.; Chandra, V.; Kumar Jain, P.; Pathak, K.; Pathak, D.; Vaidya, A. Comprehensive Review on Current Developments of Quinoline-Based Anticancer Agents. *Arab. J. Chem.* **2019**, *12*, 4920–4946. [\[CrossRef\]](#)
3. Gupta, R.; Luxami, V.; Paul, K. Insights of 8-Hydroxyquinolines: A Novel Target in Medicinal Chemistry. *Bioorg. Chem.* **2021**, *108*, 104633. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Albrecht, M.; Fiege, M.; Osetka, O. 8-Hydroxyquinolines in Metallo-supramolecular Chemistry. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 812–824. [\[CrossRef\]](#)
5. Oliveri, V.; Vecchio, G. 8-Hydroxyquinolines in Medicinal Chemistry: A Structural Perspective. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *120*, 252–274. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Saadeh, H.; Sweidan, K.; Mubarak, M. Recent Advances in the Synthesis and Biological Activity of 8-Hydroxyquinolines. *Molecules* **2020**, *25*, 4321. [\[CrossRef\]](#)
7. Scalse, G.; Machado, I.; Fontana, C.; Risi, G.; Salinas, G.; Pérez-Díaz, L.; Gambino, D. New Heteroleptic Oxidovanadium(V) Complexes: Synthesis, Characterization and Biological Evaluation as Potential Agents against *Trypanosoma Cruzi*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2018**, *23*, 1265–1281. [\[CrossRef\]](#)
8. Rivas, F.; Medeiros, A.; Comini, M.; Suescun, L.; Rodríguez Arce, E.; Martins, M.; Pinheiro, T.; Marques, F.; Gambino, D. Pt-Fe Ferrocenyl Compounds with Hydroxyquinoline Ligands Show Selective Cytotoxicity on Highly Proliferative Cells. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *199*, 110779. [\[CrossRef\]](#)
9. Allam, G.; Eweas, A.F.; Abuelsaad, A.S.A. In Vivo Schistosomicidal Activity of Three Novels 8-Hydroxyquinoline Derivatives against Adult and Immature Worms of *Schistosoma Mansoni*. *Parasitol. Res.* **2013**, *112*, 3137–3149. [\[CrossRef\]](#)
10. Costa Duarte, M.; dos Reis Lage, L.M.; Lage, D.P.; Mesquita, J.T.; Salles, B.C.S.; Lavorato, S.N.; Menezes-Souza, D.; Roatt, B.M.; Alves, R.J.; Tavares, C.A.P.; et al. An Effective in Vitro and in Vivo Antileishmanial Activity and Mechanism of Action of 8-Hydroxyquinoline against *Leishmania* Species Causing Visceral and Tegumentary Leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* **2016**, *217*, 81–88. [\[CrossRef\]](#)
11. Duarte, M.C.; Lage, L.M.d.R.; Lage, D.P.; Martins, V.T.; Carvalho, A.M.R.S.; Roatt, B.M.; Menezes-Souza, D.; Tavares, C.A.P.; Alves, R.J.; Barichello, J.M.; et al. Treatment of Murine Visceral Leishmaniasis Using an 8-Hydroxyquinoline-Containing Polymeric Micelle System. *Parasitol. Int.* **2016**, *65*, 728–736. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Tavares, G.S.V.; Mendonça, D.V.C.; Pereira, I.A.G.; Oliveira-da-Silva, J.A.; Ramos, F.F.; Lage, D.P.; Machado, A.S.; Carvalho, L.M.; Reis, T.A.R.; Perin, L.; et al. A Clioquinol-Containing Pluronic® F127 Polymeric Micelle System Is Effective in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in a Murine Model. *Parasite* **2020**, *27*, 29. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Tavares, G.S.V.; Mendonça, D.V.C.; Miyazaki, C.K.; Lage, D.P.; Soyer, T.G.; Carvalho, L.M.; Ottoni, F.M.; Dias, D.S.; Ribeiro, P.A.F.; Antinarelli, L.M.R.; et al. A Pluronic® F127-Based Polymeric Micelle System Containing an Antileishmanial Molecule Is Immunotherapeutic and Effective in the Treatment against *Leishmania Amazonensis* Infection. *Parasitol. Int.* **2019**, *68*, 63–72. [\[CrossRef\]](#)
14. Lima, S.K.S.d.; Jesus, J.A.; Raminelli, C.; Laurenti, M.D.; Passero, L.F.D. High Selectivity of 8-Hydroxyquinoline on *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) Species Correlates with a Potent Therapeutic Activity In Vivo. *Pharmaceutics* **2023**, *16*, 707. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Musa, A.; Khalil, E.; Hailu, A.; Olobo, J.; Balasegaram, M.; Omollo, R.; Edwards, T.; Rashid, J.; Mbui, J.; Musa, B.; et al. Sodium Stibogluconate (SSG) & Paromomycin Combination Compared to SSG for Visceral Leishmaniasis in East Africa: A Randomised Controlled Trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1674. [\[CrossRef\]](#)
16. Sundar, S.; Singh, A. Chemotherapeutics of Visceral Leishmaniasis: Present and Future Developments. *Parasitology* **2018**, *145*, 481–489. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Mazire, P.; Agarwal, V.; Roy, A. Road-map of Pre-clinical Treatment for Visceral Leishmaniasis. *Drug Dev. Res.* **2022**, *83*, 317–327. [\[CrossRef\]](#)
18. van Griensven, J.; Diro, E. Visceral Leishmaniasis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2019**, *33*, 79–99. [\[CrossRef\]](#)

19. Berbert, T.R.N.; Mello, T.F.P.D.; Wolf Nassif, P.; Mota, C.A.; Silveira, A.V.; Duarte, G.C.; Demarchi, I.G.; Aristides, S.M.A.; Lonardoni, M.V.C.; Vieira Teixeira, J.J.; et al. Pentavalent Antimonials Combined with Other Therapeutic Alternatives for the Treatment of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review. *Dermatol. Res. Pract.* **2018**, *2018*, 9014726. [CrossRef]
20. Pradhan, S.; Schwartz, R.A.; Patil, A.; Grabbe, S.; Goldust, M. Treatment Options for Leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* **2022**, *47*, 516–521. [CrossRef]
21. Sundar, S.; Singh, A. Recent Developments and Future Prospects in the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Ther. Adv. Infect. Dis.* **2016**, *3*, 98–109. [CrossRef]
22. Hamill, R.J. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs* **2013**, *73*, 919–934. [CrossRef] [PubMed]
23. Roatt, B.M.; de Oliveira Cardoso, J.M.; De Brito, R.C.F.; Coura-Vital, W.; de Oliveira Aguiar-Soares, R.D.; Reis, A.B. Recent Advances and New Strategies on Leishmaniasis Treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 8965–8977. [CrossRef] [PubMed]
24. Sundar, S.; Chakravarty, J. An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis. *Expert Opin. Pharmacother.* **2015**, *16*, 237–252. [CrossRef]
25. Sundar, S.; Chakravarty, J. Leishmaniasis: An Update of Current Pharmacotherapy. *Expert Opin. Pharmacother.* **2013**, *14*, 53–63. [CrossRef]
26. Passero, L.F.D.; Cruz, L.A.; Santos-Gomes, G.; Rodrigues, E.; Laurenti, M.D.; Lago, J.H.G. Conventional Versus Natural Alternative Treatments for Leishmaniasis: A Review. *Curr. Top. Med. Chem.* **2018**, *18*, 1275–1286. [CrossRef]
27. Sundar, S.; Mondal, D.; Rijal, S.; Bhattacharya, S.; Ghalib, H.; Kroeger, A.; Boelaert, M.; Desjeux, P.; Richter-Airijoki, H.; Harms, G. Implementation Research to Support the Initiative on the Elimination of Kala Azar from Bangladesh, India and Nepal—The Challenges for Diagnosis and Treatment. *Trop. Med. Int. Health* **2008**, *13*, 2–5. [CrossRef]
28. Sunyoto, T.; Potet, J.; Boelaert, M. Why Miltefosine—A Life-Saving Drug for Leishmaniasis—Is Unavailable to People Who Need It the Most. *BMJ Glob. Health* **2018**, *3*, e000709. [CrossRef]
29. McGwire, B.S.; Satoskar, A.R. Leishmaniasis: Clinical Syndromes and Treatment. *QJM* **2014**, *107*, 7–14. [CrossRef]
30. Srivastava, S.; Mishra, J.; Gupta, A.K.; Singh, A.; Shankar, P.; Singh, S. Laboratory Confirmed Miltefosine Resistant Cases of Visceral Leishmaniasis from India. *Parasites Vectors* **2017**, *10*, 49. [CrossRef]
31. Drugs for Neglected Diseases Initiative Target Product Profile for Cutaneous Leishmaniasis. Available online: <https://dndi.org/diseases/cutaneous-leishmaniasis/target-product-profile/> (accessed on 23 May 2023).
32. Serrano, D.R.; Gordo, M.J.; Matji, A.; González, S.; Lalatsa, A.; Torrado, J.J. Tuning the Transdermal Delivery of Hydroquinone upon Formulation with Novel Permeation Enhancers. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 167. [CrossRef] [PubMed]
33. Haq, A.; Goodyear, B.; Ameen, D.; Joshi, V.; Michniak-Kohn, B. Strat-M[®] Synthetic Membrane: Permeability Comparison to Human Cadaver Skin. *Int. J. Pharm.* **2018**, *547*, 432–437. [CrossRef] [PubMed]
34. Arce, F.J.; Asano, N.; See, G.L.; Itakura, S.; Todo, H.; Sugibayashi, K. Usefulness of Artificial Membrane, Strat-M[®], in the Assessment of Drug Permeation from Complex Vehicles in Finite Dose Conditions. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 173. [CrossRef] [PubMed]
35. Silva, I.R.; Lima, F.A.; Reis, E.C.O.; Ferreira, L.A.M.; Goulart, G.A.C. Stepwise Protocols for Preparation and Use of Porcine Ear Skin for in Vitro Skin Permeation Studies Using Franz Diffusion Cells. *Curr. Protoc.* **2022**, *2*, e391. [CrossRef]
36. Lalatsa, A.; Patel, P.V.; Sun, Y.; Kiun, C.C.; Karimi, F.; Zekonyte, J.; Emeriewen, K.; Saleh, G.M. Transcutaneous Anaesthetic Nano-Enabled Hydrogels for Eyelid Surgery. *Int. J. Pharm.* **2020**, *577*, 119003. [CrossRef]
37. Aho, J.; Hvidt, S.; Baldursdottir, S. Rheology in Pharmaceutical Sciences. In *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences*; Springer: New York, NY, USA, 2016; pp. 719–750. [CrossRef]
38. Haq, A.; Dorrani, M.; Goodyear, B.; Joshi, V.; Michniak-Kohn, B. Membrane Properties for Permeability Testing: Skin versus Synthetic Membranes. *Int. J. Pharm.* **2018**, *539*, 58–64. [CrossRef]
39. Saha, P.; Mukhopadhyay, D.; Chatterjee, M. Immunomodulation by Chemotherapeutic Agents against Leishmaniasis. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, *11*, 1668–1679. [CrossRef]
40. Pereira, B.A.S.; Alves, C.R. Immunological Characteristics of Experimental Murine Infection with Leishmania (Leishmania) Amazonensis. *Vet. Parasitol.* **2008**, *158*, 239–255. [CrossRef]
41. Bhide, S.; Shettar, A.; Repka, M.A.; Prado, R.; Kundu, S.; Richardson, N.; Murthy, S.N. Evaluating the Impact of Fatty Alcohols on Permeation of Clotrimazole from Topical Creams. *Pharm. Technol.* **2020**, *44*, 24–31.
42. Barry, B.W. Mode of Action of Penetration Enhancers in Human Skin. *J. Control. Release* **1987**, *6*, 85–97. [CrossRef]
43. Williams, A.C.; Barry, B.W. Penetration Enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 603–618. [CrossRef]
44. Bezerra-Souza, A.; Jesus, J.A.; Laurenti, M.D.; Lalatsa, A.; Serrano, D.R.; Passero, L.F.D. Nanoemulsified Butenafine for Enhanced Performance against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *J. Immunol. Res.* **2021**, *2021*, 8828750. [CrossRef] [PubMed]
45. Carvalho, A.K.; Carvalho, K.; Passero, L.F.D.; Sousa, M.G.T.; Da Matta, V.L.R.; Gomes, C.M.C.; Corbett, C.E.P.; Kallas, G.E.; Silveira, F.T.; Laurenti, M.D. Differential Recruitment of Dendritic Cells Subsets to Lymph Nodes Correlates with a Protective or Permissive T-Cell Response during Leishmania (Viannia) Braziliensis or Leishmania (Leishmania) Amazonensis Infection. *Mediators Inflamm.* **2016**, *2016*, 7068287. [CrossRef] [PubMed]
46. Suarez, E.T.; Granados-Falla, D.S.; Robledo, S.M.; Murillo, J.; Upegui, Y.; Delgado, G. Antileishmanial Activity of Synthetic Analogs of the Naturally Occurring Quinolone Alkaloid N-Methyl-8-Methoxyflindersin. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0243392. [CrossRef]

47. Passero, L.F.D.; Marques, C.; Vale-Gato, I.; Corbett, C.E.P.; Laurenti, M.D.; Santos-Gomes, G. Histopathology, Humoral and Cellular Immune Response in the Murine Model of Leishmania (Viannia) Shawi. *Parasitol. Int.* **2010**, *59*, 159–165. [[CrossRef](#)]
48. Sacks, D.; Noben-Trauth, N. The Immunology of Susceptibility and Resistance to Leishmania Major in Mice. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 845–858. [[CrossRef](#)]
49. Rolão, N.; Cortes, S.; Gomes-Pereira, S.; Campino, L. Leishmania Infantum: Mixed T-Helper-1/T-Helper-2 Immune Response in Experimentally Infected BALB/c Mice. *Exp. Parasitol.* **2007**, *115*, 270–276. [[CrossRef](#)]
50. Belda, W.; Criado, P.R.; Passero, L.F.D. Successful Treatment of Chromoblastomycosis Caused by Fonsecaea Pedrosoi Using Imiquimod. *J. Dermatol.* **2020**, *47*, 409–412. [[CrossRef](#)]
51. Sundar, S.; Reed, S.G.; Sharma, S.; Mehrotra, A.; Murray, H.W. Circulating T Helper 1 (Th1) Cell- and Th2 Cell-Associated Cytokines in Indian Patients with Visceral Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1997**, *56*, 522–525. [[CrossRef](#)]
52. Louis, J.; Himmelrich, H.; Parra-Lopez, C.; Tacchini-Cottier, F.; Launois, P. Regulation of Protective Immunity against Leishmania Major in Mice. *Curr. Opin. Immunol.* **1998**, *10*, 459–464. [[CrossRef](#)]
53. Ajdary, S.; Alimohammadian, M.H.; Eslami, M.B.; Kemp, K.; Kharazmi, A. Comparison of the Immune Profile of Nonhealing Cutaneous Leishmaniasis Patients with Those with Active Lesions and Those Who Have Recovered from Infection. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 1760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zhang, Z.; Tsai, P.-C.; Ramezanli, T.; Michniak-Kohn, B.B. Polymeric Nanoparticles-Based Topical Delivery Systems for the Treatment of Dermatological Diseases. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2013**, *5*, 205–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.