



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM SOCIEDADE, AMBIENTE E
SAÚDE –COSAS

**Avaliação da resposta Linfoproliferativa *in vitro* com células
mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com
Leishmaniose cutânea antes e após tratamento**

ERIKA OLIVEIRA DA SILVA

Manaus

2022

ERIKA OLIVEIRA DA SILVA

Avaliação da resposta Linfoproliferativa *in vitro* com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com Leishmaniose cutânea antes e após tratamento

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco, PhD;

Coorientadoras: Paula Figliuolo Borges, PhD
Thais Tibery Espir, PhD

Manaus

2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586a Silva, Erika Oliveira da
Avaliação da resposta linfoproliferativa in vitro com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com Leishmaniose cutânea antes e após tratamento / Erika Oliveira da Silva . 2022
102 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco
Coorientadora: Paula Figliuolo Borges
Coorientadora: Thaís Tibery Espir
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. Resposta imune celular. 3. Citocinas. 4. Tratamento alternativo. I. Franco, Antonia Maria Ramos. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que esteve sempre comigo, me dando força e sendo o meu sustento, a ele toda honra e toda glória sejam dadas;

À minha mãe Adelaide, meu exemplo de mulher, de fé, de perseverança e resiliência, que embora tenha passado por tantos percalços, sempre me nutriu de palavras positivas e sempre me estimulou a nunca desistir e a sempre erguer a cabeça. Como tu és admirável mãe, como és forte e como és sábia!

Ao meu irmão Marconi, que desde pequena sempre me incentivou a ler e estudar e investiu na minha educação de todas as formas possíveis, sendo essencial para minha formação;

À minha família, irmãos e irmãs que contribuíram, cada um do seu jeito e que foram fundamentais em todas as etapas da minha vida. Vocês são os melhores irmãos que Deus poderia me dar. Sou agraciada com uma família tão linda e tão unida.

À minha orientadora Antonia Franco pela oportunidade de participar da equipe do Laboratório de Leishmaniose desde a iniciação científica, onde eu aprendi muito não só sobre a pesquisa, mas sobre a vida. Obrigada pelo incentivo, motivação e conhecimento. A senhora é um exemplo de pesquisadora e gestora;

À minha Coorientadora Paula Borges, que foi muito mais que isso, foi uma amiga, estando comigo em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho, apoiando, dando força e compartilhando conhecimentos que levarei comigo por toda minha vida profissional e pessoal. Pessoa humana, de uma sensibilidade ímpar, companheira de todas as horas, que não abandona e não deixa a deriva. Com você compartilhei uma das maiores dádivas, a graça de gestar em meu ventre vida, meu Enrico e, assim como eu você, carregando no seu ventre a linda Isabel, que foram/são nosso combustível;

À minha coorientadora Thaís Espir, pela parceria do mestrado ao doutorado, compartilhando seus conhecimentos de imunologia e apoiando o desenvolvimento da pesquisa;

À Maricleide Naiff, por ter aberto as portas do laboratório para mim e por todo suporte que me foi dado em fases tão importantes na pesquisa;

Aos meus ex alunos de iniciação científica, Sávio Moura e Rafaela Benício, que foram primordiais para auxiliar na fase experimental do projeto. Tenho muito orgulho de vocês e tenho certeza do grande potencial de cada um;

Ao Vlademir Casas por toda paciência e parceria que teve comigo nessa longa caminhada;

As minhas amigas da Paraíba, que mesmo distantes estiveram tão presentes. Em especial a Samara, pessoa de luz, ser humano inigualável, que se alegra com as conquistas dos outros e se compadece com as dores, mas sempre disposta a proferir palavras de fé e esperança, te amo.

À minha amiga Ingrid Fonseca e sua mãe Luci, que me ajudaram nos momentos em que mais precisei e que foram fundamentais para hoje eu conquistar essa etapa final;

Aos amigos e técnicos do Laboratório por todo suporte;

À coordenação Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada pela acessibilidade;

À FAPEAM pelo suporte financeiro;

À banca examinadora por terem aceitado o convite de participar da defesa da tese;

Aos portadores de leishmaniose que fizeram parte deste projeto, que são o principal motivo e razão do desenvolvimento dessa pesquisa. Que possamos olhar, antes da doença, para os pacientes que são negligenciados;

Enfim, a todos que colaboraram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho, meu muito obrigada.

EPÍGRAFE

Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.

(Josué 1:9)

RESUMO

A leishmaniose Tegumentar é uma doença infecciosa não contagiosa, considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada (DTN). A escassez de investimentos em pesquisas científicas e de inovação para esta doença ainda permeiam a sociedade. A Terapêutica preconizada envolve o uso dos antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), embora diversos efeitos adversos graves sejam relacionados. Além disso, A compreensão da patogênese da leishmaniose ainda representa um grande desafio devido à diversidade de vetores e espécies do parasito envolvidas no processo infeccioso. Nesse sentido, o conhecimento da interação celular frente a esses agentes e o entendimento dos mediadores imunológicos envolvidos na infecção, são fundamentais para desenvolvimento de novos métodos terapêuticos. Desse modo, esse trabalho teve como objetivo avaliar a linfoproliferação e produção de citocinas do sobrenadante de culturas de PBMC estimuladas por bioativos e antígenos solúveis de *Leishmania* (SLA) por meio de ensaios *in vitro*. A linfoproliferação foi avaliada frente a estímulos de bioativos obtidos da *Libidibia férrea*, o Extrato Metanólico (LFME) (600 $\mu\text{g/mL}$), e a fração diclorometânica (DCM), assim como frente a complexo de cobre (281,4 $\mu\text{g/mL}$), Glucantime[®] (100 $\mu\text{g/mL}$), SLA de *L. amazonensis* (100 $\mu\text{g/mL}$), SLA de *L. guyanensis* (100 $\mu\text{g/mL}$) e Phytohemagglutinin - PHA (10 $\mu\text{g/mL}$) utilizando *BrdU Cell Proliferation ELISA Kit* após 72h de incubação. A quantificação das citocinas IL-6, IL-8 e IL-1b foi realizada por BD[™] Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit. Os resultados demonstraram que os bioativos avaliados podem potencializar o sistema imune, podendo ser candidatos futuros a tratamentos alternativos ou utilizados como terapia combinada. Quanto aos antígenos solúveis de leishmania, ambos induziram forte linfoproliferação e aumento dos níveis de citocinas inflamatórias, porém significância estatística só houve frente ao antígeno solúvel de *Leishmania guyanensis*.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar Americana; Resposta imune celular; Citocinas; Tratamento alternativo; Antígenos solúveis de leishmania

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis is a non-contagious infectious disease, considered by the World Health Organization (WHO) as a neglected tropical disease (NTD). and even investments in scientific research and innovation for this disease affect society. Therapeutics involves the use of pentavalent antimonials (Sb^{5+}), although several adverse effects are related. Furthermore, understanding the pathogenesis of leishmaniasis still represents a great challenge due to the diversity of vectors and species of the parasite involved in the infectious process. In this sense, the knowledge of the interaction with these agents and the understanding of the immunological mediators involved in the action are fundamental for the development of new therapeutic methods. Thus, this work aimed to evaluate the lymphoproliferation and production of cytoprokinines from the supernatant of PBMC cultures stimulated by bioactives and soluble *Leishmania* stimulants (SLA) through *in vitro* assays. The lymph4 complex front against bioactive stimuli obtained from Libidibition Ferre, the LF, $\mu\text{g/mL}$ complex front, and the attribution to copper/something (281 $\mu\text{g/mL}$), Glucantime® (100 $\mu\text{g/mL}$), *L. amazonensis* SLA (100 $\mu\text{g/mL}$), *L. guyanensis* SLA (100 $\mu\text{g/mL}$) and Phytohemagglutinin - PHA (10 $\mu\text{g/mL}$) using the BrdU Cell Proliferation ELISA Kit after 72h incubation. The quantification of IL-6, IL-8 and IL-1b cytokines was performed by BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit. The results can be used as a combination therapy. As for the antigens, both soluble *Leishmania* induced strong lymphoproliferation and increased levels of inflammatory cytokines, but there was only an increase in significance against the soluble *Leishmania guyanensis*.

Keywords: American Cutaneous Leishmaniasis; Cellular immune response; cytokines; Alternative treatment

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Peças de cerâmicas pré-colombianas (400 a 900 anos d.C.) retratando as lesões de leishmaniose cutâneo-mucosa.	15
Figura 2- Classificação das apresentações clínicas da Leishmaniose cutânea. Forma localizada (A); Forma disseminada (B); Forma recidiva cútis (C) e Forma difusa (D).	18
Figura 3- Formas promastigota (a) e amastigota (b) de <i>Leishmania</i> sp.	19
Figura 4- Ciclo da <i>Leishmania</i> sp. no vetor e no humano.	19
Figura 5- Casos de Leishmaniose Tegumentar, segundo sexo e faixa etária. Brasil, 2020.	21
Figura 6- Esquema simplificado da Resposta Imune da Leishmaniose.	26
Figura 7- (A) Folhas e flores da <i>Libidibia ferrea</i> ; (B) Fruto maduro; (C) Sementes; (D) Frutificação da Espécie vegetal.	30
Figura 8- Modelo de placas utilizado nos experimentos de linfoproliferação.	41
Figura 9- Fluxograma das etapas do projeto, desde a coleta do material biológico até os experimentos in vitro.	43

CAPÍTULO I

Figure 1- Clinical aspects of lesions in male patients primoinfected with cutaneous leishmaniasis (CL) treated in Rio Preto da Eva, Amazonas, Brazil, during March to May 2020. IM: Registration code.	47
Figure 2- PBMC lymphoproliferation of participants evaluated in Rio Preto da Eva, Amazonas state, Brazil, during March and May 2020. A - primoinfected patients with cutaneous leishmaniasis; B - post-treatment cutaneous leishmaniasis patients; C - healthy people without cutaneous leishmaniasis. DCM: dichloromethane fraction; PHA: phytohemagglutinin. Vertical lines represent standard error. *Horizontal lines represent statistical significance between treatments ($p < 0.005$)	47

CAPÍTULO II

Figure 1- PBMC lymphoproliferation of volunteers treated in Rio Preto da Eva, AM, Brazil, during March and May 2020. (A) PBMCs treated with Cu(I); (B) PBMCs treated with LFME. Cu(I): copper complex; LFME: <i>Libidibia ferrea</i> methanol extract; BT: before treatment; AT: after treatment; NC: negative control; PHA: phytohemagglutinin. Vertical lines represent the standard deviation; horizontal lines represent statistical significance between treatments ($p < 0.05$).	56
Figure 2- Levels of IL-8, IL-6, IL-1 β (pg/mL) in the supernatants of PBMC cultures extracted from patients before and after conventional treatment for CL and from healthy individuals (negative control). (A-C) PBMCs sensitized by treatment with Cu(I), (D-F) LFME and (G-I) DCM. The means (horizontal lines) are shown for each group of patients. CL: Cutaneous	

leishmaniasis; Cu(I): copper complex; DCM: *Libidibia ferrea* fraction; LFME: *Libidibia ferrea* methanol extract.....57

CAPÍTULO III

Figura 1. Linfoproliferação de PBMC de voluntários atendidos em Rio Preto da Eva, AM, Brasil, durante março e maio de 2020. PBMCs sensibilizadas com antígenos solúveis de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*. SLA: Antígenos solúveis; PHA: fitohemaglutinina; Linhas verticais representam o desvio padrão; Linhas horizontais representam a significância estatística entre tratamentos ($p < 0,005$).....75

Figura 2. Níveis de IL-8, IL-6, IL-1 β (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de PBMCs extraídas de pacientes voluntários antes e após tratamento convencional para LTA e em indivíduos sadios (controle negativo), atendidos em Rio Preto da Eva, AM, Brasil, durante março e maio de 2020. PBMCs sensibilizadas com antígenos solúveis de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*. As médias (linhas horizontais) são mostradas para cada grupo de pacientes. SLA: antígenos solúveis.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil e Macrorregiões, 2010 a 2020.	20
Tabela 2- Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Região Norte e Unidades Federadas, 2016 a 2020.	22
Tabela 3- Estratificação de risco da Leishmaniose Tegumentar por município de maior infecção.....	23
Tabela 4- Casos de Leishmaniose Cutânea na Região Norte e em cidades da região metropolitana de Manaus, do período de 2011 a 2020.....	24
Tabela 5- Protocolo terapêutico para tratamento da LC no Brasil, segundo as recomendações do Ministério da Saúde (2017).....	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AM - Amazonas

CD4⁺ - Marcador de Linfócito T CD4

PBMCs - Células mononucleares do sangue periférico

DC - Células Dendríticas

DCM - Fração Diclorometano

DNDi - Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas

DTNs - Doenças Tropicais Negligenciadas

HUB - Hospital Universitário de Brasília

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC - Concentração inibitória

IFN- γ - Interferon-gama

IgE - Imunoglobulina E

iNOS - óxido nítrico-sintase induzida

INPA - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

IRA - Insuficiência renal aguda

LC - Leishmaniose cutânea

LCC - Leishmaniose recidiva cútis

LCD - Leishmaniose cutânea difusa

LCL - Leishmaniose cutânea localizada

LD - Leishmaniose cutânea disseminada

LFME - Extrato Diclorometano

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

MIE - Membro inferior esquerdo

MMII - Membros inferiores

MMSS - Membros superiores

MS - Ministério da Saúde

MSE - Membro superior esquerdo

NAD - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NK - Células natural-killer

NNN - Neal, Novy e Nicolle

NO - Óxido Nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão fosfato-salino

PHA - Fitohemaglutinina

QIE - Quadrante inferior esquerdo

QSE - Quadrante superior esquerdo

RPMI 1640 - Rosewell Park Memorial Institute medium 1640

SLA - Antígeno solúvel de *Leishmania*

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

Th1 - Subgrupo funcional de linfócito T auxiliar do tipo 1

Th17 - Subgrupo funcional de linfócito T auxiliar do tipo 17

Th2 - Subgrupo funcional de linfócito T auxiliar do tipo 2

TNF- α - Fator de necrose tumoral alpha

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Breve histórico da Leishmaniose	15
2.2	Estigmatização social pela Leishmaniose	16
2.3	Aspectos gerais da Leishmaniose	16
2.4	Ciclo de vida do parasito	18
2.5	Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar no Brasil	20
2.6	Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Região Norte do Brasil	21
2.7	Resposta imune na Leishmaniose cutânea	24
2.8	Tratamento da Leishmaniose Tegumentar	26
2.9	Drogas alternativas para o tratamento da Leishmaniose cutânea	29
2.10	<i>Libidibia ferrea</i>	30
2.11	Complexo de cobre	32
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral	34
3.2	Objetivos Específicos	34
4	METODOLOGIA GERAL	35
4.1	Etapas da tese	35
4.2	Participantes voluntários	35
4.3	Área de estudo	36
4.4	Critérios de inclusão e exclusão dos grupos de pacientes com Lc	36
4.4.1	Critérios de inclusão	36
4.4.2	Critérios de remoção da pesquisa	37
4.4.3	Critérios de exclusão da pesquisa	37
4.4.4	Critérios de inclusão nos grupos de indivíduos sadios	38
4.5	Procedimentos experimentais	38
4.5.1	Pesquisa de amastigotas	38
4.5.2	Cultivo para <i>Leishmania</i>	38
4.5.3	Coleta de sangue	39
4.6	Manejo dos dados	39
4.7	Preparo dos antígenos	39
4.8	Obtenção de PBMC	40

4.9	Preparação das placas	40
4.10	Bioativos utilizados para estimulação de PBMC <i>in vitro</i>	41
4.11	Análise de citocinas do sobrenadante	42
4.12	Leitura e análise estatística	42
4.13	Fluxograma das etapas de coleta	42
5	CAPÍTULO 1	44
6	CAPÍTULO 2	51
7	CAPÍTULO 3	68
8	DISCUSSÃO GERAL	85
9	CONCLUSÃO GERAL	88
10	PERSPECTIVAS	89
	REFERÊNCIAS	90
	ANEXOS	101

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) referem-se a um grupo de patologias crônicas debilitantes e, muitas vezes, estigmatizantes que afetam, principalmente, os menos favorecidos, que vivem em áreas remotas de ambientes urbanos e rurais tendo como principal característica a marca da pobreza, a desnutrição, o subdesenvolvimento e baixa imunidade (KOBETS *et al.*, 2012; SOUZA, 2014; ROSÁRIO *et al.*, 2017). Essas doenças foram elencadas em um grupo de 20 DTN e afetam mais de um bilhão de pessoas no mundo, principalmente pacientes suscetíveis a maior vulnerabilidade social, estando as prevalentes na América Latina e pelo menos seis destas no Brasil, dentre elas as Leishmanioses, cujos agentes etiológicos são protozoários do gênero *Leishmania* (WHO,2021; NASSER *et al.*,2017).

No Brasil, foram descritas sete espécies causadoras da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (V.) shawi* que foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2017). Essas espécies destacam-se por sua ampla distribuição e ocorrem em todos os Estados da Federação. Desses, o Estado do Pará é o mais afetado, seguido pelo Amazonas, onde somente no ano de 2020, teve 1.563 novos casos notificados, destacando-se com as mais altas taxas de transmissão os municípios de Manaus (621 casos), Presidente Figueiredo (226 casos) e Rio Preto da Eva (221 casos) (TANURE *et al.*,2020; SINAN, 2021).

Devido à diversidade de espécies de *Leishmania*, de vetores e reservatórios, a doença apresenta particularidades no que diz respeito às manifestações clínicas e até mesmo à resposta terapêutica (BRASIL,2017). No que tange os aspectos clínicos, a leishmaniose cutânea (LC) é caracterizada por lesões únicas ou múltiplas, ulceradas na pele com bordas bem delimitadas, sendo compreendida como a forma clássica da LTA (CARDOSO, 2015). Classificada pelo Ministério da Saúde (2017) em cutânea localizada (LCL), cutânea disseminada (LD), recidiva cútis (LCC) e cutânea difusa (LCD).

Com relação aos aspectos imunológicos, embora em humanos a resposta imune ainda não seja bem caracterizada, como é em camundongos, sabe-se que a diferença entre susceptibilidade e resistência envolve uma rede de cooperação entre citocinas, moléculas co-estimulatórias, nível de expansão de células T e relação parasito-hospedeiro (REIS *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2021) Nesse sentido, em resposta ao parasito, as células T CD4⁺ auxiliares podem se diferenciar em subpopulações de células efetoras que produzem distintos grupos de

citocinas. A expressão da citocina IL-12 direciona o perfil Th1, relacionado à inflamação através da produção de citocinas como IL-2, IFN- γ e TNF- α , que são cruciais para resistência ao parasito. Por outro lado, as citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 que são características de Th2 são associadas à progressão da doença (BABALOO *et al.*, 2020; GHOS *et al.*, 2020).

Entretanto, apesar de ser relacionado ao perfil Th1 a proteção contra a infecção, a cura da Leishmaniose é um processo dinâmico que envolve interações entre seus componentes, para manutenção da homeostase do organismo. Pois quando não modulado, pode promover o desenvolvimento de formas crônicas e mais graves da doença (LAKHAL-NAOUAR,2015; ESPIR *et al.*, 2014).

Quanto ao protocolo terapêutico, os antimoniais pentavalentes, o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) compõem a primeira linha. Dentre os de segunda linha, inclui-se a anfotericina B, a pentamidina, a miltefosina e a pentoxifilina. Entretanto, o Ministério da saúde (MS) passou a considerar as formas clínicas, a espécie envolvida e a disponibilidade de medicamentos para indicação do fármaco (BRASIL, 2017). Apesar destes apresentarem resultados satisfatórios, a maioria destes fármacos são administrados via parenteral, com aplicação dolorosa e prolongada, o que favorece a baixa adesão, abandono ao tratamento e conseqüentemente o aparecimento de cepas resistentes. Somado a esses fatores, associado a toxicidade, estas drogas também podem ocasionar efeitos colaterais e adversos graves, como problemas renais, hepáticos, pancreáticos e cardíacos (BRASIL, 2017; ULIANA *et al.*, 2018).

Dada a problemática, vários pesquisadores vêm buscando ao longo do tempo tratamentos alternativos para a LTA, que proporcionem melhor adesão e que tenham baixa toxicidade. A cerca disso, os produtos naturais vêm sendo considerados pela OMS como prioridade, por apresentam uma fonte importante de novas moléculas bioativas com potencial farmacêutico (WHO,2011). Nesse contexto, a *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.), planta utilizada na medicina popular brasileira, vem sendo apontada como espécie vegetal de interesse terapêutico por demonstrarem diversas propriedades medicinais, como atividade hipoglicêmica, antiproliferativa em células de câncer colorretal, atividade cicatrizante, atividade antileishmania, entre outros (ALMEIDA *et al.*,2021).

Outra possibilidade são os íons metálicos, que desempenham várias funções biológicas, sendo essencial para homeostase humana. Além das funções biológicas, os metais tem sido estudados quanto a sua atividade antileishmania, onde apresentou resultados promissores e com baixa toxicidade (CAHGAS *et al.*,2021). Através da aplicação da química de coordenação, Gandin *et al.*, (2014) demonstraram que a regulação adequada dos níveis de Cu(I) associado a

natureza do ligante, possibilita o melhor direcionamento, equilíbrio e transporte do metal de maneira estável para as células.

Assim, sendo a leishmaniose uma doença multifacetada e considerando as limitações existentes quanto ao tratamento e necessidade de melhor compreender a dinâmica entre parasito e hospedeiro, o presente projeto teve como objetivo analisar bioativos frente a PBMCs de pacientes com LC *in vitro* bem como, avaliar a linfoproliferação e dosagem de citocinas frente a antígenos solúveis de *leishmania* (SLA), afim de fornecer subsídios para novas estratégias para o tratamento e compreensão da doença.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Breve histórico da Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença que acompanha a humanidade desde a antiguidade, havendo relatos e descrições na literatura desde o século I d.C. (LAINSON, 1997; CAMARGO e BARSINK, 2003). Na América do Sul, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C., feitas pelos índios do Peru, onde continham características de deformidades de lábios e narizes [Figura 1]. Outro registro histórico importante foi múmias com lesões de pele e mucosas, características da espúndia, hoje conhecida como leishmaniose cutânea-mucosa (LAISON E SHAW, 1988). Séculos depois, missionários espanhóis, do século XVI, escreveram sobre o “mal do nariz” que acometia os povos situados nos vales quentes do Peru (LAINSON *et al.*, 1988).

Figura 1- Peças de cerâmicas pré-colombianas (400 a 900 anos d.C.) retratando as lesões de leishmaniose cutâneo-mucosa.



Fonte: www.dbbm.fiocruz.br

No Brasil, os primeiros relatos de leishmaniose foram de Moreira e Cerqueira que, em 1885, descreveram lesões cutâneas idênticas ao botão do oriente. Em 1908, durante a construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, em São Paulo, ocorreram numerosos casos da doença, principalmente na cidade de Bauru, tornando-a conhecida como úlcera-de-Bauru (SILVA, 2009). Já em 1909 a Leishmaniose foi identificada como problema sanitário grave, onde a doença irrompeu em áreas consideradas livres da doença, em função de mudanças ambientais, migrações humanas e crescimento urbano caótico (BENCHMOL *et al.*, 2019).

2.2 Estigmatização social pela Leishmaniose

Na literatura, o estigma é descrito como a manifestação de atitudes discriminatórias contra aqueles que apresentam características diferentes, relacionando-se ainda com a concepção do “próximo”, assim como ao “eu” (WAILOO, 2006). Goffman (1963), define estigma como: “O fenômeno pelo qual um indivíduo com um atributo profundamente desacreditado por sua sociedade é rejeitado como resultado do atributo. Nesse contexto, muitas doenças vêm ocasionando estigmatização, a exemplo destas as DTN, que além de causarem danos físicos, cognitivos e socioeconômicos, também são consideradas causadoras de grande estigma social, pelo agravamento das lesões com danos irreversíveis, podendo levar a exclusão social, baixa autoestima e afetar a qualidade de vida dos acometidos (MACKEY *et al.*, 2014; GÓMEZ *et al.*, 2020).

O estudo de Reithinger *et al.* (2005), realizado por meio de entrevistas com 360 pessoas, em cinco distritos de Cabul, Afeganistão, demonstrou que a população local excluía da vida comunitária as pessoas acometidas por leishmaniose cutânea. Isso ocorreu diante das crenças sociais afegãs sobre a doença, como por exemplo a transmissão por contato físico pessoa a pessoa [n = 86] ou por meio do compartilhamento de refeições e utensílios domésticos [n = 26].

Outro estudo que corrobora com este achado foi o de Gómez *et al.* (2020), que através do uso de questionário com número amostral de 92 pacientes, observaram que 25,5% das pessoas acometidas pela leishmaniose relataram sofrimento psicológico por ser portador da LC. Dentre os fatores sociais que mais afetam a vida do paciente com LC, a combinação dos sintomas e sentimentos (VARES *et al.*, 2013; RANAWAKA *et al.*, 2014), e o convívio interpessoal no meio profissional e escolar foram descritos como os mais afetados (TOLEDO *et al.*, 2013).

Desse modo, embora a leishmaniose cutânea raramente evolua para óbito, produz um impacto negativo na vida cotidiana, com consequências psicológicas e sociais que afetam a qualidade de vida do indivíduo afetado, sendo também aspectos motivadores para procura de remédios caseiros (BEDOYA *et al.*, 2017; NEVES *et al.*, 2019).

2.3 Aspectos gerais da Leishmaniose

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária, não contagiosa, causada por diferentes protozoários do gênero *Leishmania*, que pertencem à ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae que afeta cerca de 12 milhões de pessoas em cerca

de 98 países (NEVES, 2016; IKEOGU *et al.*, 2020). Os vetores transmissores da infecção ao homem são fêmeas de flebotomíneos, insetos hematófagos da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Plhebotomine, gênero *Lutzomyia* e *Plhebotomus*. Estes são conhecidos popularmente como mosquito-palha, cangalhinha ou birigui (GALATI *et al.*, 2017).

Sua epidemiologia está relacionada a fatores ambientais e comportamentais podendo ocorrer tanto no ambiente silvestre como urbano. A maioria das infecções ocorrem principalmente como zoonoses entre animais silvestres, geralmente roedores, sendo o homem um hospedeiro acidental. Todavia, os ciclos de transmissão variam de acordo com a região geográfica e envolvem uma diversidade de espécies de parasito, vetores e hospedeiros considerados reservatórios naturais (RIBEIRO; MORAES; KATAGIRI, 2018; BRASIL, 2017).

Durante seu ciclo de vida, a *Leishmania* apresenta dois estágios distintos: as formas promastigotas e as formas amastigotas. As formas amastigotas são encontradas nos hospedeiros vertebrados parasitando células do sistema fagocítico mononuclear especialmente em macrófagos dos hospedeiros mamíferos, possuindo formato arredondado sem flagelo livre; e as formas promastigotas são formas extracelulares, flageladas e móveis, encontradas no tubo digestivo dos insetos vetores (TEIXEIRA *et al.*, 2013; GULL, 2017).

Após o contágio a evolução clínica pode apresentar diferentes características clínicas, patológicas e imunológicas, sendo a LC a forma mais prevalente, acometendo principalmente as áreas mais expostas, como membros superiores, membros inferiores e face (BRASIL, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2016). As diferentes formas clínicas, dependem da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro. Classicamente apresenta-se sob duas formas: leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa, que podem apresentar diferentes manifestações clínicas e exibir polimorfismo, com espectro de gravidade dos sinais e sintomas variável. (BRASIL, 2017). O Ministério da Saúde (2017) classifica a LC em:

- ✓ **Forma Localizada:** A lesão é geralmente do tipo úlcera, com tendência à cura espontânea e apresenta boa resposta ao tratamento, podendo ser única ou múltipla. A lesão é geralmente do tipo úlcera, com tendência à cura espontânea e apresenta boa resposta ao tratamento, podendo ser única ou múltipla [Figura 2 A];
- ✓ **Forma disseminada:** múltiplas lesões papulares, de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais envolvendo com frequência a face e o tronco [Figura 2 B];

- ✓ **Forma recidiva cútis:** caracteriza-se por ativação da lesão nas bordas, após cicatrização da lesão, mantendo-se o fundo com aspecto cicatricial [Figura 2 C];
- ✓ **Forma difusa:** Constitui uma forma clínica rara e grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* [Figura 2 D].

Figura 2- Classificação das apresentações clínicas da Leishmaniose cutânea. Forma localizada (A); Forma disseminada (B); Forma recidiva cútis (C) e Forma difusa (D).

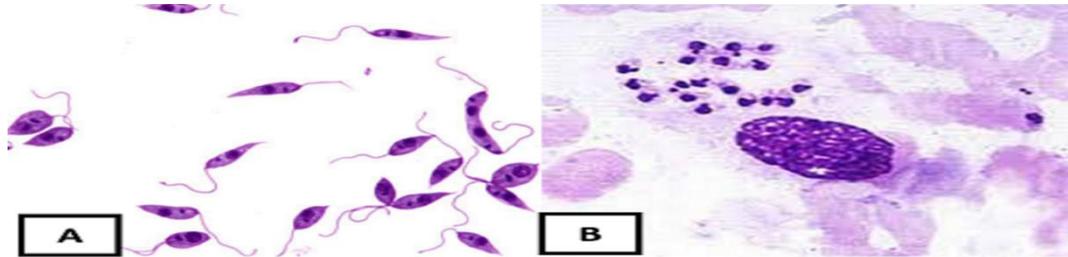


Fonte: BRASIL,2017.

2.4 Ciclo de vida do parasito

A *Leishmania* apresenta um ciclo de vida complexo, conseguindo se adaptar tanto no hospedeiro vertebrado como no hospedeiro invertebrado, apresentando resistência a diversos fatores como, mudanças de temperatura, pH e disponibilidade de oxigênio (BESTEIRO *et al.*, 2007; JAMARILLO, 2014). As manifestações clínicas da LTA são bastante variáveis e dependem de fatores relacionados ao hospedeiro e ao parasito (CERUTTI *et al.*,2017). O parasito é digenético e apresenta duas morfologias distintas: uma forma flagelada, a promastigota, infectante e presente no inseto vetor e outra forma com flagelo não aparente, a amastigota, que está presente no hospedeiro vertebrado (Oliveira,2019), cujas estruturas gerais estão apresentadas na Figura 3.

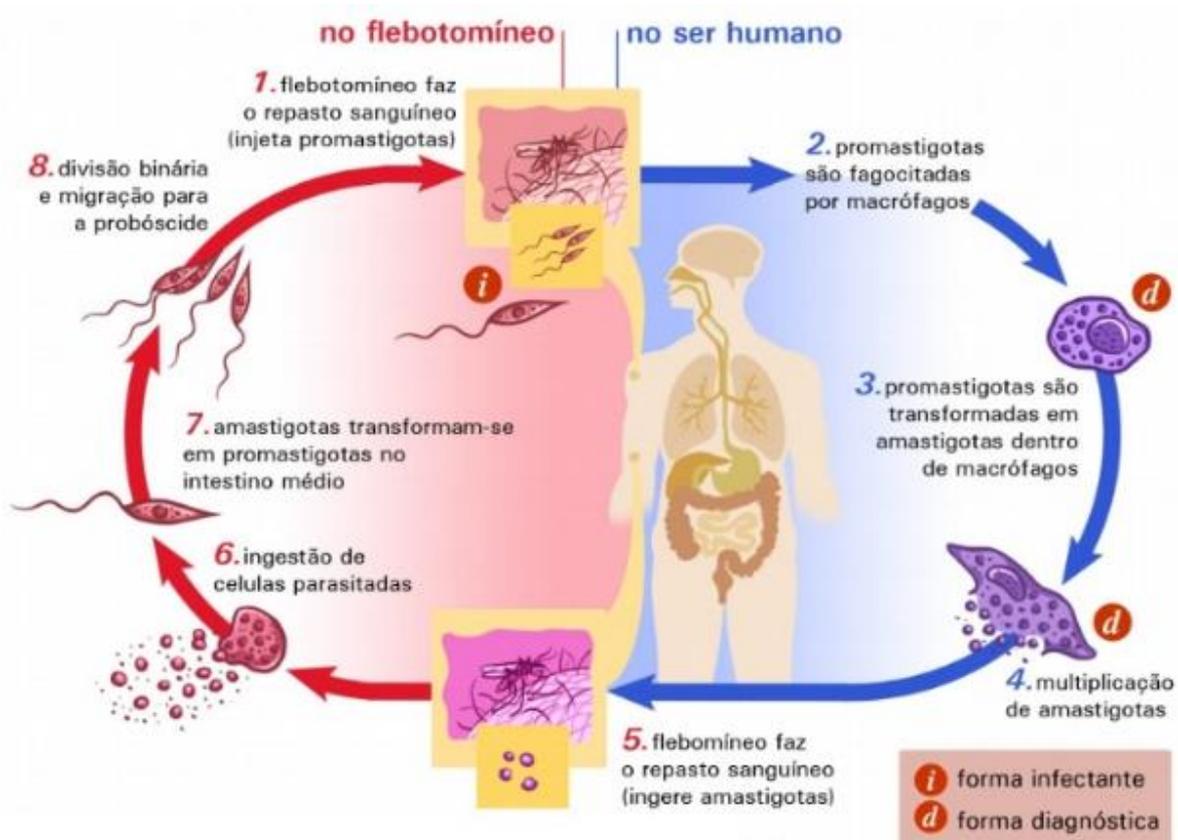
Figura 3- Formas promastigota (a) e amastigota (b) de *Leishmania* sp.



Fonte: <http://enfermagem-sae.blogspot.com/2009/04/leishmaniose-visceral-ou-calazar.html>. Acesso: 28/05/2022.

O ciclo biológico da leishmaniose inicia quando a fêmea do flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado e ingere células com formas amastigotas do parasito. Dentro do tubo digestório do inseto vetor ocorre a lise dessas células, liberando as amastigotas que assumem rapidamente a forma promastigota procíclica, as quais se multiplicam por divisão binária [Figura 4] (FLORES, 2017).

Figura 4- Ciclo da *Leishmania* sp. no vetor e no humano.



Fonte: <http://bioligadosblog.blogspot.com>

2.5 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar no Brasil

Em 1909, foram observados os primeiros registros de leishmanias no Brasil, através de úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas, características da Leishmaniose Tegumentar (LT), que apareceram em trabalhadores que atuavam na construção de rodovias no interior de São Paulo (BRASIL, 2022). Desde então, a LT vem apresentando uma expansão geográfica no Brasil, com relato de casos em todas as Unidades Federadas, e seu padrão epidemiológico tem apresentado alterações quanto à sua transmissão e um crescimento exponencial do número de casos até 2020 (TANURE *et al.*, 2020; TEMPONI *et al.*, 2018).

No Brasil, entre os anos de 2016 e 2020, foram registrados 78.566 novos casos de LT (Tabela 1), com média de 15.713 casos/ano (BRASIL, 2022). Somente no ano de 2020, foram notificados 16.432 casos de LT, correspondendo a região Norte por 7.312 casos, Nordeste por 2.853 casos, Centro-Oeste por 2.444 casos, Sudeste por 2.148 casos e Sul por 191 casos (Tabela 1).

Tabela 1- Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil e Macrorregiões, 2010 a 2020.

Região	2016	2017	2018	2019	2020
Região Norte	5.075	7.832	7.519	6.620	7.312
Região Nordeste	3.166	4.264	3.717	3.070	2.853
Região Sudeste	1.221	1.545	1.646	2.006	2.148
Região Sul	212	180	158	172	191
Região Centro-Oeste	1.974	2.421	2.086	2.362	2.444
Brasil	12.690	17.528	16.432	15.484	16.432

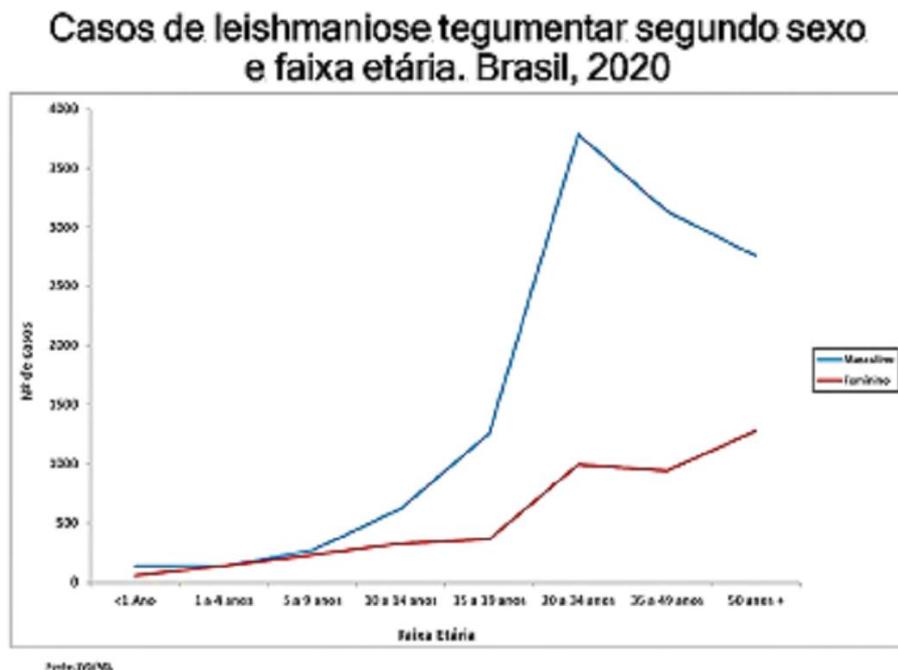
Fonte: SINAN/SVS/MS, 2021.

As regiões Norte e Nordeste apresentaram os maiores números de casos de LT no ano de 2020 (BRASIL, 2021), além de serem responsáveis 65% do total de notificações do país entre 2016 e 2020, com um total de 34.358 e 17.070 casos, respectivamente (Tabela 1). Aproximadamente 58% dos casos confirmados no Norte do país estão concentrados nos estados do Pará e Amazonas, e no Nordeste, 95,73% do total de casos foram notificados pelos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Pernambuco (BRASIL, 2019; MELO *et al.*, 2020; BRASIL,

2021). Na região Sudeste, o estado de Minas Gerais apresentou maior número de infecções, correspondendo a cerca de 81% (6.966) dos casos entre os anos de 2016 e 2020. No mesmo período, na região Centro-Oeste, o estado do Mato Grosso correspondeu 82% (9.273) dos casos. Por sua vez, a região Sul apresentou o menor número de casos notificados de todo país, com 913 entre todos os estados, sendo o São Paulo o com menos número de notificações, com 5 casos (BRASIL, 2021).

Ao observar o número de casos de LT no ano de 2020, segundo sexo e faixa etária (Figura 1), verifica-se que há uma maior incidência no sexo masculino, principalmente naqueles com idade de 20 a 34 anos e 35 a 49 anos. Em estudo de Almeida *et al.* (2021), que buscou verificar o perfil epidemiológico da LT na região de Ji-Paraná, Rondônia, observaram que 85,7% (90/105) dos casos positivos eram do sexo masculino e apenas 14,3% (15/105) do sexo feminino. Corroborando com os achados do estudo supracitado, Oliart-Guzmán *et al.* (2013) e Teles *et al.* (2015), identificaram um percentual elevado de infecções em indivíduos do sexo masculino e, além disso, evidenciaram que este número expressivo se deu em decorrência desses indivíduos morarem em áreas rurais ou desenvolverem atividades laborais em ambientes florestais e/ou agrícolas.

Figura 5- Casos de Leishmaniose Tegumentar, segundo sexo e faixa etária. Brasil, 2020.



2.6 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Região Norte do Brasil

Entre 2010 e 2012, foram registradas 68.855 ocorrências de LT no Brasil, sendo a região Norte a área de maior endemicidade da doença, com 40% do total de casos do país (TELES *et al.*, 2015), além de apresentar o mais elevado coeficiente de incidência, com 46,4 casos para cada 100.000 habitantes (BRASIL, 2022).

Ao observar o índice de casos de LT por Unidades Federadas da região Norte entre 2016 e 2020 (Tabela 2), verifica-se que o Pará é o estado com maior número de infecções com 14.089 casos, seguido do Amazonas (7.123 casos), Acre (4.304 casos), Rondônia (4.134 casos), Amapá (2.354 casos), Tocantins (1.443 casos) e Roraima (911 casos).

Tabela 2- Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Região Norte e Unidades Federadas, 2016 a 2020.

Região e UF	2016	2017	2018	2019	2020
Brasil	12.690	17.528	16.432	15.484	16.432
Região Norte	5.075	7.832	7.519	6.620	7.312
Acre	800	936	786	834	948
Amapá	623	485	580	204	462
Amazonas	828	1.865	1.684	1.183	1.563
Pará	1.649	3.231	3.081	3.131	2.997
Rondônia	851	959	881	719	724
Roraima	89	153	293	181	195
Tocantins	235	203	214	368	423

Fonte: SINAN/SVS/MS, 2021.

Apesar do estado do Pará apresentar o maior número de infecções da região Norte, dois municípios do Amazonas correspondem aos mais endêmicos do Brasil (Tabela 3), com estratos de muita intensidade, sendo esses: Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva, que tiveram entre 2018 a 2020 uma média de casos de 235,33 e 221,00, respectivamente. Além desses, os

municípios de Serra do Navio (PA), Xapuri (AC), Assis Brasil (AC) também estavam entre aqueles com estratos muito intensos.

Ressalta-se que o município de Assis Brasil (10°56'21.9"S 69°33'47.3"W), localizado no estado do Acre, possui um contexto especial quanto ao perfil epidemiológico e de controle da LT, pois está situado em uma região de fronteira com Peru/Madre de Dios e Bolívia/Pando (OLIART-GUZMÁN *et al.*, 2013; TELES *et al.*, 2015), que são áreas endêmicas, principalmente para forma cutânea.

Outros municípios da região Norte também apresentaram um elevado número de infecções por LT, como o Medicilândia (PA), Uruará (PA), Almeirim (PA), Sena Madureira (AC), dentre outros. É importante lembrar que na Região Norte, especificamente na calha norte do Rio Amazonas, há uma grande concentração de casos de indivíduos com lesões múltiplas de LT, que normalmente são causadas por *Leishmania (Viannia) guyanensis* e, por vezes, associadas a repetidas picadas de *Lutzomyia umbratilis* (BRASIL, 2017).

Tabela 3- Estratificação de risco da Leishmaniose Tegumentar por município de maior infecção.

UF	Município	Média de Casos	Média de Incidência	Estrato
AM	Presidente Figueiredo	235,33	649,30	Muito Intenso
AM	Rio Preto da Eva	221,00	662,97	Muito Intenso
BA	Taperoá	136,33	647,73	Muito Intenso
AP	Serra do Navio	47,67	890,01	Muito Intenso
BA	Wenceslau Guimarães	118,33	559,46	Muito Intenso
AC	Xapuri	109,00	562,49	Muito Intenso
AC	Assis Brasil	57,67	775,21	Muito Intenso
BA	Valença	177,33	184,12	Intenso
PA	Medicilândia	110,33	348,56	Intenso
BA	Teolândia	73,33	491,97	Intenso
MT	Tesouro	26,00	681,96	Intenso
PA	Uruará	120,00	263,87	Intenso
PA	Almeirim	99,33	291,32	Intenso
AC	Sena Madureira	110,67	240,78	Intenso

Fonte: Brasil, 2018 a 2020.

Na Amazônia brasileira, especialmente no estado do Amazonas, entre os municípios mais afetados estão Manaus, Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva (Tabela 1). A

predominância da forma cutânea da doença está entre os indivíduos do gênero masculino e entre agricultores, na faixa etária de maior produtividade profissional (NAIFF JUNIOR, 2007), sendo as espécies de *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. naiffi* as principais causadoras desta infecção nos municípios supracitados (FIGUEIRA *et al.*, 2014).

Tabela 4- Casos de Leishmaniose Cutânea na Região Norte e em cidades da região metropolitana de Manaus, do período de 2011 a 2020.

Região e UF	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Região Norte	8.615	10.196	8.407	10.387	8.939	5.075	7.832	8.188	7.123	8.060
Amazonas	2.282	2.246	1.429	1.081	1.645	856	1200	1.773	1.300	1.690
Manaus	752	304	341	448	495	158	218	661	510	621
Presidente Figueiredo	213	325	180	307	249	158	106	219	68	226
Rio Preto da Eva	203	420	228	249	247	111	200	152	44	221

Fonte: site Tabnet - DATASUS. Acesso em 17/05/2022.

2.7 Resposta imune na Leishmaniose cutânea

A *Leishmania* spp. no hospedeiro vertebrado é um parasito intracelular obrigatório que, após ser transmitido durante o repasto sanguíneo de flebótomos fêmeas infectadas, se multiplica nas células do sistema fagocítico mononuclear de mamíferos susceptíveis (BRASIL,2017).

A eliminação do parasito depende da coordenação de diferentes mecanismos imunológicos da resposta imune inata e adaptativa. Assim como também, da capacidade do parasito modular e/ou evadir as defesas imunológicas do hospedeiro (PRATES *et al.*, 2011; IKEOGU *et al.*,2020).

Na resposta imune inata, ocorre mediação principalmente por macrófagos, células dendríticas, células NK e neutrófilos, sendo os macrófagos as principais células infectadas. A interação dessas células viabiliza a modulação da resposta imune adaptativa (LOPES *et al.*,2020; TOMIOTTO-PELLISSIER *et al.*,2020).

Um dos primeiros mecanismos de defesa do sistema imune inato é o sistema complemento, que está pronto para reconhecer e eliminar os microrganismos invasores, através de proteínas opsonizadoras e anafilatoxinas potentes. A ativação desse sistema pode ocorrer por três vias: a clássica, a alternativa e a via das Lectinas (SAAB *et al.*, 2020).

No entanto, os parasitos evoluíram com mecanismos de escape ao ataque do complemento, para sobrevivência no hospedeiro. Um desses fatores ocorre através da Glicoproteína 63 (gp63) presente na saliva dos vetores que atua como inibidor induzindo a resistência ao complemento através da inativação do fragmento C3b, que leva ao aumento do componente inativo do complemento (C3bi). A inativação do sistema complemento pode ser usada como mecanismo de escape do parasito, pois possibilita sua entrada em células hospedeiras sem causar ativação (SHAO *et al.*, 2019; SCHMIDT *et al.*, 2016; MARQUES *et al.*, 2012).

Estudos utilizando os modelos de infecção por *L. major* demonstraram que os neutrófilos atuam como espécie de “cavalo de Tróia”, uma vez que, ao fagocitarem o parasito, tornam-se incapazes de eliminá-lo através de seus mecanismos microbicidas e passam a liberar quimiocinas responsáveis por atrair e induzir a sua própria fagocitose por macrófagos ativados, permitindo assim a entrada silenciosa do parasito nessas células (JOHN e HUNTER, 2008).

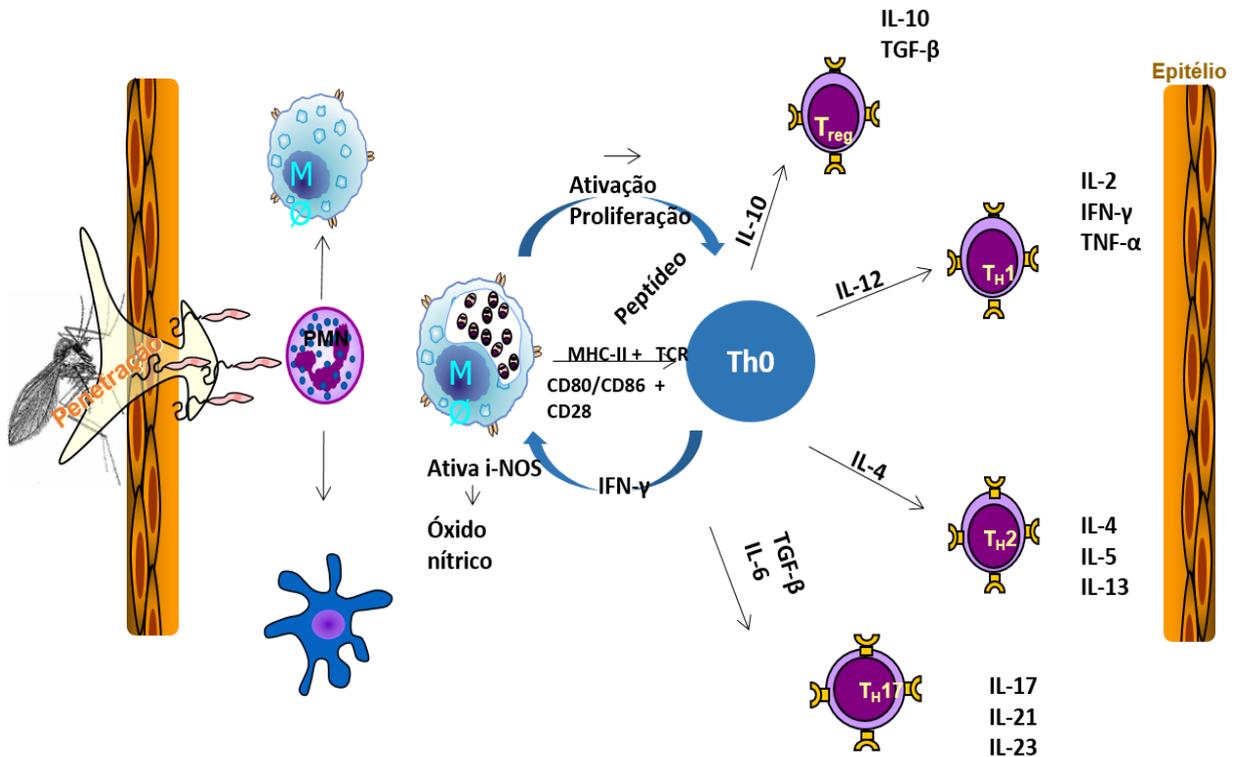
Após a fagocitose das promastigotas pelos macrófagos, o parasito internaliza seu flagelo passando a apresentar a forma amastigota, multiplicando-se por divisão binária e por conseguinte, levando ao rompimento da célula e liberação dos parasitos que irão infectar outros macrófagos (NATALE *et al.*, 2016).

A resposta do hospedeiro à infecção é regulada pela produção de citocinas e perfil celular. A produção de TNF- α e IL-12 polariza a resposta imune à secreção de citocinas de perfil Th1, como IFN- γ , que ativam o macrófago a produzir Óxido nítrico (NO) e matar a *Leishmania* infectante. Esse mecanismo de defesa é fundamental no estágio inicial da infecção para prevenir doenças ou impedir a disseminação do protozoário (KALAVI *et al.*, 2021; MACHADO, 2019).

Além dos neutrófilos, os fagócitos mononucleares interagem com *Leishmania* spp. desempenhando um papel essencial na promoção da resistência ao parasito, principalmente através da produção de IL-12 levando à diferenciação de células T CD4+ em células T do tipo Th1 (CAMPOS *et al.*, 2017). Essa via de ativação geralmente induz um processo inflamatório intenso, levando à síntese de iNOS, induzida por citocinas como o IFN- γ , responsável pela produção de óxido nítrico (NO), levando à destruição dos parasitos (OLEKHNOVITCH; BOUSSO, 2015). Em contrapartida, se a resposta for mediada por um padrão Th2 (IL-4 e IL-

13) permitirá que, dependendo da espécie do parasito, ocorra a disseminação local e a progressão da doença [Figura 6] (SILVESTRE; ESTAQUIER, 2016).

Figura 6- Esquema simplificado da Resposta Imune da Leishmaniose.



Fonte: Adaptação de Alexander; Brombacher, 2012.

Em estudo realizado por Espir *et al.* (2014), foi evidenciado que a infecção por *L. amazonensis* apresenta menor concentração de citocinas pró-inflamatórias, regulatórias e de perfil Th17 quando comparado à infecção pelas outras duas espécies, *L. guyanensis* e *L. naiffi*, demonstrando assim a variabilidade da resposta imune de acordo com a espécie infectante de *Leishmania*.

O equilíbrio e as mudanças dinâmicas das citocinas podem controlar ou prever o curso clínico, desempenhando papéis diferentes na imunopatogênese da infecção por *Leishmania* (ABDOLI e GHAFARIFAR, 2016).

2.8 Tratamento da Leishmaniose Tegumentar

O arsenal terapêutico indicado pelo Ministério da saúde para leishmaniose ainda é muito restrito, dependendo, quase exclusivamente, dos quimioterápicos representados pelos

antimoniais pentavalentes, o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) e o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime[®]) e pelo medicamento de segunda escolha, anfotericina B. (SINGH *et al.*, 2016).

A ação dos antimoniais baseia-se por meio de duas vias, através da estimulação de macrófagos infectados afim de provocar estresse oxidativo no parasito intracelular e também pela ação direta do antimônio reduzido (Sb^{3+}) no equilíbrio redox do microrganismo (DECUYPERE *et al.*, 2012). Sua administração é por via parenteral por longo período, o que favorece baixa adesão pelos pacientes que residem em áreas remotas, e além do mais, seu efeito adverso mais grave é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular (BRASIL,2017).

A Anfotericina B atua inibindo o metabolismo de ergosterol presente na membrana plasmática do parasito. E apesar de efetiva no tratamento da Leishmaniose visceral, com toxicidade mais baixa quando encapsulada em lipossomas, é um medicamento muito caro, o que dificulta o esquema terapêutico, além de não ser apropriado para outras formas da doença (SANTOS *et al.*,2008).

Nesse contexto, inúmeras dificuldades são relacionadas a doença, como: onerosidade dos tratamentos atuais, indisponibilidade de vacinas, disponibilidade limitada de medicamentos e resistência do parasito (AMLABU *et al.*, 2020; ZULFICAR *et al.*,2017; AL-SALEM WS *et al.*,2016).

Embora o antimoniato de meglumina seja utilizado até os dias atuais como droga de primeira escolha, o Ministério da Saúde modificou as recomendações para o tratamento, passando a considerar a forma clínica, a espécie infectante de *Leishmania*, a resposta ao tratamento, a avaliação risco-benefício e a disponibilidade do medicamento a ser utilizado (BRASIL, 2017), conforme consta na Tabela 2.

Tabela 5- Protocolo terapêutico para tratamento da LC no Brasil, segundo as recomendações do Ministério da Saúde (2017).

Forma Clínica	Espécie	Primeira escolha	Segunda escolha
LCL	<i>Leishmania</i> spp. exceto <i>L. guyanensis</i>	Antimoniato de meglumina EV ou IM e Anfotericina B lipossomal.	Desoxicolato de anfotericina B e Isotionato de pentamidina.
LCL	<i>L. guyanensis</i>	Isotionato de pentamidina e Anfotericina B lipossomal.	Antimoniato de meglumina e Desoxicolato de Anfotericina B.
LD	<i>Leishmania</i> spp.	Antimoniato de meglumina EV ou IM e Anfotericina B lipossomal.	Desoxicolato de anfotericina B.
LCD	<i>Leishmania</i> spp.	Isotionato de pentamidina.	Antimoniato de meglumina, Desoxicolato de anfotericina B e Anfotericina B lipossomal.
LM	<i>Leishmania</i> spp.	Antimoniato de meglumina (EV ou IM) associado à pentoxifilina, Antimoniato de meglumina (EV ou IM) e Anfotericina B lipossomal.	Desoxicolato de anfotericina B e isotionato de pentamidina.

Fonte: SVS/MS (2017). Legenda: EV (Endovenoso); IM (Intramuscular)

2.9 Drogas alternativas para o tratamento da Leishmaniose cutânea

Embora os medicamentos utilizados possuam eficácia no tratamento contra a leishmaniose, aspectos como os efeitos adversos, a via de administração parenteral, o grau de toxicidade entre outros diversos problemas relacionados aos tratamentos disponíveis à população pode muitas vezes levar ao abandono do tratamento e/ou recidiva da doença. Nesse sentido, novas alternativas terapêuticas vêm sendo estudadas, entre elas, há o potencial uso de complexos metálicos no combate aos parasitos, como, a *Leishmania* sp. e o *Trypanosoma cruzi* (MARTINS, 2011).

Na literatura, encontra-se um grande número de estudos que relatam a complexação de cátions metálicos, estabelecendo a estrutura do complexo formado e apontando o efeito dos íons metálicos na atividade antibacteriana (VIEIRA *et al.*, 2009).

A natureza do ligante e a sua capacidade em formar um quelato com o metal favorecem a atividade biológica destes complexos metálicos. Além disso, os complexos catiônicos são mais eficazes, sendo que a natureza do contra-íon também parece interferir na atividade (ROCHA, 2011).

Dentre os metais utilizados como fármacos, o cobre tem chamado bastante atenção, devido as suas propriedades nas aplicações médicas e químicas e atividade contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (CHAGAS *et al.*, 2021).

Quanto ao uso de produtos naturais, Oryan (2014) verificou que compostos derivados de plantas apresentaram resultados satisfatórios em experimentos *in vitro* e *in vivo* para a leishmaniose visceral e cutânea. Por conseguinte, o pentalinosterol mostrou uma significativa redução da carga parasitária em modelos experimentais (GUTIÉRREZ-REBOLLEDO; DRIER-JONAS e JIMÉNEZ-ARELLANES, 2017).

Em um estudo pioneiro, Wyrepkowski *et al.* (2017) apresentaram resultados promissores no tratamento da leishmaniose tegumentar, a partir de experimentos *in vitro* e *in vivo* contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, utilizando extratos metanólicos extraídos do fruto de *Libidibia ferrea*. Posteriormente, estas frações diclorometano do extrato metanólico de *L. ferrea* foram incorporadas em um sistema microemulsionado, para avaliação tópica *in vivo*. Após o tratamento dos animais, foi observado o controle do desenvolvimento da lesão e redução da carga parasitária, sem diferença significativa quando comparada ao tratamento padrão, com Glucantime® (JENSEN, 2017).

Tendo em vista a necessidade de tratamentos alternativos para a leishmaniose, o Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, ao longo dos anos, vem realizando estudos

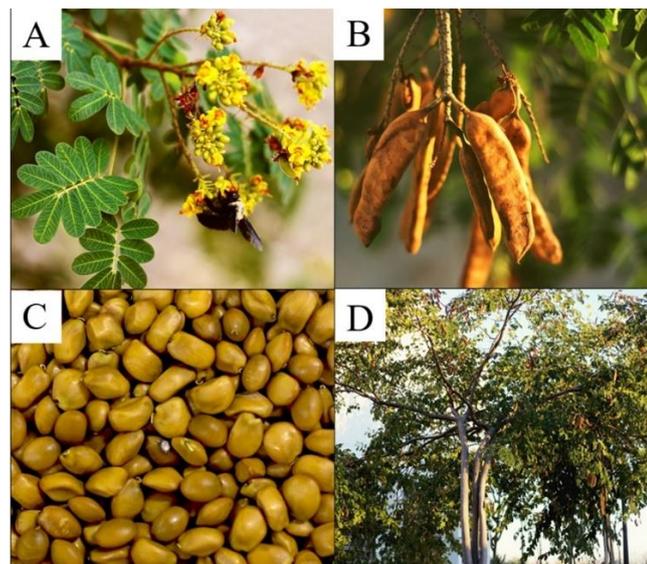
pré-clínicos com diferentes substâncias inovadoras, como complexos metálicos e produtos naturais, a fim de otimizar e proporcionar terapias de menores danos aos pacientes acometidos pela doença.

2.10 *Libidibia ferrea*

A *Libidibia ferrea*, conhecida popularmente como “pau-ferro”, “jucá” ou “jucaína”, “ibirá-obi”, “imirá-itá” é uma matéria prima vegetal promissora e de imensuráveis fins terapêuticos, sendo relatada como uma valorosa fonte para uso medicinal por populações que habitam a Amazônia (SAWADA *et al.*, 2014; HOLANDA, 2021). Comumente utilizada como tratamento alternativo pela população, é encontrada em abundância na flora das regiões Norte e Nordeste do Brasil (HOLANDA, 2021).

A planta pertence ao reino *Plantae*, filo *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Fabales*, família *Fabaceae* e gênero *Libidibia* (QUEIROZ, 2009). Possui pequenas flores de cor amarela, que formam cachos, folhas compostas e frutos do tipo legumes, de cor marrom, com sementes escuras (Figura 7) (SOUZA; LORENZI, 2002).

Figura 7- (A) Folhas e flores da *Libidibia ferrea*; (B) Fruto maduro; (C) Sementes; (D) Frutificação da Espécie vegetal.



Fonte: NEMA (2019).

Cada uma de suas partes é utilizada para extração e preparos, de forma a serem utilizadas como tratamento de diversas enfermidades. Dentre as principais formas de uso por parte da

população, estão: chá, lambedor (planta aquecida com mel) ou garrafada (planta imersa em álcool) (MAIA, 2004; AGRA *et al.*, 2007).

Estruturas diferentes de um mesmo indivíduo de *L. ferrea* podem apresentar uma grande variação quanto aos tipos e teor de metabólitos secundários presentes e, conseqüentemente podem apresentar uma ação biológica diferente. Por este motivo, as folhas e os galhos do jucá, disponíveis para a coleta em qualquer período do ano, diferente dos frutos, também foram avaliados quanto à ação de seus extratos (hexânico e metanólico) frente à infecção por *L. (L.) amazonensis* (Wyrepkowski, 2015).

Em virtude a seu abundante uso por parte da população e dos diversos relatos acerca do seu efeito terapêutico, a *L. ferrea* foi inserida na Lista de Plantas Medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS-REINISUS) e no Formulário Nacional de Ervas Medicinais (BRASIL, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2013; DROZINO *et al.*, 2017).

Dentre os principais efeitos medicinais do extrato da *Libidibia ferrea*, destaca-se a ação anti-inflamatória, analgésica, atividade nociceptiva, contribuição no reparo tecidual, atividade antitumoral (Nakamura *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2016; Falcão *et al.*, 2019).

Através da análise química do extrato de *L. ferrea*, Falcão *et al.* (2019) encontraram ácidos gálico e elágico, além de galato de metila, que possuem atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante em células *in vivo* e *in vitro* (Ferreira *et al.*, 2019). O ácido gálico impede a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa e IL-1, liberadas por macrófagos e neutrófilos, resultando na redução da migração de células inflamatórias, logo, atua reduzindo a inflamação, a vasodilatação e formação de eritema e edema. Dessa forma, foi evidenciado a participação da *L. ferrea* na diminuição da dor (FREITAS *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2016; Falcão *et al.*, 2019).

Pereira *et al* (2016), analisaram a ação do extrato preparado a partir das cascas das árvores de *L. ferrea* no tratamento de feridas cutâneas em ratos. O estudo mostrou significativa redução da hiperemia e exsudato seroso, além de elevar o número de animais com tecido remodelado. Segundo o autor, a principal explicação para esse efeito se dá pela atenuação da inflamação e nocicepção.

Há ainda estudos relacionados a atividade antileishmania da *Libidibia ferrea*. Em estudo *in vitro* com *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*, Comandolli-Wyrepkowski *et al.* (2017), testaram os extratos hexânicos (Hex) e metanólicos (MeOH) de *L. ferrea*, onde o último mostrou maior ação contra a *L. amazonensis*.

O potencial farmacológico dos produtos naturais é frequentemente guiado por ensaios biológicos, sendo de extrema importância a busca por alternativas no tratamento de doenças

negligenciadas (IOSET, 2008). Assim, Jensen (2020), com o intuito de avaliar o potencial químico e leishmanicida do extrato FrutosMeOH e a fração DCM de *Libidibia ferrea* através de sistemas *in vivo*, por formulações tópicas, observou eficácia no tratamento de hamsters infectados com *L. amazonensis*. Quando o extrato metanólico foi então incorporado a uma formulação do tipo hidrogel, em concentrações mais elevadas (10%) e com tratamento mais prolongado, apresentou maior eficácia na redução da carga parasitária dos animais infectados por *L. (L.) amazonensis*.

A fração DCM do extrato FrutoMeOH de *L. ferra* também foi utilizada para preparar uma microemulsão por via tópica, a qual mostrou-se eficaz e segura para o tratamento em animais experimentalmente infectados com o controle da progressão do volume das lesões dos hamsters infectados, redução da carga parasitária e infiltrados inflamatórios moderados, que foram avaliados por técnicas histopatológicas (JENSEN, 2017).

2.11 Complexo de cobre

O Cobre (Cu) é o elemento 29 da tabela periódica, pertencendo ao subgrupo dos metais de transição, chamado *metais de cunhagem*. Ocupa o vigésimo quinto lugar de elementos encontrados em massa na crosta terrestre e possui três estados de oxidação acessíveis: Cu⁰, Cu⁺ e o Cu²⁺, os dois últimos são encontrados nos sistemas biológicos (COTTON e WILKINSON, 1971; SABINO, 2014).

É um micronutriente primordial aos organismos que vivem em ambientes ricos em oxigênio. Biologicamente ativo, atua no metabolismo de enzimas fundamentais, participa das reações de transferência de elétrons, transporte de oxigênio e transporte ou armazenamento do próprio metal (FIORINI, 2008; TISATO, 2010).

Alvo de muitos estudos, o cobre recebeu destaque a partir de 1928, após Hart constatar a importância da suplementação de cobre para combater a anemia ferropriva. Contudo, há relatos de que os egípcios, em 3.000 a.C, já o utilizavam para esterilizar a água para consumo (SHILS, 1994; SILVA, 2008). Por conseguinte, o cobre tornou-se alvo de diversos estudos, no intuito de elucidar as funções terapêuticas do elemento.

Há estudos que indicam atividade antitumorais relacionadas ao elemento. Em estudo de Gandi *et al.* (2012, 2014), foi observado que complexos de cobre (I) inibiram o crescimento de células tumorais *in vitro* e *in vivo*. Marzano *et al.* (2007) e Porchia *et al.* (2013) também desenvolveram estudos referentes a atividade anti-proliferativa de células cancerígenas e apresentaram resultados semelhantes.

Pesquisas sobre a atividade leishmanicida do complexo de cobre também vêm sendo realizadas afim de contribuir com a formulação de novos tratamentos para a doença. Portas (2012) e Chagas *et al.* (2021) utilizaram de diferentes complexos de cobre para avaliar a atividade antileishmania *in vitro* contra diferentes espécies de *Leishmania* spp. Chagas *et al* (2021) avaliaram o efeito *in vitro* do complexo de cobre (I) em formas evolutivas de *Leishmania* spp., onde o elemento apresentou atividade leishmanicida contra *Leishmania (L.) amazonensis*.

Resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores, onde os complexos de cobre apresentaram atividade *in vitro* contra as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) infantum* (Navarro *et al*, 2003; Maffei, 2009; Ramírez-Macías, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a linfoproliferação e dosagem de citocinas *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com Leishmaniose cutânea.

3.2 Objetivos Específicos

Capítulo 1: Avaliação da linfoproliferação de células mononucleares de pacientes com leishmaniose cutânea frente a *Libidibia ferrea*:

- ✓ Avaliar a resposta linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) antes e após tratamento e de indivíduos sadios frente a Fração diclorometânica (DCM).

Capítulo 2: Resposta imune celular humana frente a bioativos com potencial antileishmania:

- ✓ Avaliar a indução da resposta linfoproliferativa e concentração de citocinas induzidas por bioativos de origem vegetal e inorgânica, através de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com leishmaniose cutânea.

Capítulo 3: Resposta Imune *in vitro* de pacientes com Leishmaniose cutânea estimulados por frações antigênicas solúveis de *Leishmania*:

- ✓ Analisar a resposta imune celular *in vitro* de antígenos solúveis de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis* de pacientes com Leishmaniose cutânea.

4 METODOLOGIA GERAL

4.1 Etapas da tese

Os resultados apresentados na tese foram divididos em três capítulos, de acordo com os objetivos e progresso dos resultados. O projeto se dividiu em etapas. Primeiro, foi realizada atividade em campo, através do deslocamento da equipe de pesquisadores e técnicos até o município de Rio Preto da Eva (AM) para atendimento da população infectada com LC em uma Unidade Básica de Saúde. Neste momento, foi realizada a coleta de material biológico (sangue e escarificação da lesão). Para cada paciente, foi aplicado um questionário epidemiológico, afim de identificar a distribuição dos casos e os condicionantes do processo saúde/doença. Também foi realizado exame clínico céfalo-podálico, a fim de avaliar as características da(s) lesão(ões) e os sinais vitais do paciente que aceitaram participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

A equipe que realiza os procedimentos possui formação específica e habilitação para realizar os procedimentos de coleta de material do paciente (sangue e escarificação). Os procedimentos foram realizados conforme padrões de qualidade exigidos, com material estéril e em ambiente adequado para a realização do atendimento e procedimento com os pacientes.

Posteriormente, todo material foi levado ao Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) para o armazenamento e processamento das amostras. Foram realizados testes de diagnóstico parasitológico em meio de cultivo e infecção de hamsters para acompanhar o crescimento dos parasitos. Além disso, foram realizados testes imunológicos no Laboratório de Fungos Comestíveis do INPA e na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) para avaliar a resposta imune frente aos diferentes aos bioativos e frações antigênicas.

4.2 Participantes voluntários

Foram atendidos neste projeto um total de 30 indivíduos (n=30), os quais foram divididos em três grupos, sendo eles: dez indivíduos primoinfectados sem tratamento prévio, dez pacientes após tratamento com Glucantime[®] (Controle positivo), onde foi estabelecido um tempo mínimo de 30 dias e máximo de 12 meses da ocorrência da cicatrização total da(s) lesão(ões) e dez indivíduos sadios (Controle negativo).

Os diagnósticos dos casos suspeitos de leishmaniose foram baseados nos dados epidemiológicos e exames clínicos, associados com a positividade de um dos exames laboratoriais.

4.3 Área de estudo

A cidade de Rio Preto da Eva, Amazonas, foi criada na década de 1960. Faz parte da Região Metropolitana de Manaus e é situada próxima ao Km 80 da Rodovia AM-010 (3°07'06"S, 59°W), distando 57,5 Km² da capital do Estado (Manaus). A população de Rio Preto da Eva é formada por 30.530 pessoas e apresenta 5.813 Km² de área territorial, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). A cobertura vegetal é de floresta tropical úmida de terra-firme, apresentando grande diversidade na fauna e flora. O clima do município é tropical, com temperatura média anual oscilando em torno dos 26 °C, com precipitação pluviométrica superior a 2.000 mm/ano e umidade relativa superior a 80%.

O trabalho foi realizado na Unidade Básica de Saúde (UBS) Edinaide Lopes da Costa, localizada na Rua Gonçalves Dias S/N, local onde os pacientes buscam atendimento para o diagnóstico e tratamento da LC.

4.4 Critérios de inclusão e exclusão dos grupos de pacientes com LC

4.4.1 Critérios de inclusão

Foram atendidos pacientes do gênero masculino ou feminino, com dezoito anos de idade completos ou mais, portadores de LC, seguindo os critérios clínicos e parasitológicos especificados abaixo.

Quadro 2 – Critérios utilizados como parâmetros para inclusão de pacientes nos experimentos *in vitro*.

Critérios de Inclusão	
Portadores de Leishmaniose cutânea	
Gênero	Masculino
	Feminino
Idade	> 18 anos
Aspectos Clínicos	População oriunda da Amazônia
	Casos suspeitos ou confirmados de LC
	Ambos os gêneros
	Clínica compatível com LC
	Qualquer tempo de doença
	Concessão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
	Autóctone da Amazônia
Aspectos parasitológicos	Visualização de amastigotas no exame direto, e/ou;
	Visualização de promastigostas na cultura, e/ou;
	Aparecimento de lesão após isolamento

4.4.2 Critérios de remoção da pesquisa

Os participantes voluntários foram informados que poderiam pedir para sair do projeto a qualquer momento, sem que houvesse qualquer ônus ou prejuízo para os mesmos.

4.4.3 Critérios de exclusão da pesquisa

Foram excluídos desse estudo todos os indivíduos que não preencheram os critérios de inclusão definidos acima ou que apresentaram:

- ✓ Qualquer doença sistêmica significativa crônica ou aguda que possa interferir nos resultados dos métodos propostos;
- ✓ Diagnóstico conhecido de infecção por HIV ou outras imunodeficiências ou uso de imunossupressores;
- ✓ Gestantes.

4.4.4 Critérios de inclusão nos grupos de indivíduos sadios

Foram incluídos na pesquisa pacientes do gênero masculino ou feminino que não possuíam aspectos clínicos de desenvolvimento de lesões causadas por *Leishmania* spp., assim como descrito abaixo:

- ✓ População oriunda da região Metropolitana de Manaus;
- ✓ Ausência de lesão cutânea ou outro aspecto clínico de Leishmaniose;
- ✓ Ambos os gêneros;
- ✓ Concessão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.5 Procedimentos experimentais

4.5.1 Pesquisa de amastigotas

Os esfregaços foram realizados a partir da escarificação da borda interna da úlcera ou da lesão utilizando-se lâminas de bisturi estéril ou escarificador. Com o material biológico obtido, foram feitas distensão em lâminas de microscopia previamente limpas, desengorduradas e secas. Após a confecção do esfregaço, as lâminas foram coradas com Kit Panótico rápido.

4.5.2 Cultivo para *Leishmania*

Amostras da borda da lesão de cada paciente foram inoculadas em meios de cultivo NNN – Neal, Novy e Nicolle (água sangue modificado) e RPMI, e incubadas entre 24 °C e 26

°C. Após o quinto dia já pode ser encontradas formas promastigotas do parasito, entretanto a cultura foi mantida até um mês sob observação antes da liberação do resultado negativo.

4.5.3 Coleta de sangue

Foi feita a coleta de cerca de 10 mL de sangue venoso periférico através de punção venosa do antebraço, das veias cefálica, mediana cubital e basílica por meio do uso de seringa de 10 mL. O sangue foi armazenado em tubos vacutainer de 10 mL (com Heparina), tanto para os pacientes com LC quanto para os indivíduos sem infecção por *Leishmania* (controle negativo= CN). O sangue coletado foi utilizado para obtenção de células para os ensaios imunológicos.

4.6 Manejo dos dados

Os dados de todas as fichas clínicas foram registrados em formulários, preenchidos em duas vias, uma via ficou no centro onde o paciente foi atendido e a outra no laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas no INPA. Os dados foram transferidos para um banco de dados em formato eletrônico, realizando dupla entrada por digitadores independentes. Foi checada a consistência entre os bancos obtidos por meio da dupla entrada de dados e as inconsistências foram corrigidas tendo como documento fonte o formulário em papel. Finalizada esta etapa, 10% das fichas clínicas foram sorteadas para confrontar os dados com os dados eletrônicos para assegurar que a taxa de erro tenha sido menor que 1%.

4.7 Preparo dos antígenos

Os antígenos solúveis utilizados nos ensaios de estimulação celular foram obtidos a partir de massa parasitária de formas promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. guyanensis* (MHO/BR/75/IM4147). O protocolo para a obtenção dos antígenos consistiu em uma centrifugação a 4.400 rpm da massa parasitária por 15 minutos, seguida de lavagens do sedimento com PBS (Tampão fosfato-salino). Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspensionado em solução salina e adicionado inibidores de protease. A extração dos antígenos foi realizada por meio de choques térmicos com congelamento e descongelamento, seguida de nova centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos para a aquisição do sobrenadante e desprezo do sedimento.

O volume final de solução de antígeno foi 100 μL , aliquotados em pequenos volumes. O preparado dos antígenos foi analisado quanto ao teor de proteína total pelo método de Bradford (1976) modificado por Read e Northcote (1981), conforme protocolo de dosagem de proteínas, seguindo as recomendações do fabricante. A leitura das concentrações foi realizada em espectrofotômetro. Os antígenos extraídos foram conservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em pequenas alíquotas, até o momento dos ensaios *in vitro*.

4.8 Obtenção de PBMC

Para obtenção das células mononucleares humanas, foram diluídos o sangue periférico, coletados anteriormente, em meio RPMI completo (L-glutamina) na proporção de 1:1 e acrescentado, cuidadosamente, 8 mL Histopaque[®] - 1077. Os tubos foram levados à centrífuga sem freio a 2.400 rpm por 30 minutos. Após a centrifugação, foi realizada a remoção da camada de células mononucleares e transferida para um tubo falcon 15 mL para a realização de lavagens com meio RPMI completo e centrifugações a 4.400 rpm por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 1mL de meio RPIM completo e as células foram contadas em câmara de Neubauer com azul de Trypan, ajustando concentração para 2×10^5 células / mL em meio RPIM completo.

4.9 Preparação das placas

Em placas de 96 poços de fundo chato, foram adicionadas 100 μL /poço de cada substância conforme a Figura 7, somadas a 100 μL /poço de células PBMC (2×10^5 /poço) extraídas a partir do sangue de pacientes, totalizando volume final de 200 μL /poço, exceto para os poços controle os quais continham apenas meio RPMI. As substâncias utilizadas foram: meio de cultivo RPMI completo (controle positivo); substância inorgânica - Cu (HBP₂₃) [0,2814 $\mu\text{g}/\text{mL}$]; produto natural – Extrato Diclorometano (LFME) [0,006 $\mu\text{g}/\text{mL}$], Fração DCM [0,0012 $\mu\text{g}/\text{mL}$]; Fitohemaglutinina (*Phytohemagglutinin* – PHA) [10 $\mu\text{g}/\text{mL}$] e antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) [10 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Todas as substâncias foram previamente diluídas em meio RPMI completo, obedecendo suas devidas concentrações de acordo com o protocolo e as instruções do fabricante (*Amersham BrdU Cell Proliferation Biotrak ELISA Kit, GE Healthcare*[®]).

Após a adição de todas as substâncias e das células PBMC, as placas foram incubadas durante 72 horas em estufa *Thermo Scientific Forma® Series II Water Jacketed CO₂ Incubators* a 37 °C com níveis de CO₂ a 5% e 95% de umidade.

As placas foram preparadas com 1-2 horas de antecedência (Figura 8) e colocadas a 37 °C contendo 100 µL/poço de Meio completo; Substância inorgânica Cu; Produto natural DCM (Fração Diclorometano) em 100 µl (6,6 µg / mL para concentração final de 1uM) e LFME (Extrato metanólico) de meio completo, Fito hemaglutinina - PHA-M (10 µg / mL) a ser utilizada como controlo positivo. Em 100 µL de meios completos, respectivamente e antígenos de leishmanias solúveis - SLA (10 µg / mL em 100 µL de meio completo) obtidos de uma suspensão de promastigotas de *L. guyanensis* e *L. amazonensis*.

Figura 8- Modelo de placas utilizado nos experimentos de linfoproliferação.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO
B	Cu(I)	Cu(I)	Cu(I)	MEIO	LFME	LFME	LFME	MEIO	DCM	DCM	DCM
C	SLA L.a	SLA L.a	SLA L.a	MEIO	SLA L.g	SLA L.g	SLA L.g	MEIO			
D	PHA	PHA	PHA	MEIO	CEL	CEL	CEL	MEIO			
E	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO	MEIO

Legenda: DCM - Fração Diclorometano; LFME - Extrato Metanólico; Cu – Cobre; SLA *L. a.* - Antígeno Solúvel de *Leishmania amazonensis*; SLA *L. g.* - Antígeno Solúvel de *Leishmania guyanensis*; PHA - Fito hemaglutinina; Meio - Meio RPMI.

4.10 Bioativos utilizados para estimulação de PBMC *in vitro*

As substâncias utilizadas neste projeto foram previamente selecionadas por sua atividade antileishmania em promastigotas em sistemas *in vitro*. Foram avaliados o complexo metálico (Cu) e o produto natural que consiste em fração diclorometano (DCM) extraída a partir do fracionamento do extrato MeOH do fruto de *L. ferrea*. Os testes e estabelecimento das concentrações destes compostos foram realizados por Chagas *et al.*, (2021) e Jensen (2020), respectivamente.

4.11 Análise de citocinas do sobrenadante

Os níveis de citocinas IL-6, IL-8 e IL-1b foram quantificados utilizando o BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram adquiridas em um FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), e o software FCAP-Array v3 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) foi utilizado para análise dos dados. Os dados foram relatados em picogramas por mililitro (pg/mL), de acordo com as curvas padrão fornecidas nos kits.

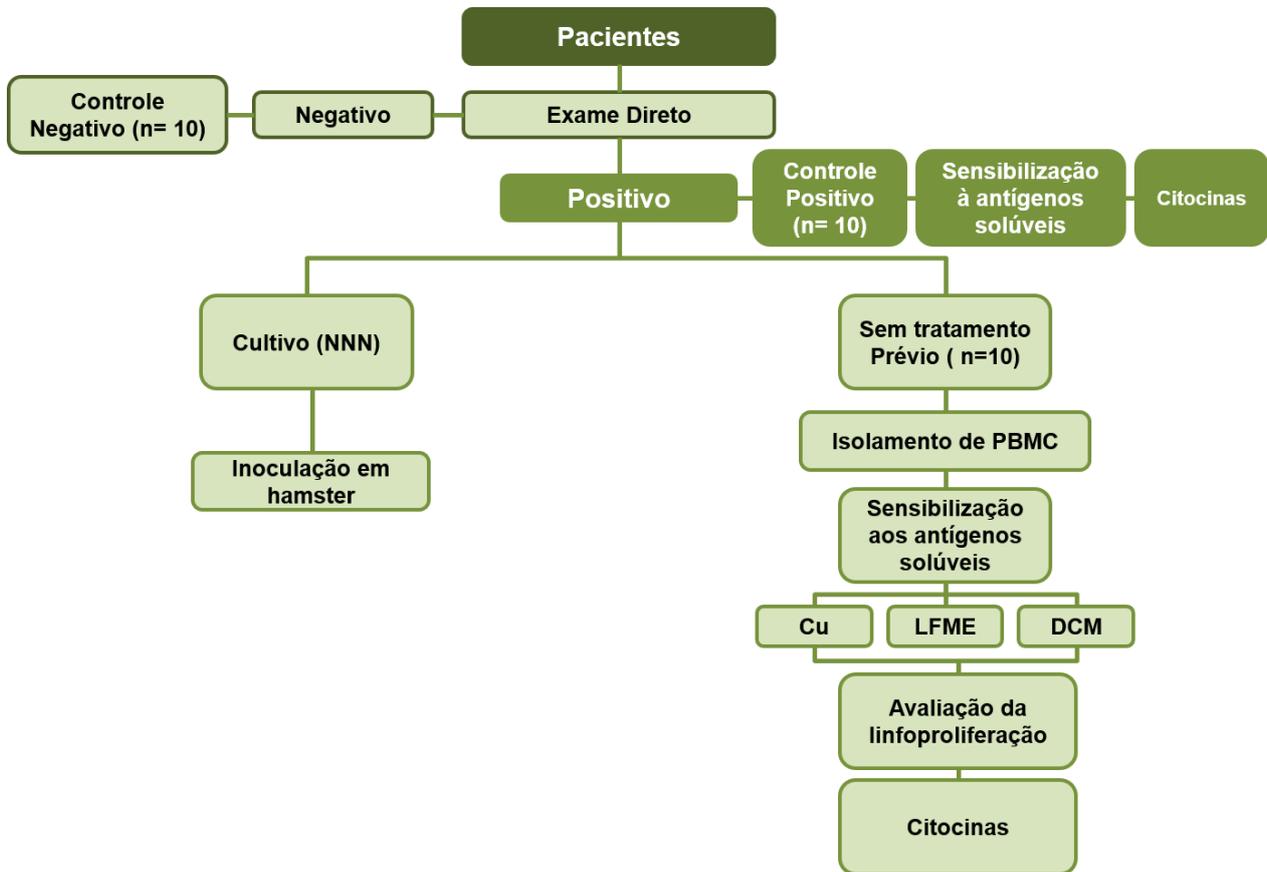
4.12 Leitura e análise estatística

Foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk, em seguida as análises de Kruskal-Wallis foram realizadas para comparações entre os grupos de pacientes, e Mann-Whitney para comparações entre os grupos de bioativos utilizados, com utilização do software estatístico PAST versão 4.0 (Hammer et al., 2001). A significância foi definida com base nos valores de $p < 0.05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

4.13 Fluxograma das etapas de coleta

Todos os procedimentos e experimentos realizados neste estudo estão apresentados na Figura 9, resumidamente, na forma de fluxograma.

Figura 9- Fluxograma das etapas do projeto, desde a coleta do material biológico até os experimentos *in vitro*.



5 CAPÍTULO 1

Erika Oliveira da Silva^{1*}, Paula Figliuolo da Cruz Borges², Rafaela Benício Santana², Heriederson Sávio Dias Moura³, José Fernando Marques Barcelos⁴, Bruno Bezerra Jensen², Francimeire Gomes Pinheiro², Maricleide Farias Naiff², Thaís Tibery Espir⁵, Antonia Maria Ramos Franco²

¹Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

²Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

³Programa de Pós-graduação Enfermagem em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto São Paulo, Brazil.

⁴Laboratório de Histologia, Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

⁵Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

⁶Laboratório de Hidrologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Evaluation of the lymphoproliferation of mononuclear cells in cutaneous leishmaniasis patients treated with *Libidibia ferrea*

Erika Oliveira da Silva^a, Paula Figliuolo da Cruz Borges^b, Rafaela Benício Santana^b, Heriederson Sávio Dias Moura^c, José Fernando Marques Barcellos^d, Bruno Bezerra Jensen^b, Francimeire Gomes Pinheiro^b, Maricleide de Farias Naiff^e, Thaís Tibery Espir^e, Antonia Maria Ramos Franco^b

^a Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 69080-900, Amazonas, Brasil. *ericcaoliveira@hotmail.com

^b Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 69067-375, Amazonas, Brasil.

^c Programa de Pós-Graduação Enfermagem em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 14040-902, São Paulo, Brasil.

^d Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 69054-298, Amazonas, Brasil.

^e Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 69067-005, Amazonas, Brasil.

Received: July 29, 2021 / Accepted: September 20, 2021 / Published online: September 30, 2021

Abstract

American integumentary leishmaniasis (ATL) is a neglected disease that mostly affects vulnerable populations. Its broad spectrum of clinical manifestations is related to the type of immune response produced by the host and the species of *Leishmania* involved. In recent years, the use of medicinal plants has become a therapeutic alternative in the treatment of infectious parasitic diseases. This research aimed to evaluate the lymphoproliferative responses of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with cutaneous leishmaniasis (CL) before and after treatment, and healthy individuals. The lymphoproliferative response was evaluated in cell culture using stimuli of the dichloromethane fraction (DCM) obtained from *Libidibia ferrea*, Glucantime® and phytohemagglutinin - PHA using a BrdU Cell Proliferation after 72 h of incubation. In cultures treated with the DCM fraction, intense induction of lymphoproliferation was observed ($p < 0.0001$), as was also observed in response to the PHA mitogen, and there was a significant difference when compared with the conventional treatment ($p < 0.0135$). In the post-treatment and healthy groups, although the compound induced lymphoproliferation, there was no statistical difference. These results suggest that the organic compound played an important inducing role in lymphoproliferation, which highlights the importance of continuity involving new studies in order to evaluate its immunomodulatory activity.

Keywords: Cell proliferation, leishmaniasis, natural products, therapeutic alternative.

Avaliação da linfoproliferação de células mononucleares de pacientes com leishmaniose cutânea frente a *Libidibia ferrea*

Resumo

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença negligenciada que acomete majoritariamente populações vulneráveis. Seu amplo espectro de manifestações clínicas é relacionado ao tipo de resposta imunológica produzida pelo hospedeiro e a espécie de *Leishmania* envolvida. Nos últimos anos, o uso de plantas medicinais vem sendo uma alternativa terapêutica no tratamento de doenças infectoparasitárias. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar as respostas linfoproliferativas de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) antes e após tratamento e de indivíduos saudáveis. A resposta linfoproliferativa foi avaliada em cultura de células frente a estímulos da fração diclorometânica (DCM) obtida de *Libidibia ferrea*, Glucantime® e phytohemagglutinin - PHA utilizando *BrdU Cell Proliferation* após 72h de incubação. Nas culturas tratadas com a fração DCM foi observada em todos os grupos intensa indução da linfoproliferação ($p < 0,0001$), apresentando diferença significativa ao comparar com o tratamento convencional no grupo de pacientes pós-tratamento ($p < 0,0135$). Estes resultados sugerem que o composto orgânico desempenhou importante ação indutora na linfoproliferação ressaltando a importância da continuidade com novos estudos a fim de avaliar sua atividade imunomodulatória.

Palavras-chave: Proliferação celular, leishmaniose, produtos naturais, alternativa terapêutica.



Introduction

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is classified by the World Health Organization (WHO) as a neglected tropical disease (NTD). In Brazil, it is considered a public health problem, whose case notification data from the Department of Informatics of the National Health System (SINAN, 2019) indicated 16,135 confirmed cases of ATL in 2019. The northern region had the highest incidence, with 7,123 cases of ATL in 2019, with 1,302 cases reported in the state of Amazonas. ATL is a disease caused by intracellular protozoa of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Vianna) guyanensis* and *Leishmania (Vianna) braziliensis* being the main species that cause ATL in Brazil (Brasil, 2017).

In the Amazon, ATL manifests itself in the cutaneous, diffuse cutaneous and mucosal forms, with cutaneous leishmaniasis (CL) being the most prevalent in the state of Amazonas (Brasil, 2017). CL is characterized by a diversity of clinical forms, the lesions of which can be localized or disseminated. The variability of clinical presentations depend on the species of *Leishmania* involved in the infection and the development of the patient's immune response (Brasil, 2017).

Regarding the mechanisms of immune regulation, there is a dichotomy between Th1 and Th2, since they induce important cytokine profiles that are capable of defining the clinical course of infection (Espir *et al.*, 2014). In this context, the main human defense against leishmaniasis is its ability to adjust the cell-mediated immune response, which is demonstrated by lymphoproliferation and the production of high levels of IFN- γ and TNF- α , making it capable of controlling or even eliminating the parasite. Thus, lymphoproliferation is an important evaluation parameter, as it demonstrates the ability of a given cell or group of cells to proliferate in situations that may be adverse (Teixeira, Teixeira, Andrade, Barral-Netto, & Barral, 2006; Bacellar *et al.*, 2002).

For more than 50 years, the drugs recommended by the Brazilian Ministry of Health for treating leishmaniasis have been composed of pentavalent antimonials (Sb⁵⁺) (Carvalho *et al.*, 2019). Despite their effectiveness, Sb⁵⁺ presents a number of problems, such as parenteral administration, long duration of treatment, high toxicity and high cost. Thus, many patients who contract leishmaniasis abandon treatment, which is a factor that favors the appearance of resistant strains (Pradhan, Schwartz, Patil, Grabbe, & Goldust, 2021).

Due to the high toxicity of the drugs that are currently used, new therapeutic alternatives have been studied, and *Lebidibia ferrea* is one of the candidates. It is a plant that belongs to the Fabaceae family, and is popularly known in Brazil as "pau-ferro" or "juçá". *L. ferrea* has a multiplicity of therapeutic uses and its different plant parts are used in the treatment of various diseases. Therefore, given its medical importance, the Brazilian Ministry of Health has included this species in the National List of Important Medicinal Plants for the Health System and indicates that it has analgesic, antipyretic, anti-inflammatory and/or antispasmodic (Brasil, 2006), and healing and antioxidant properties (Carvalho, Sampaio, Araújo, Pinto, & Rocha, 2016; Falcão *et al.*, 2019).

Antileishmanial activity was observed by Comandolli-Wyrepkowski *et al.* (2017), who confirmed that *L. ferrea* presented efficiency in the treatment of CL in *in vitro* and *in vivo* experiments. In this sense, considering the therapeutic relevance of *L. ferrea*, this study aimed to evaluate the action of a fraction obtained from the methanolic extract of *L. ferrea* on the lymphoproliferation of PBMC of people exposed to *Leishmania* sp. and compare it to those not exposed, for the purpose of providing subsidies for new Leishmaniasis treatment strategies.

Materials and Methods

Plant material and fractionation

Samples of the fruit of *L. ferrea* were collected in Manaus, Amazonas, Brazil (3° 4' 34"S 60° 0' 11" W). These were deposited in the Herbarium of the National Institute for Amazonian Research – INPA and identified under the number 246150. The collected fruits were sorted and, after removing the seeds, were dried, pulverized and extracted with the solvents hexane and methanol (Comandolli-Wyrepkowski *et al.*, 2017). The dichloromethane fraction (DCM) of the *L. ferrea* extract was obtained by liquid-liquid partition. An aliquot of 20 g of methanolic extract solubilized in 200 mL of H₂O:MeOH (9: 1) was used and extracted three times with each of the solvents used in the partition (hexane and dichloromethane). After this process, the fraction was concentrated in a rotary evaporator (YAMATO®).

Ethical aspects

This work was approved by the Ethics Committee for Research with Human Beings (CEP) of the Federal University of Amazonas (UFAM) - CAAE/UFAM: 29406319.2.0000.5020. All the volunteers who agreed to participate in the study signed the informed consent form.

Sample population

The biological samples used in this study were obtained from 30 people from the municipality of Rio Preto da Eva (2° 41' 55" S, 59° 42' 3"W), Amazonas state, Brazil, who sought treatment at a basic healthcare unit (UBS), in the period from March to June 2020. The participants in this study were divided into three groups: before treatment, after treatment and negative control, according to Table 1.

All the primoinfected patients underwent a physical examination and the diagnosis for CL was based on the detection of *Leishmania* sp. amastigotes, from scarification of the inner edge of the lesion and smears stained with rapid the Panotic Kit (Laborclin™). Samples of the edge of the lesion of each patient were inoculated in NNN (Neal, Novy and Nicolle) culture media for parasitological confirmation of promastigote forms of the parasite.

Blood sampling and PBMC extraction

Around 8 mL of heparinized blood was collected from all study participants. The blood samples were transferred to

centrifuge tubes, diluted in complete RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medium at a 1:1 ratio and had 8 mL Histopaque™ 1077 carefully added. The tubes were centrifuged at 2,200 rpm for 30 minutes. The peripheral mononuclear cells (PBMCs) were collected and transferred to centrifuge tubes, washed twice with RPMI medium, and then centrifuged at 1,800 rpm for 10 minutes at 4 °C. The PBMCs were resuspended in 1 mL of complete RPMI medium and counted in the Neubauer chamber with the aid of Trypan blue. The concentration of PBMCs was adjusted to 2×10^5 cells/mL in complete RPMI medium.

Table 1. Participants in the study from Rio Preto da Eva, Amazonas, Brazil organized by group and the inclusion criteria used in the research.

Group	Inclusion criteria
Before treatment (primoinfection)	Untreated patients with first <i>Leishmania</i> infection
After treatment	Patients post Glucantime® treatment for cutaneous leishmaniasis with healed lesions. Blood collection of this group was performed after full healing of the lesion and clinical evaluation to ensure that the lesion was no longer active, at least 30 days and up to 12 months after treatment.
Negative control	Healthy individuals, without clinical manifestations or lesions caused by <i>Leishmania</i> spp. The healthy individuals were from the metropolitan area of Manaus, and epidemiological questionnaire was applied to ensure that these individuals had not been in an endemic area in recent months.

The number of participants in each group was $n = 10$.

In vitro cell stimulation assays

The PBMCs were transferred to culture microplates of flat-bottomed 96-well plates; each well containing 100 μ L/PBMC [2×10^5]. The tests were individually carried out with the PBMC samples from each participant. The wells of the microplates, with 100 μ L/well for each test substance (final volume of 200 μ g/well), were organized in triplicate as follows: wells containing cells stimulated with phytohemagglutinin-PHA [10 μ g/mL], considered the positive control for lymphoproliferative response; wells without stimulation (with only RPMI medium) were considered the negative control; wells with cells treated with Glucantime® [100 μ g/mL]; and wells with cells treated with the DCM fraction [120 μ g/mL].

Prior to this, both substances were diluted in RPMI medium, and the DCM fraction was first dissolved in DMSO-dimethylsulfoxide (CH₂):SO (1%). The PBMCs were incubated for 72 h at 37 °C (5% CO₂; 95% humidity) and, after 18 hours of incubation, BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) [10 μ M/mL] was added. An ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) colorimetric test was performed according to the manufacturer's instructions (BrdU Cell Proliferation ELISA Kit, Biotrak, Amersham, UK).

Lymphoproliferation was evaluated based on the

quantification of BrdU incorporation, by means of the average increase in optical density through spectrophotometry (absorbance of 450 nm). Estimates of cell proliferation were determined as a relative value between the arithmetic mean of positive and negative control triplicates (white, well with RPMI medium), in relation to wells with stimulated cells.

Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using GraphPad Prism® software v.6.0 for Windows, for which the significance ($p < 0.05$) was calculated using parametric tests. A one-way ANOVA statistical test was used for comparisons among groups of study subjects and the Tukey test was used for comparisons among the drug treatments.

Results and Discussion

During the treatment, epidemiological investigations and clinical evaluations were performed on the 20 patients diagnosed with CL. Of these, ten were positive direct examination primoinfected patients, and ten were patients who had achieved clinical cure, which was evaluated according to wound healing, after treatment with Glucantime®. There was a predominance of CL in males (85%), and 76.47% were in the age group between 19 and 56 years. The higher prevalence of males, who are young and are involved in forest extractivism are part of the epidemiological profile of ATL in the Brazilian Amazon (Figueira *et al.*, 2017; Hernández & Núñez, 2019).

Regarding the CL lesions, 91.30% were ulcerated lesions, with a mean size of 2.0 cm, 62.86% of which were located in the lower limbs and 13.04% in the upper limbs and trunk (Figure 1). Figueira *et al.* (2017) also described a higher prevalence of ulcerated lesions of the CL, as well as a high frequency of lesions in the lower limbs. However, the study by Hernández & Núñez (2019), also conducted with patients living in the municipality of Rio Preto da Eva, in the period from 2014 to 2016, found a lower number of lesions in the lower limbs. In contrast, Sampaio *et al.* (2009) and Hernández and Núñez (2019) noted a higher frequency of patients with CL lesions in the upper limbs, in the municipalities of Rio Preto da Eva and Tefé in the Amazonas state, and in Brasília, DF.

Of the 30 subjects involved in this study, mononuclear cells from 21 participants (7 samples/group) were analyzed *in vitro*. The lymphoproliferative response was expressed in high rates ($\geq 60\%$) (Figure 2) of PBMCs in the primoinfected ($p = 0.0873$) (Figure 2A), post-treatment ($p = 0.0135$) (Figure 2B) and negative control ($p = 0.0624$) (Figure 2C) groups with the stimulus by the DCM fraction, conventional treatment with Glucantime® and PHA mitogen.

The lymphoproliferation of PBMC was strongly positive (100%) and significant in response to PHA mitogen (Figure 2) and was verified in all groups of participants. PHA mitogen is commonly used as a lymphoproliferation enhancer and has been used in other studies (Reis *et al.*, 2009; Mohammadi, Duthie, Reed, Javadi, & Khamesipour, 2021).



Figure 1. Clinical aspects of lesions in male patients primoinfected with cutaneous leishmaniasis (CL) treated in Rio Preto da Eva, Amazonas, Brazil, during March to May 2020. IM: Registration code.

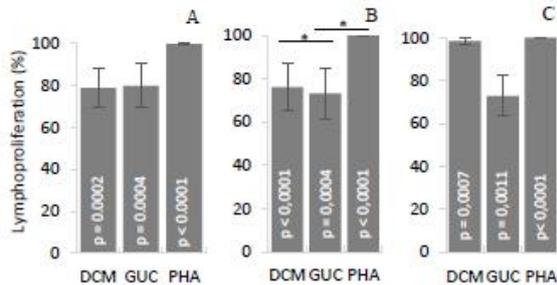


Figure 2. PBMC lymphoproliferation of participants evaluated in Rio Preto da Eva, Amazonas state, Brazil, during March and May 2020. A - primoinfected patients with cutaneous leishmaniasis; B - post-treatment cutaneous leishmaniasis patients; C - healthy people without cutaneous leishmaniasis. DCM: dichloromethane fraction; PHA: phytohemagglutinin. Vertical lines represent standard error. *Horizontal lines represent statistical significance between treatments ($p < 0.005$).

The PBMC cultures from all the groups showed a significant lymphoproliferative response ($\geq 77\%$; $p < 0.0007$) to the dichloromethane fraction (DCM) (Figure 2). In particular, the group of post-treatment patients, in particular, presented almost 100% proliferated cells induced by DCM. Thus, the DCM fraction induced more cell proliferation than Glucantime[®], which was different to that observed for the primoinfected and negative control groups, since the values between the substances were equivalent.

This result of expressive lymphoproliferation may be related to the therapeutic biological potential of the fraction of *L. ferrea* obtained, whose antileishmanial activity was

confirmed against *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) guyanensis* and did not present cytotoxic effects in murine macrophages (Comandolli-Wyrepkowski *et al.*, 2017). To date, the mechanism of action of the pharmacological components of *L. ferrea* *in vivo* is not yet known. However, promising effects of *L. ferrea* for the treatment of CL were observed by Comandolli-Wyrepkowski *et al.* (2017), when submitting Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) that were infected with *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) guyanensis* to topical treatment with a hydrogel containing the DCM fraction of *L. ferrea*. Control of the growth of the CL lesions in animals and low parasitic load in culture analyses were noted after treatment.

The phytochemical prospecting of the extract of *L. ferrea* showed the presence of phenolic compounds and flavonoids in greater evidence (Comandolli-Wyrepkowski *et al.*, 2017). Phenolic compounds are recognized as being involved in anti-inflammatory and antioxidant activity, and act directly on specialized cells of the immune system (Hakime-Silva *et al.*, 2013). Vila-Nova *et al.* (2012) demonstrated leishmanicidal activity of the phenolic compound coumarin (scoporone) isolated from *Platymischum floribundum*, and of the flavonoids (rutin and quercetin) that were isolated from *Dimorphandra gardneriana*. These are both plants that are native to the Caatinga biome of Brazil, and in this case were against *Leishmania infantum*, which are the protozoa that cause visceral leishmaniasis. These compounds were able to inhibit the enzyme acetyl-cholinesterase (AChE) and, consequently, disrupt the biosynthesis of phosphatidylcholine, an essential constituent of the surface membranes of the parasite.

Among some of the important phenolic compounds found in *L. ferrea* is gallic acid. Associating these phenolic compounds and amphotericin B, Alves (2019) demonstrated the activation of macrophages and a reduction in amastigotes through macrophage, indicating therapeutic action and activation of the immune response, and leading to the healing of lesions in *Mus musculus* lineage BALB/c. Some studies with herbal compounds, such as *Campsiandra laurifolia* (Chagas, Henrique Müller, Soares & Garcez, 2010), *Portulaca hirsutissima* and *Portulaca werdermannii* (Costa *et al.*, 2007), *Nelumbo nucifera* (Khan *et al.*, 2016), did not demonstrate direct action on the parasitic agent, but rather, as potential anti-inflammatory treatments with high immunomodulatory capacity in *Leishmania* sp. infections.

Considering the PBMCs exposed to Glucantime[®], all the groups had a high rate of lymphoproliferation in response to Glucantime[®] ($\leq 70\%$; $p < 0.001$) (Figure 2). The treatment of CL with antimonials promotes changes in the immune response of the host, corroborating with the modulation of the immune system, increased the ability of direct destruction or gradual elimination of the parasite (Brelaz-de-Castro *et al.*, 2012). The rate of cell proliferation of the samples of PBMC exposed to Glucantime[®] from post-treatment subjects (73%) (Figure 2B) was reasonably lower than that of the samples of the primoinfected (79%) patients (Figure 2A). These data corroborate the findings of Toledo *et al.* (2001), who also observed a decrease in lymphoproliferative response after treatment, in PBMC

stimulated with total antigen of *L. (V.) braziliensis*. The authors pointed out that in an *in vivo* study, T cell stimulation is expected to decrease as treatment progresses to cure, since the reduction in parasitic load can cause the number of responsive T cells to decrease. It is worth remembering that in both studies, blood collection of post-treatment patients was performed at least 30 days after the end of Glucantime® treatment.

The toxicity of meglumine antimoniate goes far beyond the adverse effects on the vital organs of CL patients while being treated. Lopez (2015) observed that antimoniate interfered in the process of cell proliferation, in addition to contributing cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects in human leukocytes exposed to different concentrations of Glucantime®. Given this, the combination therapy of potential drugs and antimoniate have numerous advantages, such as reduced toxicity, ease in the treatment regimen and reduced development of resistance to this drug.

Lymphoproliferation is considered an important factor in the control of infection or even in the elimination of *Leishmania* sp. (Brasil, 2017). Therefore, the discovery of phytopharmaceuticals with immunomodulatory capabilities are crucial for the development of alternative treatments or for combination with recommended drugs, in order to provide a potential synergism and therapeutic success in treating leishmaniasis. This study contributes to a more diligent look at the importance of the immunomodulatory effect of *L. ferrea* that may favor the healing of lesions in patients with CL. However, for the best elucidation of the regulation of inflammation induced by the DCM fraction, it is necessary to perform cytokine dosage to understand these immune mechanisms.

Conclusion

These findings suggest that the organic fraction DCM induced stimulatory action on activation and lymphoproliferation when incubated with the PBMC of patients before and after treatment for CL, which may, at least in part, be due to an immunomodulatory response. This immunomodulatory response needs to be highlighted and better investigated in future trials in order to strengthen the data presented here in order to demonstrate which molecular mechanisms are involved and the stimulatory effect of the immune response caused by the dichloromethane fraction of *L. ferrea*, a phytopharmaceutical candidate for the alternative treatment of cutaneous leishmaniasis.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Amazonas State Research Support Foundation - FAPEAM (POSGRAD) for its financial support, and the Edible Fungi Cultivation Laboratory for its collaboration with the spectrophotometry experiments.

References

Alves, M. M. M. (2019). *Anfotericina B convencional associada ao ácido gálico e ao ácido elágico em formulação tópica para terapia antileishmaniasis* (Doctoral thesis). Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Pós-graduação em Ciência Animal. Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias.

- Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro de Jesus, A., Dutra, W. O., Gollob, K. J., & Carvalho, E. M. (2002). Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity*, 70(12), 6734-6740. doi: 10.1128/IAI.70.12.6734-6740.2002
- Brasil. Ministério da Saúde. (2006). *A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos*. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. 1. ed. Brasília: Editora Ideal Ltda.
- Brasil. Ministério da Saúde. (2017). *Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar* [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis.
- Brelaz-de-Castro, M. C., Almeida, A. F., Oliveira, A. P., Assis-Souza, M., Rocha, L. F., & Pereira, V. R. (2012). Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cellular Immunology*, 279(2), 180-186. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.11.006
- Carvalho, F. G., Sampaio, J. P. S., Araújo, M. M. S., Pinto, L. S. S., & Rocha, A. J. (2016). Assessment of the healing activity of jucá pods [*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz] in cutaneous lesions of rats. *Acta Scientiarum. Technology*, 38(2), 137-143.
- Carvalho, S. H., Frézar, F., Pereira, N. P., Moura, A. S., Ramos, L. M. Q. C., Carvalho, G. B., & Rocha, M. O. C. (2019). American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. *Tropical Medicine & International Health*, 24(4), 380-391. doi: 10.1111/tmi.13210
- Chagas, A. P., Henrique Müller, A., Soares, M., & Garcez, L. M. (2010). Potencial anti-*Leishmania* e imunomodulador dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae). *Revista Pam-Amazonica de Saúde*, 1(1), 117-124. doi: 10.5123/S2176-62232010000100017
- Comandoli-Wyrepkowski, C. D., Jensen, B. B., Grafova, I., Santos, P. A., Barros, A. M. C., Soares, F. V., Barcellos, J. F. M., Silva, A. F., Grafov, A., & Franco, A. M. R. (2017). Atividade antileishmaniana de extratos de *Libidibia ferrea*: desenvolvimento de testes *in vitro* e *in vivo*. *Acta Amazonica*, 47(4), 331-340. doi: 10.1590/1809-4392201700871
- Costa, J. F., Kiperstok, A. C., David, J. P., David, J. M., Gulietti, A. M., Queiroz, L. P., Santos, R. R., & Soares, M. B. (2007). Anti-leishmanial and immunomodulatory activities of extracts from *Portulaca hirsutissima* and *Portulaca werdermannii*. *Fitoterapia*, 78(7-8), 510-514. doi: 10.1016/j.fitote.2007.05.005
- Espir, T. T., Figueira, L. P., Naiff, M. F., Costa, A. G., Ramalho-Ortigão, M., Malheiro, A., & Franco, A. M. R. (2014). The Role of Inflammatory, Anti-Inflammatory, and Regulatory Cytokines in Patients Infected with Cutaneous Leishmaniasis in Amazonas State, Brazil. *Journal of Immunology Research*. doi: 10.1155/2014/481750
- Falcão, T. R., Araújo, A. A., Soares, L. A. L., Farias, I. B., Silva, W. A. V., Ferreira, M. R. A., Araújo, R. F. Jr., Medeiros, J. S., Lopes, M. L. D. S., & Guerra, G. C. B. (2019). *Libidibia ferrea* Fruit Crude Extract and Fractions Show Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antinociceptive Effect *In Vivo* and Increase Cell Viability *In Vitro*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 6064805. doi: 10.1155/2019/6064805
- Figueira, L. P., Soares, F. V., Júnior, R. D. N., Vinhote-Silva, A. C., Silva, S. S., Espir, T. T., Naiff, M. F., Gomes, L. H. M., Moreira, F. R. A. C. N., & Franco, A. M. R. (2017). New human case reports of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) naiffi* in the Amazon region, Brazil. *Acta Amazonica*, 47(1), 47-52. doi: 10.1590/1809-4392201601484
- Hakime-Silva, R. A., Velloso, J. C. R., Khalil, N. M., Khalil, O. A. K., Brunetti, I. L., & Oliveira, O. M. M. F. (2013). Chemical, enzymatic and cellular antioxidant activity studies of *Agaricus blazei* Murrill. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85(3), 1073-1082. doi: 10.1590/S0001-37652013005000044
- Hernández, C. M. C., & Núñez, V. P. (2019). Caracterización clínico-epidemiológica de la leishmaniasis cutánea. UBS Manápolis, Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Dermatologia Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 17(1): 8-12.
- Khan, S., Khan, H., Ali, F., Khan, N. M., Shah, A., & Rahman, S. U. (2016). GC-MS Analysis of Fixed Oil from *Nelumbo nucifera* Gaertn Seeds: Evaluation of Antimicrobial, Antileishmanial and Urease Inhibitory Activities. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 38(06), 1168-1173.

- Lopez, G. T. (2015). *Efeitos do Antimoniato de N-Metilglucamina e SBY sobre parâmetros citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em cultura de leucócitos humanos* (Master's dissertation). Universidade Federal do Pampa, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).
- Mohammadi, A. M., Duthie, M. S., Reed, S. G., Javadi, A., & Khamesipour, A. (2021). Evolution of antigen-specific immune responses in cutaneous leishmaniasis patients. *Parasite Immunology*, 43(4), e12814. doi: 10.1111/pim.12814
- Reis, L. C., Brito, M. E., Souza, M. A., Medeiros, A. C., Silva, C. J., Luna, C. F., & Pereira, V. R. (2009). Cellular immune response profile in patients with American tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23(1), 63-69. doi: 10.1002/jcla.20291
- Sampaio, R. N. R., Gonçalves, M. C., Leite, V. A., França, B. V., Santos, G., Carvalho, M. S. L., & Tauli, P. L. (2009). Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(6), 686-690. doi: 10.1590/S0037-86822009000600015
- Sinan. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde.
- Pradhan, S., Schwartz, R. A., Patil, A., Grabbe, S., Goldust, M. Comprehensive Review on Treatment Options of Leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol*. 2021. doi: 10.1111/ced.14919
- Teixeira, M. J., Teixeira, C. R., Andrade, B. B., Barral-Netto, M., & Barral, A. (2006). Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 22(1): 32-40. doi: 10.1016/j.pt.2005.11.010
- Toledo, V. P. C. P., Mayrink, W., Gollob, K. J., Oliveira, M. A. P., Costa, C. A., Genaro, O., Pinto, J. A., & Afonso, L. C. C. (2001). Imunoquimioterapia na leishmaniose tegumentar americana: aspectos imunológicos antes e após o tratamento. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(1), 89-98. doi: 10.1590/S0074-02762001000100010
- Vila-Nova, N. S., Morais, S. M., Falcão, M. J. C., Bevilacqua, C. M. L., Rondon, F. C. M., Wilson, M. E., Vieira, I. G. P., & Andrade, H. F. (2012). Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium floribundum*, native plants from Caatinga biome. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(11), 1164-1168. doi: 10.1590/S0100-736X2012001100015

License: Creative Commons CC BY NC 4.0

6 CAPÍTULO 2

Human cellular immune response to bioactive drugs with antileishmanial potential

Erika Oliveira da Silva^{1*}, Paula Figliuolo da Cruz Borges², Adriana Malheiro³, José Fernando Marques Barcelos⁴, Alysson Guimarães da Costa³, Alexander Leonardo Silva-Junior³, Ana Flávia da Silva Chagas², Adriano Nobre Arcos⁶, Bruno Bezerra Jensen², Francimeire Gomes Pinheiro², Thaís Tibery Espir⁵, Antonia Maria Ramos Franco²

¹Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

²Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

³Laboratório de Genômica-LABGEN-Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)

⁴Laboratório de Histologia, Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

⁵Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

⁶Laboratório de Hidrologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

ABSTRACT

Leishmaniasis is considered by the World Health Organization (WHO) to be one of the most neglected tropical diseases in the world. The development of the immune response of the host is decisive for parasite elimination and, although the Th1 profile is associated with infection control, if not modulated, it can cause tissue damage. The treatment of cutaneous leishmaniasis (CL) is still a challenge, and the different clinical presentations, added to the variety of species involved, cause the occurrence of relapses. In addition, current treatments are not adapted to the context of patients, are long, are toxic and their invasive route of administration often results in low adherence and/or abandonment of treatment. Thus, several drugs have been evaluated for their antileishmanial activity. In this context, this study aimed to evaluate the induction of lymphoproliferation and dosage of cytokines induced by bioactives of plant and inorganic origin, through the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with cutaneous leishmaniasis. Lymphoproliferation was evaluated against stimuli from the methanolic extract (LFME) (600 µg mL⁻¹), copper complex (281.4 µg mL⁻¹) and phytohemagglutinin (PHA) (10 µg mL⁻¹) using a BrdU cell proliferation ELISA kit after 72 hours of incubation. The dosage of the cytokines IL-6, IL-8 and IL-1β was carried out using a BD™ cytometric bead array (CBA) human Th1/Th2/Th17 cytokine kit. Our results indicate that the bioactive drugs significantly stimulated *in vitro* lymphoproliferation of PBMC (Cu(I) p= <0.000; LFME p<0.02). Regarding the cytokine dosage, IL-6 and IL-8 were the ones that presented higher levels in patients before treatment, compared to the other groups. Therefore, it is suggested that these bioactive can enhance the cellular immune response.

Keywords: cutaneous leishmaniasis, *Libidia ferrea*, copper complex, therapeutic alternatives.

1. INTRODUCTION

Cutaneous leishmaniasis (CL) comprises a group of diseases with different clinical forms due to its great multiplicity of elements involved in transmission, in which each species of *Leishmania* presents a diversity of vectors, reservoirs, epidemiological patterns, geographical distribution and even different therapeutic responses (SATO, 2017; BRASIL, 2017). Cutaneous leishmaniasis (CL) is considered the most common form of *Leishmania* sp. infection. In Brazil, the main species involved in the etiology of CL are *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) naifi* and *Leishmania (V.) lindenbergi* (BRASIL, 2017).

The immunopathogenesis of leishmaniasis depends on the magnitude of the immune system's response, which is associated with an appropriate balance of T cell subsets that define the evolution and severity of the infection. The regulated response of the Th1 type has been considered as a key mediator for cure, with the production of proinflammatory cytokines (IL-12, IL-8, IFN- γ and TNF- α) and susceptibility to the Th2 profile and the production of cytokines such as IL-4, IL-5, and IL-13 (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Another cell subtype, Th17, has been pointed out as a crucial modulator of adaptive immunity, and acts in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017) and, through the production of IL-17, increases the production of multiple inflammatory mediators, such as IL-1, IL-6, TNF- α and NOS2 (ROCHA, SILVEIRA; QUIXABEIRA, 2019).

Leishmania sp. interacts dynamically with cells and evolves to adapt to the hostile environment of host cells, and is even able to modulate its gene expression for better adaptation. This fact favors the development of resistance to some of the therapeutic agents that are currently available (IKEOGU *et al.*, 2020). In Brazil, the drugs currently recommended by the Ministry of Health for the treatment of CL are exclusively parenteral and have hepato-, cardio- and nephrotoxic potential. In addition, most cases of CL occur in rural and difficult to access areas, which hinders both the application of the drug and the monitoring of its side and adverse effects (BRASIL, 2018).

Given the continuing and urgent need for new drugs for CL, plants have been used in the medicinal area due to their numerous therapeutic properties, as well as their low cost, low incidence of adverse effects, and reduced toxicity (MUSHTAQ *et al.*, 2018). In addition, phytopharmaceuticals with immunomodulatory action may be better strategies for alternative treatment or may be combined with standard medications in order to cope with leishmaniasis (SILVA *et al.*, 2021).

Libidibia ferrea, popularly known as “juca” or “pau-ferro” in Brazil, is a tree that is native to Brazil. It is popularly used for therapeutic purposes, mainly in the acceleration of wound healing (KOBAYASHI *et al.*, 2015). The therapeutic effect of *L. ferrea* has already been demonstrated by Commandoli-Wyrepkowski (2017) and Jensen (2021), with promising results against *Leishmania* sp.

Another therapeutic possibility is metal ions, which play crucial roles in several biological processes, such as electrolyte balance and oxygen transport, and act as cofactors in the biological function of proteins, among others (VAROL, 2016), and have shown promise

regarding antileishmanial activity. Work carried out by Chagas *et al.* (2021) demonstrated that copper (Cu^+) showed activity against promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis* and showed low toxicity to macrophages.

In this perspective, this study aimed to evaluate the immunomodulatory potential of three bioactive substances on lymphoproliferation and cytokine production, in order to contribute to the improvement and innovation of treatment for cutaneous leishmaniasis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Acquisition of the bioactive substances

Copper complex

For the *in vitro* immunological assays performed in this study, the copper(I) complex $[\text{HB}(\text{pz})_3]\text{Cu}(\text{PCN})$ was used, which was synthesized at Istituto per l'Energetica and Le Interphasi, IENI, CNR in Padua, Italy (MARZANO *et al.*, 2008; PORCHIA *et al.*, 2009; GANDIN *et al.*, 2014). To carry out the *in vitro* assays, Cu(I) was diluted in 1% dimethylsulfoxide (DMSO), filtered using a membrane with pores of 0.22 μm and then resuspended in complete RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medium in order to obtain the concentration of 281.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a concentration previously evaluated for antileishmanial effects by Chagas (2021).

2.2 Plant material

In this study, the methanolic extract (LFME) and the DCM fraction of *L. ferrea* were used. Samples of the plant were obtained in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. The preparation of the methanolic extract of *L. ferrea* (LFME) is described in Comandoli-Wyrepkowski *et al.* (2017). The LFME was dissolved in DMSO (1%), filtered using a membrane with pores of 0.22 μm and then resuspended in complete RPMI medium, adjusting the concentrations to 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.3 Ethical aspects

All the participants treated in this project agreed to participate voluntarily in the study and signed an informed consent form before blood collection. This work was approved by the Ethics Committee for Research with Human Beings (CEP) at the Federal University of Amazonas (UFAM) - CAAE / UFAM: 29406319.2.0000.5020.

2.4 Sample population

The volunteers evaluated in this study were treated at a basic health unit located in the municipality of Rio Preto da Eva (3° 07' 06" S, 59° W), Amazonas, Brazil, which is part of the metropolitan region of the state capital, Manaus. A total of 20 people with a positive diagnosis for CL were treated. These were divided into 2 groups: 1) before treatment – 10 patients diagnosed with CL primoinfection, with an active lesion, with no history of previous infection or treatment with antimonials (18 ± 36 years, 90% males); 2) after treatment – 10 patients with healed lesions, with treatment completed with Glucantime® (18 ± 58 years, 80% males, between 30 days and 12 months post-treatment). The patients were invited to participate in the project voluntarily and were selected through a search of the health unit's medical records. The negative control group was formed of 10 healthy individuals with no clinical history of CL infection and residents of non-endemic areas of the metropolitan region of Manaus (18 ± 50 years 70% female gender). The complete epidemiological data of the evaluated patients are presented in (SILVA *et al.*, 2021).

2.5 Blood collection and extraction of PBMC

The isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) is described in more detail in Silva *et al.* (2021). In summary, 8 mL of peripheral venous blood from patients with CL and healthy individuals was collected in heparinized polypropylene tubes. Blood was diluted in complete RPMI-1640 medium and Ficoll-Histopaque (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich®) was added. After centrifugation at 2.200 rpm for 30 minutes, the PBMCs were washed twice with a half complete RPMI-1640 and centrifuged at 1.800 rpm for 10 minutes at 4 °C. Then, the PBMCs were resuspended in 1 mL of supplemented RPMI medium, and the PBMC concentration was adjusted to 2×10^5 cells/mL. The PBMCs were transferred to cryotubes and stored at -80 °C.

2.6 Cell proliferation assay

For the *in vitro* assays, the PBMCs were transferred to flat-bottomed 96-well culture microplates, and organized in triplicate. A final volume of 200 µL per well was achieved by adding 100 µL/PBMC [2×10^5] and 100 µL of each bioactive LFME and Cu(I), which were tested separately. Sensitization of cell cultures with the DCM fraction was performed in another study (SILVA *et al.*, 2021). Unstimulated and cultures stimulated with phytohemagglutinin (PHA) [10 µg mL⁻¹] were used as negative and positive controls, respectively. Then, the

PBMCs were incubated in a humidified atmosphere (95%) with 5% CO₂, for 72 h at 37 °C and, after 18 h of incubation, BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) was added [10 mM/mL].

The ELISA colorimetric assay was performed with the BrdU cell proliferation ELISA kit (Biotrak, Amersham, UK), following the manufacturer's guidelines. Finally, the incorporation of BrdU was evaluated, which was based on the average increase in optical density using spectrophotometry (absorbance at 450 nm). The stimulation of lymphoproliferation of each bioactive was determined based on the relative value between the arithmetic mean of the triplicates of the positive control and the negative control, in relation to wells with stimulated cells.

2.7 Cytokine dosage using flow cytometry

After incubation of the *in vitro* cell stimulation plates, the plate were centrifuged at 2.200 rpm for 15 minutes to collect the supernatants of the culture. The supernatants from each well were transferred individually to cryopreservation tubes and stored at -80 °C until cytokine dosing using flow cytometry.

The levels of the cytokines IL-6, IL-8 and IL-1 β were quantified using the BD™ cytometric bead array (CBA) human Th1/Th2/Th17 cytokine kit, following the manufacturer's protocol. The samples were acquired in a flow cytometer (FACS Canto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and the software FCAP-Array v3 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was used for data analysis. Data were reported in picograms per milliliter (pg/mL), according to the standard curves provided in the kits.

2.8 Statistical analysis

The Shapiro-Wilk normality test was performed, then Kruskal-Wallis analyses were performed for comparisons between the groups of patients, and Mann-Whitney tests for comparisons between the groups of bioactive substances used, using the statistical software PAST version 4.0 (HAMMER *et al.*, 2001). Significance was defined based on values of $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

3. RESULTS

3.1 Cell lymphoproliferation assay

The bioactive substances LFME and Cu(I) showed significant effects ($\geq 80\%$; $p < 0.0001$) on the increase in the proliferation in PBMCs in the 20 patients evaluated in the

groups before and after treatment, when compared to the positive control PHA and the negative control (Figure 1). Cu(I) induced higher levels of lymphoproliferation ($\geq 93\%$) in patients before ($p=0.001$) and after ($p=0.0006$) treatment (Figure 1A), when compared with LFME ($\geq 81,3\%$) (Figure 1B), although they are discrete differences.

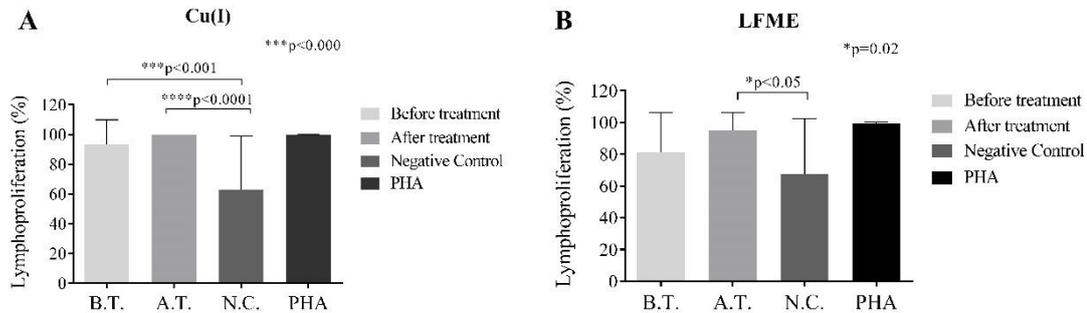


Figure 1. PBMC lymphoproliferation of volunteers treated in Rio Preto da Eva, AM, Brazil, during March and May 2020. (A) PBMCs treated with Cu(I); (B) PBMCs treated with LFME. Cu(I): copper complex; LFME: *Libidibia ferrea* methanol extract; BT: before treatment; AT: after treatment; NC: negative control; PHA: phytohemagglutinin. Vertical lines represent the standard deviation; horizontal lines represent statistical significance between treatments ($p<0.05$).

3.2 Production of cytokines in the supernatant of the culture of PBMCs

The levels of the cytokines IL-6, IL-8 and IL-1 β quantified after stimulation of PBMCs with the bioactive Cu(I), DCM and LFME for the groups before and after treatment differed significantly from the negative control (Figure 2A-I). The PBMCs that received treatment with the three bioactive drugs showed that the production of the inflammatory cytokine IL-8 was higher in CL primoinfection patients (Cu(I) – $p=0.01$; LFME – $p=0.09$) in relation to the other groups (Figure 2A-I). There was no statistical significance in IL-8 production using DCM treatment, despite demonstrating increased levels (Figure 2G).

Regarding IL-6, it can be observed that there was greater production of this inflammatory cytokine in primoinfected cells treated with the Cu(I) complex ($p=0.03$) (Figure 2B) and DCM ($p=0.06$) (Figure 2H). In contrast, cell cultures treated with LFME ($p=0.05$) showed baseline levels of IL-6 production (Figure 2E). Similar results were observed when dosing IL-1, with baseline production levels in LFME-treated cells (Figure 2F) and expressive levels in PBMCs treated with Cu(I) (Figure 2C) and DCM (Figure 2I). Statistically significant difference was only observed in the treatment with DCM ($p=0.04$) (Figure 2I).

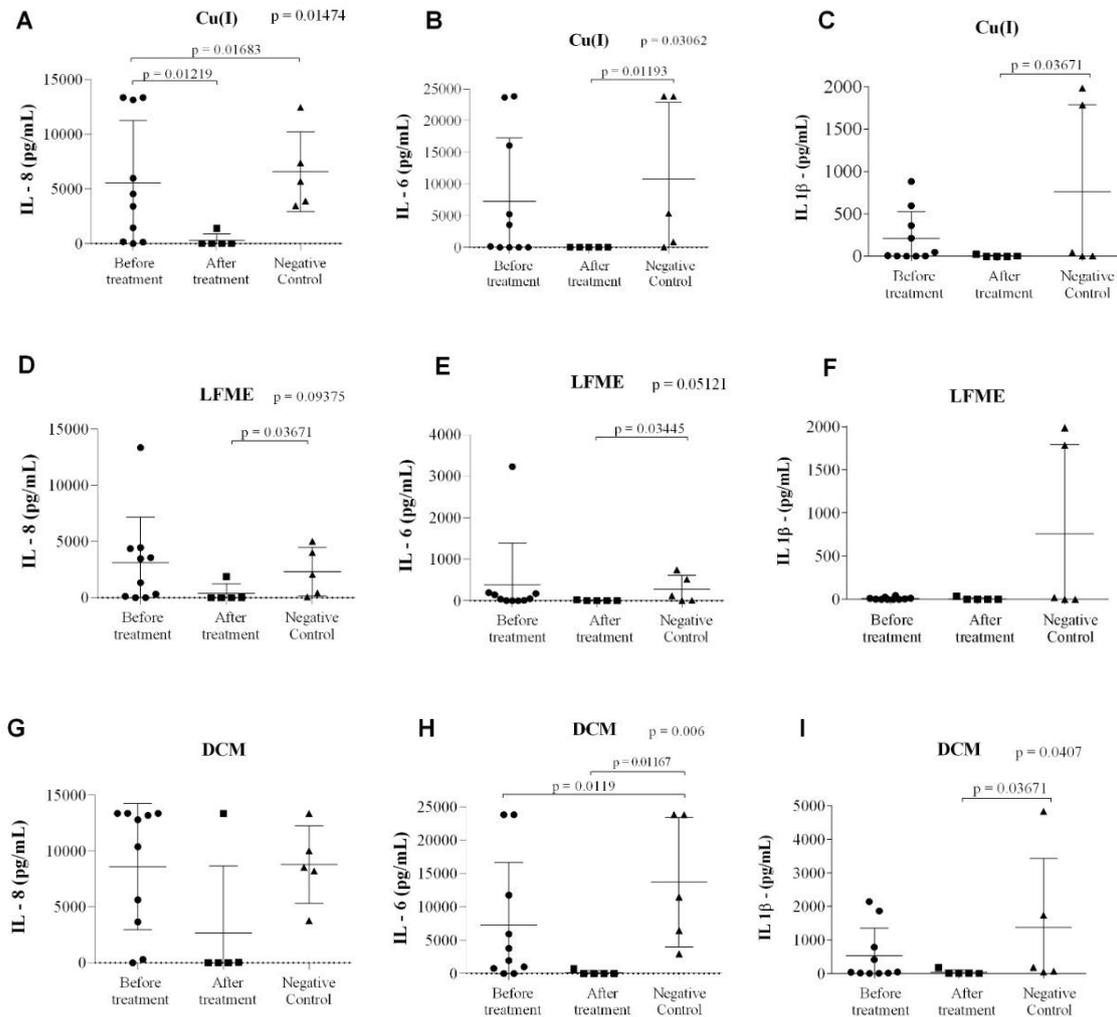


Figure 2. Levels of IL-8, IL-6, IL-1 β (pg/mL) in the supernatants of PBMC cultures extracted from patients before and after conventional treatment for CL and from healthy individuals (negative control). (A-C) PBMCs sensitized by treatment with Cu(I), (D-F) LFME and (G-I) DCM. The means (horizontal lines) are shown for each group of patients. CL: Cutaneous leishmaniasis; Cu(I): copper complex; DCM: *Libidibia ferrea* fraction; LFME: *Libidibia ferrea* methanol extract.

4. DISCUSSION

4.1 Cytokine production after PBMC stimulation with Cu(I) in the supernatant of the culture

About 20 trace elements essential for the proper functioning of the organism have been described, and it was found that, of these 20, ten are metals. Metal components have been widely studied and applied in the diagnosis and therapy of different diseases (MJOS and ORVIG, 2014; ZORODDU *et al.*, 2019). Among the known metals, it is known that copper

[Cu⁺] plays a fundamental role in several biological processes and maintenance of body homeostasis; thus, this metal has been investigated in regards to its therapeutic application and actuation in the immune system (TAGHIPOUR *et al.*, 2021).

Thus, this study investigated the lymphoproliferation of PBMCs (Figure 1A-B) and the production of the cytokines IL-6, IL-8 and IL-1 β in cell cultures exposed to the Cu(I) complex (Figure 2A-C), since this metallic complex has shown significant antileishmanial activity in the treatment of hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi* and *L. (L.) amazonensis* (CHAGAS *et al.*, 2021a; CHAGAS *et al.*, 2021b).

Regarding the immunomodulatory effects, interleukin-6 (IL-6) is an inflammatory cytokine that mediates a series of physiological functions, including lymphocyte differentiation, cell proliferation and survival stimulation, as well as potentializing apoptotic signals (KLAFKE, 2015). Regarding IL-8, this is attributed as an important factor for inflammatory diseases due to its pro-inflammatory properties that promote the coordinated and directional migration of cells of the immune system such as neutrophils, basophils and T lymphocytes (ROSSI & ZLOTNIK, 2000).

There are currently no studies that have investigated the production of cytokines in cells that have been treated with copper(I) complexes. However, our study showed that cells exposed to Cu(I) presented a strong induction of cell proliferation of the PBMCs of patients before and after treatment ($\geq 93\%$) (Figure 1A) and increased production of inflammatory cytokines (IL-6 and IL-8) (Figure 2A-B). These data corroborate the studies by Kocyigit *et al.* (2002) and Van Weyenbergh *et al.* (2004), who demonstrated that patients with CL who present a higher concentration of copper in plasma, at the same time present a higher serum production of IL-6 and IL-8.

IL-6 has a therapeutic role in CL caused by *L. (V.) donovani*, and plays a crucial role in the ability of dendritic cells to regulate the development of CD4⁺ T cells (BANKOTI and STAGER, 2005). The production levels of IL-6 and IL-8 were expressive ($p=0.03022$; $p=0.01474$) in the supernatants of Cu(I)-sensitized cell cultures of primoinfected patients, in relation to patients after treatment, who presented baseline levels of cytokine production, and it is possible to observe that Cu(I) has an inflammatory potential against infection by *Leishmania* sp.

In the serum of pre-treatment patients, the levels of IL-8, MCP-1, and nitric oxide (NO) are higher than in patients in the post-treatment phase, suggesting that IL-8 is an immunodeterminant effector in the progression of CL (KUMAR, BUMB, and SALOTRA, 2010).

In this context, the study conducted by Taghipour *et al.* (2021) emphasizes the importance of trace elements in the regression or progression of cutaneous leishmaniasis, since these are associated with the activity of the immune system, which could be prescribed as adjuvants for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Regarding the influence of copper on the immune response of patients with leishmaniasis, the study by Van Weyenbergh *et al.* (2004) demonstrates that there was an increased concentration of Cu after Glucantime[®] treatment. According to Kocyigit *et al.* (2002), copper concentrations and levels of IL-1 β , IL-8, IL-6 and TNF- α were significantly higher in CL patients than in the healthy controls, demonstrating that plasma trace element content changes in CL patients and that these changes are likely defense strategies of an organism that is regulated by immunoregulatory cytokines.

Thus, it is suggested that the copper(I) complex has stimulating action on the activation and proliferation of T lymphocytes, in addition to inducing production of pro-inflammatory cytokines, and there is the possibility of this complex presenting potential antileishmanial activity.

It is important to emphasize that there are appropriate amounts of trace elements for the correct functioning of the organism (ZORODDU *et al.*, 2019) and Cu deficiency or excess is implicated in a variety of pathological conditions such as Menkes disease (MD) and Wilson's disease (WD), which represent the most well recognized and understood disorders of copper homeostasis (SHIM and HARRIS, 2003), and neurodegeneration processes (TISATO, 2010; DUNCAN and WHITE, 2011). In this sense, the studies of Chagas *et al.* (2021a) and Chagas *et al.* (2021b) demonstrated that the Cu(I) complex did not present cytotoxicity in J774 lineage cells, murine peritoneal macrophages and human monocytes at the concentrations tested.

4.2 Cytokine production after PBMC stimulation with LFME and DCM in the supernatant of the culture

The use of different plants in alternative therapies has been included in the scope of the Unified Health System (SUS) due to the identification of bioactive substances that are derived from the secondary metabolism of plants, and which are capable of preventing and treating some diseases (ZENI *et al.*, 2017; CUNHA *et al.*, 2016). Among the plants used, constituent parts of *L. ferrea* have presented numerous proven therapeutic properties, and are used in folk medicine for the treatment of liver and respiratory problems, gastrointestinal disorders and as a healing agent (ALMEIDA *et al.*, 2021). In this context, this study analyzed the levels of IL-8, IL-6 and IL-1 β in the culture supernatant when confronted with the bioactives LFME (Figure

2D-F) and DCM (Figure 2G-I), extracted from *L. ferrea*. These compounds were previously validated through *in vivo* pre-linear assays and presented antileishmanial activity (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017; JENSEN, 2020).

With regard to the various bioactive substances isolated from this plant, a preliminary phytochemical study conducted by Gonzalez *et al.* (2004) identified the presence of flavonoids, tannins, coumarins, steroids and anthracene derivatives in the hydroalcoholic extract of the stem of *L. ferrea*. Among the phenolic compounds isolated from *L. ferrea*, gallic acid is a polyphenol that has shown anti-inflammatory, antitumor, and antimutagenic activity and strong antioxidant action (LIMA *et al.*, 2016).

Such phenolic compounds are widely distributed in nature and are derived from benzoic and cinnamic acids, as well as flavonoids, and are associated with the inhibition of chronic degenerative diseases such as atherosclerosis and cancer (MOREIRA and FILHO, 2004), hepatoprotective and antioxidant action (BARROS *et al.*, 2014) and possess analgesic and anti-inflammatory properties (CARVALHO *et al.*, 1996), in addition to healing activity in goat skin lesions (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Furthermore, in relation to these properties of the secondary metabolites of this plant, an *in vitro* study using the methanol extract obtained from *L. ferrea* proved a reduction in the size of the lesions (42.78%), low parasitic load and significant reduction of viable promastigotes of *L. amazonensis* and potential inhibition of amastigotes of *L. amazonensis* and *L. guyanensis* (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017).

Subsequently, these dichloromethane fractions of the methanol extract of *L. ferrea* were incorporated into a microemulsified system for topical evaluation *in vivo*. Three substances were isolated from the DCM fraction, and methyl gallate and a phenylpropanoic acid derivative were identified. The substances showed antileishmanial activity against promastigote forms and effectiveness in topical treatment *in vivo* (JENSEN, 2020).

The DCM fraction was used as a bioactive for the stimulation of cell proliferation of PBMCs from patients before and after treatment for CL in the study by Silva *et al.* (2021). The authors observed that the DCM had stimulatory action on the activation and lymphoproliferation of PBMCs, characterizing this bioactive substance as having an immunomodulatory response to infections by *Leishmania* sp., which causes CL. From the cytokine dosage data evaluated in this study, it was found that DCM is a bioactive substance that induces the production of inflammatory cytokines (Figure 2B). In this sense, this corroborates the findings of Jensen (2020) and Comandolli-Wyrepkowski *et al.* (2017), and *L.*

ferrea is a phytopharmaceutical candidate for the alternative treatment of cutaneous leishmaniasis (SILVA *et al.*, 2021).

In the lymphoproliferation results analyzed in this study, LFME also positively induced ($\geq 81\%$) the proliferation of PBMCs extracted from patients before and after treatment for CL (Figure 1B). It is worth remembering that lymphocyte proliferation is crucial to the control of *Leishmania* sp. infection. (BRASIL, 2017). In relation to cytokine dosage, the DCM fraction showed induction of IL-1 β in patients with primoinfection compared to the healthy individuals (Figure 2I), which is a result similarly found by Silva *et al.* (2019) in which plasma levels of IL-1 β were higher in patients compared to the controls and it was observed that low levels of cytokine IL-1Ra and genotype rs 16944 C/C seem to confer susceptibility to infection by *L. guyanensis*, in populations of the Amazon.

Dendritic cell-derived IL-1 α/β plays a critical role in inducing T helper type 1 (Th1)-dependent immunity against *Leishmania*. Thus, a complex regulation of several members of the IL-1 cytokine family mediated by effects in dendritic cells and T cells contributes critically to the failure of the vaccine against this important human pathogen (KAUTZ-NEU *et al.*, 2011).

Interleukin 6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine, which, when produced under normal conditions, helps in the response to infections and tissue lesions, and contributes to host defense (MAERZ BUCKNER, 2018). In response to infection or tissue damage, IL-6 is readily synthesized and activates acute immune response, inducing differentiation of active B cells into antibody-producing plasma cells and also immature CD4⁺ T cells into effectors (KLAFKE, 2015). In our analyses, PBMCs of primoinfection patients showed elevated levels of IL-6 from the treatment using the DCM fraction (Figure 2H). The significant production of this cytokine induced by the Th17 profile may favor clinical cure in patients with CL (ALMEIDA, 2013).

Thus, our results suggest that the substances derived from *L. ferrea* can induce strong lymphoproliferative action and stimulate the production of inflammatory cytokines, as well as having potential antileishmanial activity. As such, we suggest the continuity of studies with the DCM fraction, given its most expressive results already shown in a previous study (SILVA *et al.*, 2021) in order to better delineate its effect on the immune system.

5. CONCLUSION

In this study, the bioactive substance evaluated herein demonstrated strong induction (80%) of lymphoproliferative activity compared to the positive control PHA. Likewise, it is suggested that there was stimulation of the proliferation of T lymphocytes *in vitro*, potentiating, in this

way, the cellular immune response. In addition to these findings, the evaluation of cytokine levels may indicate that patients produced acute-phase inflammatory cytokines, as well as for cellular immune response. It is suggested that the stimulation of these bioactive substances in the clinical evolution of these patients may be related to diverse mechanisms of interaction between two different response profiles, for example, Th1 and Th17. Further studies should evaluate the potential effect of these bioactive substances on immunoregulation by quantifying other cytokines for a broader analysis. Our work generates perspectives for new studies with these bioactive substances considering their potential as future leishmanicidal candidates for alternative treatments.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas- FAPEAM (POSGRAD) for financial support, Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis for its collaboration with the spectrophotometry experiments, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) and Dr. Francesco Tisato and Dr. Marina Porchia, who were responsible for the synthesis of the copper complex and for providing the molecule.

REFERENCES

- Almeida, N.C.O.S.; et al. [Libidibia ferrea \(juca'\) anti-inflammatory action: A systematic review of in vivo and in vitro studies](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259545). PLoS ONE 16(11): e0259545 (2021). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259545>.
- Barros, A. O. et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of libidibia ferrea bark and fruit extracts. [International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences](#), [S. l.], v. 6, n. 11, p. 71–76, 2014.
- Bankoti, R.; Stager, S. [Differential Regulation of the Immune Response in the Spleen and Liver of Mice Infected with Leishmania donovani](#). Hindawi Publishing Corporation Journal of Tropical Medicine Volume 2012.
- Brasil. Ministério da Saúde. [Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar](#). Secretária de Vigilância em Saúde. 1 ed. Brasília, Ministério da Saúde, 2017, 191 p.
- Brasil. Ministério da Saúde. [Miltefosina para o tratamento de leishmaniose tegumentar](#). Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos. N. 365. Brasília, CONITEC, 2018. 34 p.

- Carvalho, J.C.T. et al. [Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract](#). J Ethnopharmacol 53:175–178 doi: 10.1016/0378-8741(96)01441-9, 1996.
- Comandolli-Wyrepkowski, C. D. et al. [Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of in vitro and in vivo tests](#). Acta Amazónica, v.47, n. 4, p. 331-340, 2017. doi: 10.1590/1809-4392201700871
- Chagas, A. F.; Marina, P.; Nascimento, T. P.; Correa, C. N. S.; Brasil, A. M.; Franco, A. M. [In vitro and in vivo activity of a hypotoxic copper\(I\) complex against dermatotropic leishmania species](#). Acta Amazonica, v. 51, n. 3, p. 260-269. 2021. doi: 10.1590/1809-4392202100920
- Chagas, A. F. et al. [In vitro evaluation of antileishmanial activity of copper\(I\) complexes](#). Acta Brasiliensis. Acta Brasilienses. Manaus, v. 5, n. 1, p. 1-6. jan. 2021. doi: 10.22571/2526-4338474
- Cunha, A. L.; Moura, K. S.; Barbosa, J. C.; Santos, A. F. [Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo](#). Diversitas Journal, v.1, n. 2, p. 175-181, mai./ago. 2016. doi: 10.17648/diversitas-journal-v1i2.332
- Duncan, C.; White, A.R. [Copper complexes as therapeutic agents](#). Metallomics, 4, 127–138, 2012. Doi: 10.1039/c2mt00174h
- Gandin, V. et al. 2014. [In vitro and in vivo anticancer activity of copper\(I\) complexes with homoscorpionate tridentate tris\(pyrazolyl\)borate and auxiliary monodentate phosphine ligands](#). Journal of Medicinal Chemistry, 57: 4745-4760.
- Gonçalves-de-Albuquerque S. D. et al. [The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis](#). Frontiers in Immunology, v. 8. 30 out. 2017. doi: 10.3389/fimm.2017.01437
- Hammer; Harper; Ry Hammer, Ø.; Harper, D.A.T.; P. D. Past: [Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis](#). Paleontologia Electronica, v.4, n.1, p. 1-9, 2001.
- Ikeogu, N. M. et al. [Leishmania Immunity: Advancing Immunotherapy and Vaccine Development](#), Microorganisms, v. 8, p. 1- 21, ago. 2020.
- Jensen, B. B. [Avaliação da fração diclorometano de *Libidibia ferrea* \(Fabales: Fabaceae\) em estudos Pré-clínicos da Leishmaniose cutânea](#). 2020. 149 f. Tese (Doutorado em Coordenação de pesquisas em sociedade, ambiente e saúde) - COSAS, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia - INPA, Manaus 2020.
- Jones B.E.; Maerz M.D.; Bucker J.H. [IL-6: a cytokine at the crossroads of autoimmunity](#). Current Opinion in Immunology. v. 55 p.9-14, dez. 2018; doi: [10.1016/j.coi.2018.09.002](#)

- Lima, V. N.; et al. [Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol](#). *Microbial Pathogenesis*, v.99, p.56-61, 2016.
- Marzano, C. et al. [In vitro antitumor activity of the water soluble copper\(I\) complexes bearing the Tris\(hidroxymethyl\)phosphine ligand](#). *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 51, p. 798-808, 2008.
- Marzochi, M. C. [Leishmaniose visceral: cenários epidemiológicos e desafios](#). *Revista do Instituto Adolfo Lutz, [S. l.]*, v. 77, p. 158-165, 2018. DOI: 10.53393/rial.2018.v77.34197.
- Moreira, A.V.B.; Mancini-Filho, J. [Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos](#). *Rev. Nutr.*, Campinas, 17(4):411-424, out./dez., 2004.
- Mjos, K. D.; Orvig, C. [Metallo drugs in Medicinal Inorganic Chemistry](#). *Chem. Rev.*, v. 114, n. 8, p. 4540-4563. 2014.
- Mushtaq, S.; Abbasi, B.H.; [Uzair, B.; Abbasi, R. Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents](#). *EXCLI Journal* 17:420-451 – ISSN 1611-2156, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.17179/excli2018-1174>
- Oliveira, D. K., Silva Soares, M. E., Brito, K. M., Lira, E. S. e Rocha, F. J. [Aspectos imunológicos das leishmanioses dermatrópicas e viscerotrópicas](#). *RUC*, Montes Claros, v. 23, n. 2, p. 1-14, jul./dez. 2021. doi: 10.46.551/ruc.v23n2a03
- Oliveira, A.F. et al. [Avaliação da atividade cicatrizante do jucá \(Caesalpinia ferrea Mart. ex Tul. var. ferrea\) em lesões cutâneas de caprinos](#). *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.12, n.3, p.302-310, 2010.
- PORCHIA, M. et al. [In vitro antitumor activity of water-soluble copper\(I\) complexes with diimine and monodentate phosphine ligands](#). *Arabian Journal of Chemistry*, v. 13, p. 998-1010. 2020.
- Rocha, T. M.; Silveira, M. B.; Quixabeira, V.B. [Leishmaniose tegumentar americana em humanos: uma revisão dos aspectos envolvidos na doença](#). *Saúde e ciência em ação* Goiânia, v.5, n. 01, p. 1-13, jan./dez., 2019.
- Rossi D., Zlotnik, A. [The biology of chemokines and their receptors](#). *Annu. Rev. Immunol*, 18:217–242, 2000.
- Sato, C. M. [Diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar americana causada por espécies diferentes de Leishmania](#). 2017. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

- Silva, E. O. et al. [Evaluation of the lymphoproliferation of mononuclear cells in cutaneous leishmaniasis patients treated with *Leishmania ferrea*](#). Acta Brasiliensis, Manaus, 5(3): 97-102, 2021, set. 2021. doi: [10.22571/2526-4338560](#)
- da Silva, G.A.V. et al. [A polymorphism in the IL1B gene \(rs16944 T/C\) is associated with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis* and plasma cytokine interleukin receptor antagonist](#). Cytokine. 2019 Nov; 123:154788. doi: 10.1016/j.cyto.2019.154788. Epub 2019 Jul 26. PMID: 31357078.
- Shim, H.; Harris. Z.L. [Genetic defects in copper metabolism](#). J Nutr. 2003 May;133(5 Suppl 1):1527S-31S. doi: 10.1093/jn/133.5.1527S.
- Taghipour, A. et al. [Leishmaniasis and Trace Element Alterations: a Systematic Review](#). Biological Trace Element Research, 199, 3918-3938, jan, 2021. doi: [10.1007/s12011-020-02505-0](#)
- Tisato, F. et. al. [The relationship between the electrospray ionization behaviour and biological activity of some phosphino Cu\(I\) complexes](#). Rapid Communication in Mass Spectrometry, v.24, n.11, p. 1610-1616. 2010.
- Van Weyenbergh, J. et. al. (2004) [Zinc/copper imbalance reflects immune dysfunction in human leishmaniasis: na ex vivo and in vitro study](#). BMC Infect Dis 4(1):50.
- Varol, M. [The Importance of Metal-Based Drugs in Medicinal Inorganic Chemistry to Improve Life Quality of Patients](#). Journal of Applied Pharmacy, v. 8, n. 1, p. 1000e107. 2016.
- Kautz-neu, K. et al. [Langerhans cells are negative regulators of the anti-*Leishmania* response](#). The Journal of Experimental Medicine, v. 208, n. 5, p. 885-891.
- Klafke, K. [Determinação do papel das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 na proliferação, resistência quimioterápica e invasão celular em glioblastoma humano](#). 2015. 60 f. TCC (Graduação), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- Kobayashi, Y. T. et al. [Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá \(*Leishmania ferrea*\) em ratos Wistar](#). Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, São Paulo, v. 52, n. 1, p. 34-40, 2015.
- Kocyigit, A.; Gur, S.; Erel, O.; Gurel, M. S. [Associations among plasma selenium, zinc, copper, and iron concentrations and immunoregulatory cytokine levels in patients with cutaneous leishmaniasis](#). Biological Trace Element Research, v. 90, p. 9, abril 2002.
- Kumar, R.; Bumb, R. A.; Salotra, P. [Evaluation of localized and systemic immune responses in cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*: interleukin-8, monocyte chemotactic protein-1 and nitric oxide are major regulatory factors](#). Immunology The Journal of Cells Molecules Systems and Technologies, v. 130, p. 193-201, nov 2010.

Zeni, A. L., Parisotto, A. V., Mattos, G. e Santa Helena, E. T. [Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na atenção primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil](#). 2016. 10 f. Artigo de pós-graduação, Universidade Regional de Blumenau (FURB), Santa Catarina, 2016. doi: 10.1590/1413-81232017228.18892015

Zoroddu, M. A.; Aaseth, J. Crisponi, G. Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M. [The essential metals for humans: a brief overview](#). Journal of Inorganic Biochemistry, v. 195, p. 120-129. 2019.

7 CAPÍTULO 3

Resposta Imune *in vitro* de pacientes com Leishmaniose cutânea frente a frações antigênicas solúveis de *leishmania* sp

Erika Oliveira da Silva^{1,2}, Paula Figliuolo Borges², Francimeire Gomes Pinheiro², Heriederson Sávio Dias Moura³, Bruno Bezerra Jensen², Adriana Malheiro⁴, Luíz Fernando Marques Vasconcelos⁵, Alysson Guimarães da Costa⁴, Alexander Leonardo Silva-Junior⁴, Adriano Nobre Arcos⁶, Thaís Tibery Espir⁵, Antonia Maria Ramos Franco²

¹Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas.

²Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

³ Programa de Pós-Graduação Enfermagem em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 14040-902, São Paulo, Brasil.

⁴Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, HEMOAM.

⁵Laboratório de Histologia, Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas.

⁶Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

⁷Laboratório de Hidrologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença tropical infecciosa que afeta principalmente pessoas de maior vulnerabilidade social em países subdesenvolvidos. E por não receberem investimentos necessários para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das principais doenças negligenciadas, que vem apresentando crescimento exponencial no Brasil, com casos em todas as Unidades Federadas. Dentre as regiões mais acometidas, a região Norte apresentou um dos maiores números de casos nos últimos anos. Com relação a este, dois municípios do Amazonas correspondem aos mais endêmicos do Brasil, sendo um destes, Rio Preto da Eva. Seu espectro clínico, diversidade epidemiológica e conhecimento ainda pouco esclarecido sobre alguns aspectos contribui para sua complexidade e dificulta o seu controle. Associado a esses fatores a manifestação clínica da doença depende não apenas da espécie envolvida, mas também da resposta imune do indivíduo, o qual também pode ser influenciado pelas moléculas contidas na saliva do vetor. Apesar de ainda não bem esclarecido em humanos, a sobrevivência e persistência do parasito estão relacionados ao perfil de citocinas e proliferação de células T, relacionando-se o perfil Th1 a cura e ao perfil Th2 a progressão da doença. Uma das espécies de maior circulação na região, a *Leishmania amazonensis* é responsável pela forma cutânea-difusa, que é caracterizada por ausência de resposta imune Th1, levando a susceptibilidade. Por outro lado, a *Leishmania guyanensis* apesar de causar lesões ulceradas cutâneas predominantemente, pode também ocasionar lesão na mucosa. No que tange a terapêutica, a mesma é preconizada a mais de meio século, com o uso dos antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}). Contudo, apresentam uma série de problemas, que vão desde a via de aplicação a toxicidade. Considerando a problemática e a imponente necessidade de estudos voltados para as espécies de maior circulação na região, este estudo teve como objetivo analisar a imunogenicidade de antígenos solúveis de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, a fim de compreender e fornecer subsídios quanto a indução da linfoproliferação e produção de citocinas inflamatórias de PBMC *in vitro* de pacientes oriundos de Rio Preto da Eva, portadores de LC. A linfoproliferação foi avaliada frente a estímulos de SLA de *L. amazonensis* (100 $\mu\text{g/mL}$), SLA de *L. guyanensis* (100 $\mu\text{g/mL}$) e Phytohemagglutinin - PHA (10 $\mu\text{g/mL}$) utilizando *BrdU Cell Proliferation ELISA Kit* após 72h de incubação. A quantificação das citocinas IL-6, IL-8 e IL-1b foi realizada por BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit. Os resultados mostraram que os antígenos de leishmania avaliados apresentaram ação indutora na linfoproliferação, entretanto apenas frente ao SLA de *L. guyanensis* houve significância estatística. Esses antígenos induziram aumento nos níveis de citocinas inflamatórias antes do tratamento e após tratamento esses níveis diminuíram para concentrações basais, podendo estar relacionado com mecanismo imunológico de regulação.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea; linfoproliferação; citocinas; *Leishmania amazonensis*; *Leishmania guyanensis*.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses que compreendem um grupo de doenças negligenciadas, causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* (*Kinetoplastida, Trypanosomatidae*) (VASCONCELOS *et al.*, 2018). No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta grande diversidade de agentes, reservatórios e vetores, o que a torna de difícil controle (BRASIL, 2017). No Amazonas as espécies de maior ocorrência são a *Leishmania guyanensis*, *Leishmania naiffi* e *Leishmania amazonensis* (CHAGAS *et al.*, 2006; PEREIRA, 2003; FIGUEIRA, *et al.*, 2008; 2014).

Quanto às manifestações clínicas relacionadas às espécies circulantes na região, a *L. amazonensis* está envolvida com a forma difusa da doença, uma forma rara, porém grave, caracterizando-se por nódulos e lesões em placas infiltradas de maneira difusa pelo tegumento, em pacientes anérgicos a antígenos de *Leishmania*, sendo de difícil tratamento (SILVEIRA *et al.*, 2004; 2008; 2009; COSTA *et al.*, 2009). Já a *L. guyanensis* causa lesões ulceradas cutâneas únicas ou múltiplas, que podem ser ocasionadas por picadas simultâneas de vários flebótomos fêmeas infectados ou por metástases linfáticas secundárias (BRASIL, 2017).

O diagnóstico baseia-se primariamente na anamnese, avaliação clínica das lesões e conhecimentos acerca da epidemiologia (GOMES *et al.*, 2014) e para confirmação é utilizado o exame direto, através da escarificação da lesão, bem como através de métodos sorológicos, histopatológicos, cultura, inóculo em animais e Reação em cadeia de Polimerase (PCR) (BRASIL, 2017; CERUTII *et al.*, 2017).

A farmacoterapia preconizada pelo Ministério da saúde (MS) para esta doença, envolve os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}) a mais de meio século (CARVALHO *et al.*, 2019). Contudo, há uma série de efeitos colaterais e adversos graves ao sistema cardiovascular, renal, hepático e pancreático (TEIXEIRA, 2021).

Além disso, em virtude da sua complexidade, em humanos a resposta imune frente a infecção ainda não é bem esclarecida. Mas ao que se sabe, a evolução clínica da doença, envolve uma rede de cooperação entre citocinas, moléculas co-estimuladoras e ao perfil de células T, que de modo geral, é associado ao perfil Th1 a cura e ao perfil Th2 a progressão da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a imunidade a leishmaniose depende de vários fatores, que variam desde a espécie do parasito às diferenças genéticas dos hospedeiros, que associados ao perfil de células T e a produção de citocinas que atuam na proliferação do subtipo celular, são cruciais para determinar a clínica da doença (SILVA, 2016).

Na Leishmaniose Visceral, modelo mais bem estudado, os pacientes apresentam alta concentração de citocinas e observa-se a interação de perfis imunológicos na fase ativa da doença, denominada “tempestade de citocinas”, dos tipos Th1, Th2, Th17 e T Regulador (Treg) (DUTHIE *et al.*,2014).

Dentre esse *network* de citocinas, a IL-1b foi descrita como essencial no controle da infecção por *Leishmania* sp. por induzir a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos, via ativação de inflamassoma (LIMA *et al.*,2013), além de induzir a produção de IL-6, envolvida em processos de regulação da imunidade inata e adaptativa e, em conjunto o aumento de IL-8, que modula o recrutamento de outros tipos celulares, dando início ao processo inflamatório (SANTOS *et al.*,2016; MAYADAS *et al.*,2013)

Desse modo, A fim de compreender a imunogenicidade dos antígenos solúveis de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* frente a resposta imune, este estudo teve como objetivo avaliar a linfoproliferação e produção de citocinas de pacientes com LC antes e após tratamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de antígeno solúvel

Os antígenos solúveis de *Leishmania* (SLA) utilizados nos ensaios de estimulação celular foram obtidos a partir de massa parasitária de formas promastigotas de *L. guyanensis* (MHO/BR/75/IM4147) e *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8). De acordo com o protocolo para a obtenção dos antígenos, foi realizada a centrifugação a 2168 xG da massa parasitária por 15 minutos, seguida das lavagens do sedimento com PBS (Tampão fosfato-salino). Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspensão em solução salina e adicionado o inibidor de protease. A extração dos antígenos foi executada por meio de choques térmicos com congelamento e descongelamento, seguida de nova centrifugação a 21.952 xG por 30 minutos. O sedimento foi desprezado e através do sobrenadante foi realizada a determinação proteica por espectrofotometria, segundo método de *Bradford* (Bradford, 1976), seguidamente diluído a 10µg/µL em RPMI e conservado a -80 °C, em pequenas alíquotas.

Aspectos éticos

Este trabalho tem aprovação pelo Comitê de ética em Pesquisa com seres humanos (CEP) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) - CAAE/UFAM: 29406319.2.0000.5020.

Todos os voluntários/participantes atendidos neste projeto, que aceitaram participar do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

População amostral

As amostras biológicas utilizadas neste estudo foram obtidas de 30 participantes que buscaram atendimento em uma Unidade Básica de Saúde (UBS) localizada no município de Rio Preto da Eva - RPE (3°07'06"S, 59°W), Amazonas - AM, Brasil.

Os participantes incluídos neste estudo foram organizados em três grupos: dez pacientes antes do tratamento, primoinfectados diagnosticados com LC; dez pacientes após tratamento, com lesões cicatrizadas e tratamento concluído e o grupo Controle Negativo, formado por dez indivíduos saudáveis, sem histórico de LC e residentes de áreas não endêmicas (Silva et al., 2021).

Durante os atendimentos, os participantes primoinfectados passaram, previamente, por exame físico e o diagnóstico para LC foi através da detecção de amastigotas de *Leishmania* sp., a partir da escarificação da borda interna da lesão e esfregaço corado com Kit Panótico rápido (Laborclin®). Amostras coletadas foram inoculadas em meios de cultivo NNN (Neal, Novy e Nicolle) para confirmação parasitológica das formas promastigotas do parasito.

Coleta de amostras de sangue e extração de PBMC

Os participantes foram submetidos à coleta de 8 mL de sangue periférico. As amostras foram armazenadas em tubos Vacutainer® heparinizados até serem transferidas para tubos de centrifugação, onde foram diluídas em meio RPMI completo (1:1) e adicionado 8mL de Histopaque® - 1077. Após centrifugação a 542 xG por 30 minutos, as células mononucleares periféricas (PBMCs) foram coletadas e transferidas para tubos de centrifugação, lavadas duas vezes com meio RPMI e centrifugadas a 363 xG por 10 minutos a 4°C. As PBMCs foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI completo e contadas em câmara de Neubauer com azul de Trypan. A concentração das PBMC foi ajustada para 2×10^5 células/mL em meio RPMI completo.

Ensaio de proliferação celular

Em placas para cultivo com 96 poços de fundo chato, as PBMCs obtidas foram organizadas em triplicatas, com 100 µL/poço [2×10^5], onde cada uma delas recebeu,

separadamente, antígeno solúvel de *L. amazonensis* [100 µg/mL]; e antígeno solúvel de *L. guyanensis* [100 µg/mL]. Como controle positivo de resposta linfoproliferativa, foi utilizado a Phytohemagglutinin - PHA [10 µg/mL e como controle negativo, triplicata de células que não receberam nenhuma estimulação, apenas meio RPMI.

O ensaio de linfoproliferação foi realizado de acordo com os procedimentos de Silva *et al.* (2021), seguindo o protocolo do do fabricante (*BrdU Cell Proliferation ELISA Kit, Biotrak, Amersham, UK*).

Obtenção de sobrenadante de cultura para identificação das citocinas

Após o período de incubação das placas de proliferação celular, foi realizada centrifugação a 542 xG por 15 minutos e posteriormente os sobrenadantes da cultura foram coletados e estocados a -80°C para posterior dosagem de citocinas.

Dosagem de citocinas secretadas nos sobrenadantes de cultura

Os níveis de citocinas IL-6, IL-8 e IL-1b foram quantificados utilizando o BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram adquiridas em um FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), e o software FCAP-Array v3 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) foi utilizado para análise dos dados. Os dados foram relatados em picogramas por mililitro (pg/mL), de acordo com as curvas padrão fornecidas nos kits.

Análise estatística

Foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk, em seguida as análises de Kruskal-Wallis foram realizadas para comparações entre os grupos de pacientes, e Mann-Whitney para comparações entre os grupos de bioativos utilizados, com utilização do software estatístico PAST versão 4.0 (Hammer et al., 2001). A significância foi definida com base nos valores de $p < 0.05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

RESULTADOS

Aspectos epidemiológicos

Um total de dez pacientes com primoinfecção foram avaliados cumprindo os critérios de faixa etária, gênero, número de lesões, localização da lesão, características da lesão e tamanho da lesão, conforme descritas na tabela 1. Os participantes apresentavam LC ativa e corresponderam aos critérios de inclusão e exclusão, sendo nove do gênero masculino e um do gênero feminino. A faixa etária variou de 18 a 36 anos com média de 27,4 anos.

Apenas um paciente apresentou a forma úlcero crostosa com lesões satélites localizada no tronco, e um com forma nodular com crosta também localizado na mesma superfície corporal, todos os outros pacientes apresentaram lesão ulcerada, distribuídas nos membros superiores ou inferiores. Em relação ao número de lesões, 60% apresentaram apenas uma lesão, 20% apresentaram duas lesões e com 4 e 5 lesões foi 10% cada. A média do tamanho da lesão expressa em cm foi de 1,45 cm. O tempo de evolução da doença, ou seja, do aparecimento da doença até a procura ao sistema de saúde mais próximo do município, variou de um mês até 12 meses.

Tabela 1. Características dos pacientes primoinfectados com Leishmaniose Cutânea (LC), atendidos em Rio Preto da Eva, AM, Brasil, durante março e maio de 2020.

Código da Amostra	Sexo	Nº de lesões	Localização da lesão	Características da lesão	Tamanho da lesão (cm)
MHOM/BR/20/IM6220	M	01	Tronco	Úlcero crostosa com lesões satélites	1,0
MHOM/BR/20/IM6221	M	02	Tronco	Nodular com crosta	1,0
MHOM/BR/20/IM6224	M	02	MI e MS	Ulcerada	1,4
MHOM/BR/20/IM6227	M	02	Glúteo D	Ulcerada	0,8
			Glúteo E		1,3
MHOM/BR/20/IM6228	M	04	MSE	Ulcerada	1,0
			MIE		
MHOM/BR/20/IM6229	M	02	MIDA	Ulcerada	1,8
			MIDP		1,7
MHOM/BR/20/IM6230	M	05	MMII	Ulcerada	2,8
					1,2
					1,5
					1,5
					0,8
MHOM/BR/20/IM6232	M	02	MMII	Ulcerada crostosa	1,4
					1,0
MHOM/BR/20/IM6234	F	02	MIE	Ulcerada	1,1
			QPE		1,1
MHOM/BR/20/IM6243	M	01	MIE	Ulcerada	3,7

Legenda: Pacientes (HOM: *Homo sapiens*; BR: Brasil; 2020; IM: código de registro); M: Masculino; F = Feminino; MI = Membro Inferior; MS = Membro Superior; D = Direito; E = Esquerdo; MSE = Membro Superior Esquerdo; MIE = Membro Inferior Esquerdo; MIDA = Membro Inferior Direito Anterior; MIDP = Membro Inferior Direito Posterior; MMII = Membros Inferiores; QPE = Quadrante Posterior Esquerdo.

Em relação às formas clínicas observadas nesse estudo, a grande maioria apresentou a forma cutânea localizada com lesões ulceradas. No entanto, a categorização clínica dermatológica das lesões leishmanióticas é fundamentada em critérios bem definidos (TALHARI *et al.* 1988; GUERRA *et al.* 2003; NAIF JÚNIOR *et al.* 2009). Todavia está sujeita à interpretação pessoal do examinador, podendo dar-se um certo nível de subjetividade.

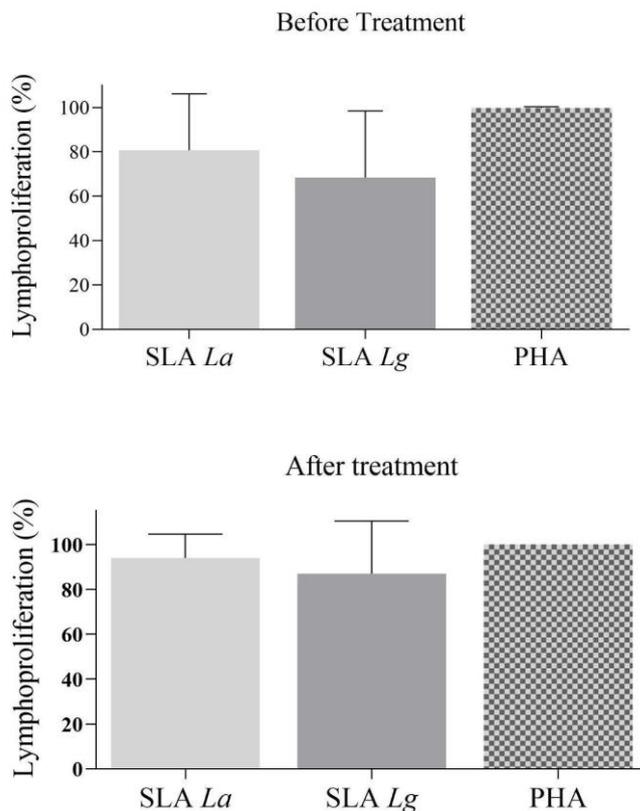
Entretanto, Figueira *et al.* (2008), ao caracterizarem por isoenzimas isolados de pacientes com leishmaniose oriundos de Rio Preto da Eva, identificaram que os pacientes que apresentaram lesões de formas clínicas ulceradas únicas ou múltiplas foram ocasionados por *L. guyanensis*.

Ensaio de linfoproliferação celular

A resposta linfoproliferativa de PBMCs frente ao estímulo de antígenos solúveis de *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e ao mitógeno PHA (10 μ g/mL) foi expressa em taxas elevadas ($\geq 70\%$) (Figura 1). O estímulo com SLA *L. amazonensis* não foi estatisticamente significativo nos grupos testados, embora tenha induzido maiores níveis da linfoproliferação nas PBMCs dos pacientes ($\geq 80\%$) quando comparado com os antígenos solúveis de *L. guyanensis* (Figura 1).

No estímulo com SLA *L. guyanensis* houve significância estatística ($p=0,01$) e elevados níveis de proliferação de PBMCs ($\geq 75\%$) para todos os grupos de voluntários avaliados. Estatística significativa foi verificada entre os pacientes primoinfectados e após tratamento ($p=0,01$) e controle negativo ($p=0,03$).

Como controle positivo foi utilizado o mitógeno PHA, e em resposta a ele as PBMC de todos os grupos apresentaram forte indução da linfoproliferação (100%), sugerindo, desse modo, a indução da resposta imune pelo mitógeno.



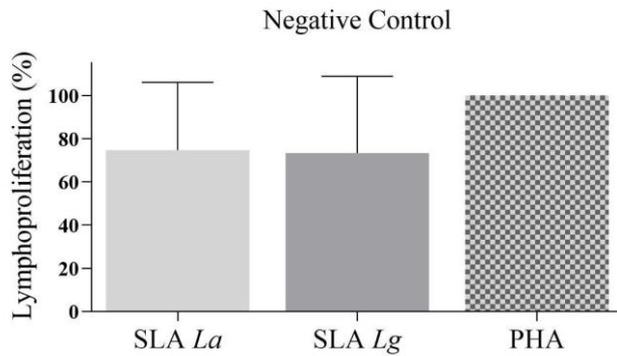


Figura 1. Linfoproliferação de PBMC de voluntários atendidos em Rio Preto da Eva, AM, Brasil, durante março e maio de 2020. PBMCs sensibilizadas com antígenos solúveis de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*. SLA: Antígenos solúveis; PHA: fitohemaglutinina; Linhas verticais representam o desvio padrão; Linhas horizontais representam a significância estatística entre tratamentos ($p < 0,005$).

Produção de citocinas após estímulo de PBMC com SLA de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*

Ao avaliar os níveis das citocinas em função dos antígenos de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, os resultados demonstraram que os pacientes antes do tratamento produziram níveis aumentados de IL-6 e IL-8 em relação ao pós-tratamento. A diferença significativa ocorreu entre os grupos quanto à produção de IL-6 ($p=0,01$) e IL-1b (0,04) frente ao antígeno de *L. guyanensis*.

Nos níveis de IL-1b houve diferença significativa no grupo do pós tratamento em relação ao controle negativo ($p=0,01$) nas PBMCs estimuladas por antígenos de *L. guyanensis*, embora a concentração desta citocina tenha sido maior antes do tratamento, porém sem diferença estatística apontada.

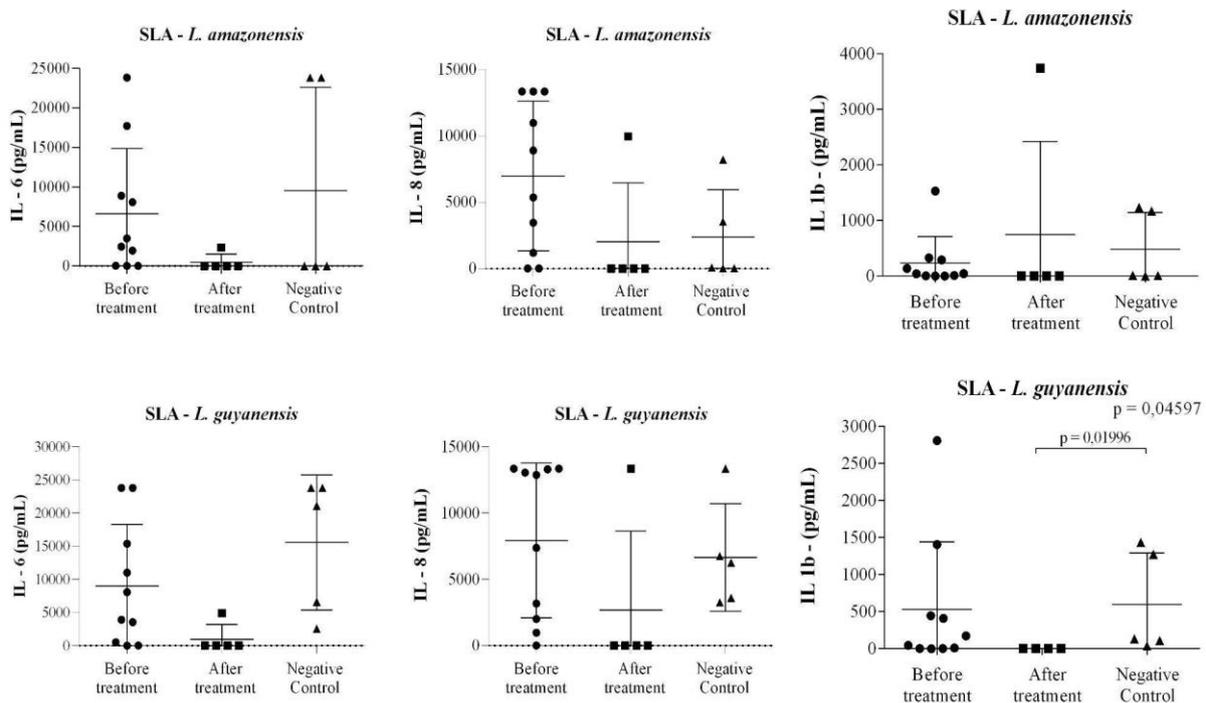


Figura 2. Níveis de IL-8, IL-6, IL-1 β (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de PBMCs extraídas de pacientes voluntários antes e após tratamento convencional para LTA e em indivíduos sadios (controle negativo), atendidos em Rio Preto da Eva, AM, Brasil, durante março e maio de 2020. PBMCs sensibilizadas com antígenos solúveis de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*. As médias (linhas horizontais) são mostradas para cada grupo de pacientes. SLA: antígenos solúveis.

DISCUSSÃO

O que se sabe até o momento, é que as leishmanioses estão na lista das dez doenças negligenciadas estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e numa visão preocupante, o Brasil está entre os sete países que concentram 90% dos casos de leishmaniose (LINDOSO e LINDOSO, 2009; ALVER *et al.* 2012). Neste cenário, as Américas correspondem às maiores taxas de incidência da doença com 16.813 notificações, somente para o ano de 2020 (DATASUS, 2022).

No Brasil, a região Norte é protagonista em números de casos (8.060) e, de acordo com os dados da estratificação de risco da LTA por município no período de 2018 a 2020, dois municípios do estado do Amazonas estão em primeiro e segundo lugares no ranking do estrato de risco muito intenso, são eles, Presidente Figueiredo com média de casos de 235,33 e média de incidência de 649,30 e Rio Preto da Eva com média de casos de 221,00 e média de incidência

de 662,97. A capital Manaus apresenta os seguintes valores, média de casos de 347,00 e média de incidência de 15,90, exibindo estrato de risco baixo (MS, 2022).

Todos os pacientes participantes foram oriundos do município do Rio Preto da Eva, área endêmica da região metropolitana de Manaus, e os controles negativos da capital do estado. Na dinâmica da ocorrência da LTA neste estudo, o gênero masculino foi o mais acometido, caso muito típico não somente nesta região, mas também em outras áreas do Nordeste (Rodrigues et al. 2006) e Sudeste (URSINE *et al.*, 2021). Para Guerra *et al.* (2019), essa ocorrência é peculiar do comportamento endêmico da doença, a qual acomete, predominantemente indivíduos do gênero masculino, na faixa etária dos jovens adultos (20-32), porque estão em intensa atividade produtiva (caça, desmatamentos em florestas e em atividades agrícolas).

No que tange os aspectos imunológicos, a resposta imune celular é o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra a *Leishmania* sp., e a produção de citocinas é crucial para o desenvolvimento da resposta imune e controle do parasito (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Mas, para isto, é necessário a ativação eficiente de células T, além de uma imunorregulação inflamatória para manter a integridade do tecido do hospedeiro (ANTONELLI, LR *et al.*, 2004).

Desse modo, a resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania* sp. está associada com o nível de expansão de células Th1 e Th2 (PIRMEZ *et al.*, 1993; BACELLAR *et al.*, 2002). A interação entre antígeno e o receptor de célula T (TCR) culmina na proliferação, diferenciação e produção de citocinas, estas medeiam as funções de células T efetoras. Assim, o ensaio de linfoproliferação é um dos modelos utilizados para avaliar a atividade imunomodulatória (ZANDONAI, 2007; PANDIMA DEVI *et al.*, 2003).

Nesse contexto, segundo Bacellar et al. (2002), todas as formas clínicas da LTA são dependentes de células T e uma resposta imune exagerada a antígenos de *L. amazonensis* desempenha papel crucial na patogênese da leishmaniose mucosa (LM).

Nessa perspectiva, Telino *et al.*, (2006) utilizando antígenos totais de *L. braziliensis* demonstraram que houve elevada proliferação em relação ao antígeno total de *L. amazonensis*. Esse resultado foi explicado pelo fato de os pacientes estarem infectados por *L. braziliensis*. Com relação aos antígenos de *L. amazonensis*, a resposta linfoproliferativa foi significativamente mais elevada com o antígeno total, comparado-se com a fração antigênica solúvel. Em nossos resultados com antígenos solúveis de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, foi observado forte indução da linfoproliferação, embora não se saiba por quais espécies esses participantes estavam infectados. De acordo com Figueira *et al* (2014), o município de Rio

Preto da Eva é área endêmica no predomínio de *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. naiffi*, respectivamente.

No que tange a produção de citocinas, Stager *et al.*, (2005) observaram que a IL-6 apresentou papel terapêutico na *Leishmania donovani*, influenciando a capacidade das células dendríticas para regular o desenvolvimento de células T CD4⁺

Ao avaliar a atuação dessa citocina frente a leishmaniose visceral (LV), Silva (2016) constatou que animais de experimentação deficientes de IL-6 apresentaram susceptibilidade e maior carga parasitária nos órgãos alvos, devido à resposta inflamatória fraca. E que embora a IL-6 não interfere na proliferação de linfócitos Th1, esta citocina está relacionada a atuar no perfil Th17 no início da infecção, demonstrando que tem papel importante na modulação da resposta imune de neutrófilos em promover proteção na LV.

Em nossos resultados com o SLA de *L. guyanensis* foi observado aumento na indução da produção de IL-6 ($p=0,01$), quando comparado com a SLA de *L. amazonensis*. O aumento dos níveis dessa citocina também foi descrito por Costa (2017) com hemoculturas de pacientes em relação ao controle, associando a IL-6 a um papel imunopatogênico na forma cutânea localizada (LCL). Dentre as amostras de PBMCs dos pacientes deste estudo, conforme o descrito em Silva *et al.* (2021), 91.3% eram do tipo LCL.

Em relação a IL-8, foi observado que o SLA de *L. amazonensis* induziu níveis aumentados dessa citocina no grupo dos pacientes primoinfectados quando comparado ao pós tratamento. Esses resultados assemelham-se aos de Kumar e Salotra (2010), onde níveis aumentados de IL-8 foram observados nos pacientes antes do tratamento e após tratamento as concentrações dessa citocina foram restauradas aos níveis normais. Os autores sugeriram que a IL-8 em conjunto com TNF- α tem ação imunomoduladora na LC, mas que em níveis elevados pode ocasionar inflamação excessiva. O aumento dos níveis de IL-8 também foi maior quando comparados com a produção de IL-6, no entanto não houve diferença significativa entre os grupos. Campelo (2014) identificou que *L. amazonensis* exerceu um efeito imunomodulador sobre a resposta imune mediada por células de Langerhans (LCs), inibindo a produção de IL-6 (RODRIGUES, 2014). A inibição de IL-6 por *L. amazonensis* também foi descrita por Craig *et al.*, (2017), em culturas de macrófagos infectados durante 24h, cuja infecção parasitária suprime a produção de IL-6 em resposta a LPS/IFN γ .

Os mecanismos pelos quais os parasitos suprimem a produção de citocinas não são conhecidos, porém as moléculas contidas na saliva dos flebotomíneos, como proteínas, enzimas e prostaglandinas são apontadas como indutoras na supressão da resposta inflamatória e na modulação de citocinas (GILLESPIE *et al.*, 2000).

Badolato *et al.* (1996) em um dos estudos pioneiros com *Leishmania major*, modelo mais bem estudado a nível imunológico, mostraram que monócitos infectados induziram a produção de IL-8 e MCAF, mas não IL-1 β e TNF α . Os autores sugeriram que a expressão de quimiocinas pode contribuir para o recrutamento celular em lesões de *Leishmania*. No que diz respeito a IL-1 β , em nossos resultados, a produção desta citocina ocorreu em baixos níveis tanto frente a antígenos de *L. guyanensis* quanto a *L. amazonensis*.

Analisando a resposta linfoproliferativa frente ao estímulo dos antígenos, os pacientes, antes e após tratamento, apresentaram uma elevada resposta linfoproliferativa ($\geq 80\%$) e indução de níveis aumentados de citocinas inflamatórias nos pacientes antes do tratamento. Desse modo, foi demonstrado que esses antígenos solúveis induzem resposta imune celular, mas que esta resposta parece ser regulada após o tratamento, com a diminuição da produção dessas citocinas.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que os antígenos utilizados induziram forte ativação de linfócitos T nas PBMCs antes e após tratamento, mas diferença significativa só foi observada nos antígenos de *L. guyanensis*. Foi observado que os antígenos solúveis de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* induziram a produção de citocinas inflamatórias, mas que após o tratamento, os níveis dessas citocinas diminuíram consideravelmente. Assim, sugere-se que as PBMC dos pacientes induziram uma resposta imune celular frente às frações antigênicas solúveis avaliadas, podendo haver mecanismos regulatórios envolvidos. Contudo, para melhor elucidar os fatores relacionados à evolução clínica desses pacientes, faz-se necessário a continuidade com estudos futuros através da caracterização das espécies e dosagem de citocinas de diferentes perfis.

REFERÊNCIAS

ANTONELLI, L. R. V. et al. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical and experimental immunology**. Salvador, v. 136, n. 2, p. 341-8, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02426.x>. Acesso em: 15 de maio de 2022.

BACELLAR, O. et. al. Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. **Infection and immunity**, [S. l.], v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6734-6740.2002>. Acesso em: 15 de maio de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 1ª edição, Brasília, 2017.

CARVALHO, S. H. et al. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Trop Med Int Health**. [S. l.], v. 24, n. 4, p. 380-391, 2019. DOI:10.1111/tmi.13210. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30681239/>. Acesso em: 17 de maio de 2022.

CERUTTI, P. H. et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. Diagnostic methods of american cutaneous leishmaniasis: a literature review. **Revista de Patologia do Tocantins**. 2017, v. 4, n. 4, p. 55-59. DOI: 10.20873/uft.2446-6492.2017v4n4p55. Disponível em: <https://doi.org/10.20873/uft.2446-6492.2017v4n4p55>. Acesso em: 15 de maio de 2022.

COSTA, A. B. et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Rio de Janeiro, v. 106, n. 16, p. 6748-53, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0900226106. Epub 2009 Apr 3. PMID: 19346483; PMCID: PMC2672475. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2672475/>. Acesso em: 13 de maio de 2022.

DUTHIE, M. S.; REED, S. G. The Emergence of Defined Subunit Vaccines for the Prevention of Leishmaniasis. **Curr Trop Med Rep**. [S. l.], v. 1, p. 154-162, 2014. DOI: 10.1007/s40475-014-0024-9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40475-014-0024-9>. Acesso em 16 de maio de 2022.

FIGUEIRA, L. et. al. Caracterização isoenzimática de isolados humanos de Leishmania sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Vol. 41, n. 5, p. 512-514, 2008.

FIGUEIRA, L. et. al. Distribuição de casos de leishmaniose tegumentar no município De Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**. Goiânia, v. 43, n. 2, p. 173-181, 2014. DOI: doi:10.5216/rpt.v43i2.31137. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/iptsp/article/view/31137>. . Acesso em: 15 de maio de 2022.

GOMES, C. M. et al. Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Vol. 89, n. 5, p. 701-11, 2014. Disponível em: DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142389>. Acesso em: 13 de maio de 2022.

GUERRA, J. A. O. et al. Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia. **Rev Soc Bras Med Trop**. [S. l.], v. 36, p. 587-590, 2003.

GUERRA, J. A. O. Socioenvironmental aspects of the Purus Region - Brazilian Amazon: Why relate them to the occurrence of American Tegumentary Leishmaniasis? **PLoS One**. [S. l.], v. 14, n. 2, e0211785. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211785>. Acesso em: 18 de maio de 2022.

(HAMMER; HARPER; RY HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Paleontologia Electronica**, v.4, n.1, p. 1-9, 2001.

LINDOSO, J. A.; LINDOSO, A. A. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. [S. l.], vol. 51, n. 5, p. 247-253, 2009. Disponível em: DOI: 10.1590/S0036-46652009000500003. Acesso em: 15 de maio de 2022.
NAIF, J. R. D. et al. Estudo de uma série de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Rio Preto da Eva, Amazonas Brasil. **Revista de Patologia Tropical**. [S. l.], v. 38, n. 2, p. 103-4, 2009.

OLIVEIRA, D. K. F. de; et. al. Aspectos Imunológicos Das Leishmanioses Dermotrópicas E Viscerotrópicas. **Revista Unimontes Científica**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 1-14, 2021. DOI: 10.46551/ruc.v23n2a03. Disponível em: <https://www.periodicos.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/view/4554>. Acesso em: 16 de maio de 2022.

RODRIGUES, A. M., et al. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de melgumina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 139-145, 2006.

RODRIGUES, G. F. **Expressão in situ de mediadores imunológicos do perfil Th17 na Leishmaniose Tegumentar Americana causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2021. 124 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022. Disponível em: doi:10.11606/D.5.2022.tde-27042022-153801. Acesso em: 15 de maio de 2022.

SILVA, I. C. **Papel da Interleucina 6 (IL-6) na resposta inflamatória neutrofílica durante a infecção por *Leishmania infantum***. Orientador: Vanessa Carregaro Pereira. 2016. 92 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. Disponível em: doi:10.11606/D.17.2017.tde-06062017-170957. Acesso em: 16 de maio de 2022.

SILVA, E. O. et. al. Evaluation of the lymphoproliferation of mononuclear cells in cutaneous leishmaniasis patients treated with Libidibia ferrea. **Acta Brasiliensis**. [S. l.], v. 5, n. 3, p. 97-102, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.22571/2526-4338560>. Acesso em: 15 de maio de 2022.

SILVEIRA, F. T. et al. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* E *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, Belém, Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo, v. 22, n. 1, p. 9-20, 2008.

TALHARI, S. et al. Leishmaniose no Estado do Amazonas – Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos. **An Bras Dermatol.** [S. l.], v. 63, n. 6, p. 433-438, 1988.

URSINE, R. L. et. al. American Tegumentary Leishmaniasis in an endemic municipality in the North of Minas Gerais State: spatial analysis and socio-environmental factors. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** [S. l.], v. 63, e2, 2021. Disponível em: Doi: 10.1590/S1678-9946202163002. PMID: 33503150; PMCID: PMC7816867. Acesso em: 17 de maio de 2022.

VASCONCELOS, J. M. et. al. Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC).** Ceará, v.50, n. 3, p. 221-7, 2018. Disponível em: DOI: 10.21877/2448-3877.201800722. Acesso em: 15 de maio de 2022.

TELINO, E. et. al. In vitro responses of human peripheral blood mononuclear cells to whole-cell, particulate and soluble extracts of Leishmania promastigotes. **British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology.** [S. l.], v. 143, p. 338–344, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.02995.x>. Acesso em: 15 de maio de 2022.

ZANDONAI, R. H. **Análise Da Atividade Linfoproliferativa De Células Esplênicas Murinas Frente A Extrato De Seis Plantas Medicinais Da Flora Catarinense.** 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Produtos Naturais e Substâncias Bioativastal) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007 Disponível em: <https://siaiap39.univali.br/repositorio/handle/repositorio/1452>. Acesso em: 15 de maio de 2022.

8 DISCUSSÃO GERAL

A terapêutica preconizada para leishmaniose atualmente baseia-se na utilização de cinco fármacos: os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B e a sua formulação lipossômica, a miltefosina, a paromomicina e a pentamidina (SANTIAGO, PITA e GUIMARÃES, 2021). Tais medicamentos possuem tratamento prolongado e podem dificultar a adesão do paciente ao tratamento e favorecer possível seleção de cepas resistentes (TIWARI, *et al.*, 2018). Não obstante a isso, o uso continuado desses medicamentos pode causar efeitos adversos como toxicidades cardíaca, hepática, pancreática, renal e do sistema músculo-esquelético (BRASIL, 2017).

Como a variabilidade quanto à eficácia do tratamento com antimoniais na leishmaniose tem sido um problema recorrente, fármacos alternativos e novas formulações têm sido desenvolvidos. Essa busca por novos compostos visa possibilitar o desenvolvimento de novos fármacos efetivos, mais seguros, com baixo custo, sem efeitos colaterais e que não induzam resistência (SEN, 2011).

Nesse contexto, as plantas medicinais surgem como uma alternativa terapêutica e é considerada pelo Programa de Doenças Tropicais da OMS no tratamento de leishmaniose como essencial e de alta prioridade (OMS, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2021).

Os produtos naturais derivados de plantas têm sido promissores na atividade antileishmania e vem apresentando potencial citotóxico sobre o parasito, além de sinergismo com o sistema imune do hospedeiro através da ativação de macrófagos (ALVES *et al.*, 2017; CARNEIRO *et al.*, 2012; DE CASTRO OLIVEIRA *et al.*, 2017; DE MEDEIROS *et al.*, 2011; ISLAMUDDIN *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2017).

Espécie vegetal que vem despertando interesse é a *Libidibia ferrea*, árvore nativa do Brasil, vem demonstrando atividade antileishmania contra as espécies *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (Comandolli- Wyrepkowski, 2017).

Além dos produtos de origem vegetal, Complexos metálicos também tem sido utilizados na medicina no tratamento de várias doenças, suas aplicações medicinais abrangem, por exemplo, o tratamento do câncer e da artrite (CORBI *et al.*, 2005) e mais recentemente, o complexo de cobre tem demonstrado potencial antileishmania (Chagas *et al.*, 2021).

Nesse seguimento, os resultados desse trabalho mostraram-se promissores e contribuíram como subsídios para novos ensaios, com intuito de avaliar a possibilidade desses bioativos potencializarem o sistema imune e serem usados na terapia dos pacientes acometidos

com a leishmaniose cutânea. Ademais, considerando a diversidade de mecanismos envolvidos na patogênese na LC, este estudo fornecerá perspectivas para luz de estudos posteriores para análises mais amplas quanto a ação de frações antigênicas das espécies que mais acometem a população da região.

A fração DCM avaliada no primeiro capítulo apresentou ação estimuladora na linfoproliferação, sugerindo provável atuação imunomoduladora *in vitro*, podendo ser um candidato futuro a fitofármaco ou ser utilizado combinado ao tratamento convencional (SILVA *et al.*, 2021).

Apesar dos produtos naturais obtidos a partir da *L. ferrea* e o complexo de cobre Cu(I) terem sido apontados como potencial antileishmania nos estudos de Jensen (2020) e Chagas *et al.*, (2021), até o momento não existem relatos descritos na literatura sobre a atividade desses compostos frente a células de pacientes com LC, assim como não há a veiculação desses compostos com a dosagem de citocinas. Isso reforça a importância e o ineditismo deste trabalho.

No segundo capítulo, os resultados *in vitro* confirmaram que os bioativos avaliados [DCM, LFME e Cu(I)] apresentam atuação importante sob o sistema imune e subsidiou o direcionamento de estudos futuros para análise mais ampla e melhor compreensão acerca dos perfis imunológicos por eles induzidos.

Corroborando com os estudos de Jensen (2020), o qual sugeriu que a microemulsão tópica contendo a fração DCM de *L. ferrea* poderia contribuir com a otimização do protocolo terapêutico ou até mesmo uma terapia associada com o medicamento recomendado pelo Ministério da Saúde, cujo o sistema microemulsionado entraria como terapia complementar para os pacientes com LC. Essa alternativa permitiria que o tratamento da LC fosse administrado com doses mais baixas do antimônio, uma possibilidade que vem sendo explorada em outros estudos, onde foi demonstrado que o esquema alternativo é viável e a diminuição das doses leva o paciente a obter a cura clínica com efeitos colaterais reduzidos, garantindo a segurança e integridade do mesmo (OLIVEIRA NETO MP, 1996; OLIVEIRA NETO MP, 2006).

O presente estudo contribui também com os achados de Chagas *et al.*, (2021), os quais apresentaram a ação promissora antileishmania do Cu(I) e sua baixa toxicidade em macrófagos. As ações únicas de complexos de cobre têm mostrado potencial para aplicações terapêuticas e a importância dele vem sendo demonstrada na atividade antiproliferativa *in vitro* e *in vivo* de células cancerígenas (GANDIN *et al.*, 2014), potencial terapêutico para doença de Parkinson (Miller *et al.*, 1991), efeito hipoglicêmico *in vivo* com camundongos com Diabetes tipo 1 (N. Yasumatsu *et al.*, 2007), agentes antimaláricos (Mohapatra, *et al.*, 2010), entre outros

tratamentos. Nessa perspectiva, é possível inferir que o futuro desenvolvimento de complexos de Cu pode ter resultados benéficos em muitas doenças (DUNCAM e WHITE, 2012).

Relacionado ao capítulo 3, a avaliação dos efeitos imunogênicos induzidos pelos SLA de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, demonstraram que essas espécies induziram forte linfoproliferação de PBMCs. Resultado significativo foi verificado nas culturas de células sensibilizadas por SLA *L. guyanensis*, com elevados níveis de proliferação ($\geq 75\%$; $p=0,01$) e produção de IL-6 ($p=0,01$) para todos os grupos de voluntários avaliados. Espir *et al.*, (2014) sugeriram que as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-17 estão envolvidas no curso clínico da LC no Amazonas e provavelmente relacionadas ao desfecho da doença.

Estas mesmas espécies do parasito avaliadas neste estudo foram consideradas as mais prevalentes na distribuição de casos de LC no município de Rio Preto da Eva (AM), em que Figueira *et al.*, (2014) identificaram prevalência de infecções causadas principalmente por *L. guyanensis* (n=80), seguidas de *L. amazonensis* (n=7) e *L. naiffi* (n=3).

Quanto a linfoproliferação, não há relatos de estudos na literatura com todas as espécies avaliadas neste trabalho. Estudo de Reis *et al.*, (2009) avaliaram a proliferação de linfócitos frente ao antígeno solúvel de *L. brasiliensis*, e observaram que os pacientes com LC produziram uma resposta celular específica ao SLA de *L. brasiliensis*, sugerindo haver a participação de células T de memória e células T regulatórias (Treg) na evolução clínica dos pacientes. E estudo de Telino *et al.*, (2006) onde descreveram que o antígeno de *L. brasiliensis* apresentou elevada proliferação em relação ao antígeno total de *L. amazonensis*. Resultados semelhantes ao encontrado nesse trabalho, onde os antígenos avaliados induziram proliferação, em especial o de *L. guyanensis* se comparado ao de *L. amazonensis*, mas ao avaliar a dosagem de citocinas, é possível observar que haja a interação de diferentes perfis celulares, como Th1, Th17 e Treg.

A proliferação de células T associada a produção de citocinas são cruciais ao controle da infecção por *Leishmania* sp. e todas as formas clínicas da LTA são dependentes de células T (OLIVEIRA *et al.*, 2021; BRASIL, 2017; BACELLAR *et al.*, 2002). Desse modo, novos ensaios são essenciais, considerando a importância e a necessidade de melhor elucidar os mecanismos imunológicos envolvidos na LC, além de contribuir para desenvolvimento de novos tratamentos ou terapias combinadas que possam ser utilizadas por pacientes com restrição de uso, portadores de doenças crônicas como cardíacas, renais, hepáticas (BRASIL, 2017).

9 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados deste trabalho puderam contribuir com a compreensão da resposta linfoproliferativa *in vitro* frente as espécies de maior circulação na região e para fornecer subsídios a respeito de bioativos que tem demonstrado atividade antileishmania, os quais podem ser candidatos futuros a tratamentos alternativos ou complementares para a LC. Diante dos resultados apresentados, conclui-se os seguintes aspectos:

- ✓ A fração diclorometano (DCM) obtida do extrato metanólico de *Libidibia ferrea* (LFME) apresentou forte indução da linfoproliferação celular em todos os grupos avaliados, sendo sugestivo que esse composto pode desempenhar função importante na resposta imune celular *in vitro*;
- ✓ Os valores de linfoproliferação entre a fração DCM e o Glucantime® foram equivalentes, com exceção do grupo pós-tratamento, onde a fração DCM induziu quase que 100%. Contudo, ao avaliar as citocinas inflamatórias nesse grupo, os níveis foram muito baixos, sendo sugestivo que esse bioativo pode apresentar ação imunomoduladora;
- ✓ Nos pacientes primoinfectados sob o estímulo com a fração DCM, a IL-6 foi a citocina que apresentou maior produção em células de primoinfectados ($p=0,06$);
- ✓ Os resultados com os bioativos Cu(I) e LFME indicaram indução da proliferação de linfócito T significativa (Cu(I) $p<0,000$; LFME $p<0,02$), bem como o aumento dos níveis de IL-6 e IL-8. Esses resultados sugerem que esses bioativos podem potencializar a resposta imune celular, mas que mecanismos de interação de diferentes perfis podem estar relacionados;
- ✓ O Cu (I) induziu maiores níveis de linfoproliferação ($\geq 93\%$) em pacientes antes ($p=0,001$) e após ($p=0,0006$) tratamento, quando comparado com o LFME ($\geq 81,3\%$);
- ✓ Ao avaliar o estímulo dos antígenos solúveis, foi observado elevados níveis de proliferação de PBMCs sensibilizadas com SLA *L. guyanensis* ($\geq 75\%$; $p=0,01$) para todos os grupos de voluntários avaliados;
- ✓ Quanto aos níveis das citocinas em função dos antígenos de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, os resultados demonstraram que os pacientes antes do tratamento produziram níveis aumentados de IL-6 e IL-8 em relação aos pacientes pós-tratamento.

10 PERSPECTIVAS

Os resultados do projeto demonstraram que os bioativos apresentam potencial antileishmania e podem desempenhar ação imunomoduladora. Esses resultados fornecem perspectivas para novos estudos, sugerindo prosseguimento com as seguintes etapas:

- ✓ A continuidade com análises mais amplas de diferentes citocinas relacionadas ao perfil Th2, Th17 e Treg, voltadas para fração DCM e ao Cu(I), dado seus resultados mais expressivos;
- ✓ Avaliação da indução desses bioativos sob a proliferação de linfócitos B;
- ✓ Caracterização das espécies para melhor elucidar a ação dos antígenos solúveis de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* frente as PBMC;
- ✓ Avaliar a linfoproliferação e dosagem de citocinas frente a fração antigênica de *L. naiffi*, considerando que também é uma das espécies de maior predominância na região, e considerando os poucos estudos que contemplam essa espécie.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, D.; LIMDI, J.K. Anti-TNF therapy is associated with a reduction in radiation exposure in patients with Crohn's disease. **European Journal of gastroenterology & hepatology**, v.27, p. 13-19, 2015.
- ALMEIDA-SOUZA, F. *et al.* In vitro activity of Morindacitrifolia Linn. fruit juice against the axenic amastigote form of Leishmaniaamazonensis and its hydrogen peroxide induction capacity in BALB/c peritoneal macrophages. **BMC Research Notes**, v. 11, p. 492-499, 2018.
- ALMEIDA, A. P. *et al.* Occurrence of Leishmania infection in the immediate geographic region of Ji-Paraná, Rondônia State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 54, p. e0212-2021, 2021.
- AMMAR, Abed; EREGAT, Suheir; DAN-GOOR, Mary; JAFFE, Charles; ZUSSMAN, Eval; ABDEEN, Ziad. Amphotericin B-loaded nanoparticles for local treatment of cutaneous leishmaniasis. **Drug Deliv Transl Res**, v. 9, p. 76-84, 2019.
- ALVES, M. M. M., BRITO, L. M., SOUZA, A. C., QUEIROZ, B., DE CARVALHO, T. P., BATISTA, J. F., OLIVEIRA, J., DE MENDONCA, I. L., LIRA, S. R. S., CHAVES, M. H., Goncalves, J. C. R., Carneiro, S. M. P., Arcanjo, D. D. R.; Carvalho, F. A. A. Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by Leishmania major. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 390, 893-903, 2017.
- ARAÚJO FLORES, Gabriela Venícia. **Leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica nos municípios de Amapala (Valle) e Orocuina (Choluteca), Honduras: avaliação da resposta imune inflamatória e regulatória in situ em lesões de pele**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2017.
- BACELLAR, Olívia; LESSA, Hélio; SCHRIEFER, Albert; MACHADO, Paulo; DE JESUS, Amélia Ribeiro; DUTRA, Walderez; GOLLOB, Kennet; CARVALHO, Edgar. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, 2002.
- BARROS-BECKER, Francisco et al. Live imaging reveals distinct modes of neutrophil and macrophage migration within interstitial tissues. **Journal of cell science**, v. 130, n. 22, p. 3801-3808, 2017.
- BASTOS, M.M.; BOEACHT, N.; HOELZ, L. V. B.; DE OLIVEIRA, A. B. Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 2072-2104, 27 dez. 2016.
- BATES, Paul A. Transmission of Leishmaniametacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.
- BESTEIRO, S., Williams, R. A M., Coombs, G. H., Mottram, J. C.(2007). Protein turnover and differentiation in Leishmania. **International journal for parasitolog**, 37 (10), 106375.doi:10.1016/j.ijpara.2007.03.008

BOLETIM INFORMATIVO DA REDE LEISH. **Drugs for Neglected Diseases initiative**. Rio de Janeiro, ed. 3, 2018.

BOURREAU, E. *et al.* Leishmania-RNA virus presence in *L. guyanensis* parasites increases the risk of first-line treatment failure and symptomatic relapse. **The Journal of infectious diseases**, p. 1–28, 2015.

BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Textos de Epidemiologia para vigilância ambiental em saúde/coordenação**. Brasília, 2002.

BRASIL - Ministério da Saúde. **Casos de leishmaniose tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2020**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-tegumentar/arquivos/lt-casos.pdf>. Acesso em: 22 mai. 2022.

BRASIL - Ministério da Saúde. **Leishmaniose Tegumentar (LT)**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-tegumentar/leishmaniose-tegumentar>. Acesso em: 22 mai. 2022.

BRASIL - Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, DF: Ministério da Saúde, p. 189, 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 22 mai. 2022.

BRASIL - Ministério da Saúde. **Sistema de Informação do Contrato de Notificação (Brasil). Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Notificação de Acidentes**. DATASUS. Tecnologia da Informação a Serviço do SUS. 2019. Recuperado de: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>. Acesso em: 5 de abril de 2019.

CAMARGO, L. M.A.; BARCINSKI, M.A.; Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura** 2003, 1:34-7.

CAMPOS, Soraya Sena *et al.* Perfil epidemiológico dos pacientes com leishmaniose tegumentar americana no município de Ilhéus–Bahia. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 38, n. 2, p. 155-164, 2017.

CARNEIRO, S. M., CARVALHO, F. A., SANTANA, L. C., SOUSA, A. P., NETO, J. M.; CHAVES, M. H. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biol Res**, 45, 111-116, 2012

CARDOSO, Thiago Marconi de Souza. **O PAPEL DOS LINFÓCITOS T CD8+ NA INFEÇÃO SUBCLÍNICA CAUSADA POR *Leishmaniabraziliensis***. Tese (Doutorado em Imunologia) - UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, [S. l.], 2015.

CASTELLANO, Lúcio Roberto Cançado. Anti-Leishmania immune response and evasion mechanisms. **VITAE Academia Biomédica Digital**, n. 25, 2005.

CERUTTI, Pedro Henrique Pietrzaki; LOPES, Carine Gonçalves; FILHO, Fabio Gonçalves Lopes; GUEDES, Virgílio Ribeiro. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: UMA REVISÃO DE LITERATURA. **Revista de Patologia do Tocantins**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 55-59, 2017.

CHAGAS, Ana Flávia da Silva. **Avaliação da atividade anti-leishmania induzida por complexos metálicos de cobre**. 2015. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

CHAGAS, A. F. S.; PORCHIA, M.; TISATO, F.; SOLDERA, P. F.; COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; NAIFFI, M. F.; FRANCO, A. M. R. *In vitro* evaluation of antileishmanial activity of copper(I) complexes. **Acta Brasiliensis**, v. 5, n. 1, p. 1-6. 2021.

CHOI, Sukjeong *et al.* Fabrication of silver nanoparticles via self-regulated reduction by 1-(2-hydroxyethyl)-3-methylimidazolium tetrafluoroborate. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 24, n. 5, p. 856-859, 2007.

CHRUSCIAK-TALHARI, A. *et al.* Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. **American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, p. 255-60, 2011.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, Claudia Dantas *et al.* Atividade anti-leishmania de extratos de *Libidibia ferrea*: desenvolvimento de testes *in vitro* e *in vivo*. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 4, p. 331-340, 2017.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D. **Atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo* de *Libidibia ferrea* e estudo de formulações tópicas para o tratamento da forma cutânea da Leishmaniose**. 199 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2015.

CORBI, P.P.; MASSABNI, A.C.; MOREIRA, A.G.; MEDRANO, F.J.; JASIULIONIS, M.G. e COSTA-NETO, C.M. Can. **J. Chem.** 83, 104, 2005.

CORTEZ, A. C. **Avaliação da atividade *in vitro* dos extratos fitoquímicos de *Libidibia ferrea* Martius e *Senna reticulata* (Willd) Irwin e Barneby (Fabales – *Libidibiaceae*) para *Leishmania spp.* e *Trychophyton spp.*** Dissertação. Mestrado em Patologia Tropical. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

CRUVINEL, Wilson de Melo *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

DA-CRUZ, Alda Maria *et al.* Tumor necrosis factor- α in human American tegumentary leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 2, p. 225-229, 1996.

DE CASTRO, O.; BRITO, L. G.; ALVES, L. M.; AMORIM, L. V.; SOBRINHO-JUNIOR, E. P.; DE CARVALHO, C. E.; DA FRANCA, R.; ARCANJO, D. D.; DAS GRACAS, L. C.; DE AMORIM, C. *In Vitro* Effects of the Neolignan 2,3- Dihydrobenzofuran Against *Leishmania Amazonensis*. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 120, 52-58, 2017.

DE MEDEIROS, M.; DA SILVA, A. C.; CITO, A. M.; BORGES, A. R.; DE LIMA, S. G.; LOPES, J. A.; FIGUEIREDO, R. C. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitol Int**, 60, 237-241, 2011.

DE SOUZA, Wanderley. *DOENÇAS NEGLIGENCIADAS*. [S. l.]: **Academia Brasileira de Ciências**, 2010. 56 p. ISBN 978-85-85761-30-1.

DI STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed. UNESP, 1996. 230 p.

ESPIR, Thaís Tibery. **Características da resposta imune em pacientes com leishmaniose tegumentar americana, antes e após tratamento quimioterápico com antimonial pentavalente**. 2013. 196 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

FALCÃO, Nivea Maria Simões. **Avaliação da atividade biológica de extratos vegetais contra *leishmania (viannia) guyanensis (kinetoplastida: trypanosomatidae)* e análise de frações semi-purificadas de *caesalpiniaferreamartius (fabales - caesalpinaceae)***. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Amazonas - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2010.

FENG, Xingli; *et al.* Aqueous– organic phase-transfer of highly stable gold, silver, and platinum nanoparticles and new route for fabrication of gold Nanofilms at the oil/water Interface and on solid supports. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 25, p. 12311-12317, 2006.

FERES, Marcos Vinício Chein; SILVA, Lorena Abbas da. DOENÇA DE CHAGAS E PATENTES FARMACÊUTICAS: pesquisa exploratória sobre a aspiração do sistema de patentes. **REI - Revista Estudos Institucionais**, [S.l.], v. 4, n. 1, p. 278-307, ago. 2018. ISSN 2447-5467

FIGUEIRA, Luanda de Paula; FRANCO, Antônia Maria Ramos. Caracterização molecular de *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) proveniente de casos de leishmaniose cutânea dos Municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 2, n. 2, p. 79, jun. 2011.

FRANCO, ANTONIA M.R.; GRAFOVA, IRYNA; SOARES, FABIANE V.; GENTILE, GENNARO; WYREOKOWSKI, CLAUDIA D.C.; BOLSON, MARCOS A.; SARGENTINI JR, EZIO; CARFAGNA, COSIMO; LESKELA, MARKKU; GRAFOV, ANDRIY. Nanoscaled hydrated antimony (V) oxide as a new pproach to first-line antileishmanial drugs. **International journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 6771-6780. 2016.

FREITAS, José Claudio Carneiro; NUNES-PINHEIRO, Diana Célia Sousa. Leishmanioses: uma abordagem sobre as imunoglobulinas e as citocinas envolvidas na infecção e na vacinação. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 3, p. 193-204, 2013.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In RANG EL, E. F.; LAINSON R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 23-51.

- GONCALVES, T.B.; FIGUEIREDO, W. M. E.; FILHO, J. C. C. S.; JÚNIOR, T. M. A. F.; AZEVEDO, F. R. Leishmanioses: Epidemiologia e perspectivas de tratamentos à base de produtos naturais. **Revista Interfases**. V.10, N1. 2022.
- ISLAMUDDIN, M., CHOUHAN, G., FAROOQUE, A., DWARAKANATH, B. S., SAHAL, D., & AFRIN, F. (2015). Th1-biased immunomodulation and therapeutic potential of *Artemisia annua* in murine visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, 9, e3321.
- GOFFMAN, E. *Stigma: notes on the management of spoiled identity*. EnglewoodCliffs, New Jersey: Prentice–Hall, 1963.
- GOMES-SILVA, Adriano et al. Resposta Imune Celular no Processo de Cura da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Leishmanioses do Continente Americano**, v. 1, p. 381-388, 2014.
- GÓMEZ, L. J.; WIJK, R. V.; SELM, L. V.; RIVERA, A.; BARBOSA, M. C.; PARISI, S. et al. Stigma, participation restriction and mental distress in patients affected by leprosy, cutaneous leishmaniasis and Chagas disease: a pilot study in two co-endemic regions of eastern Colombia. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Volume 114, Issue 7, Pages 476–482, 2020.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberaba, v. 36, p.71-80, 2003.
- GONTIJO, B.; DE, CARVALHO, ML. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 36: 71-80, 2003.
- GUBLER, U.; CHUA, A. O.; SCHOENHAUT, D. S.; DWYER, C. M.; MCCOMAS, W.; MOTYKA, R.; NABAVI, N., WOLITZKY, A. G.; QUINN, P. M.; FAMILLETTI, P. C. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bio-active cytotoxic lymphocyte maturation factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1991; 88: 4143–4147
- GUIMARÃES, Vanessa Cristina Fitipaldi Veloso et al. **Avaliação da susceptibilidade de Lutzomyia migonei (Diptera: Psychodidae) ao desenvolvimento de Leishmania (Leishmania) infantum**. 2016. Tese de Doutorado.
- GUTIÉRREZ-REBOLLEDO, G. A.; DRIER-JONAS, S.; JIMÉNEZ-ARELLANES, M. A. Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: an update. **Asian Pacif J Trop Med**, v. 10, n. 12, p.1105-10, 2017.
- HAILU, Asrat *et al.* T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmaniadonovani*. **ClinicalImmunology**, v. 117, n. 2, p. 182-191, 2005.
- HAMZA, T.; JOHN, B.; BARNETT, BINGYUN L. I. Interleukin 12 a Key Immunoregulatory Cytokine in Infection Applications. **Int. J. Mol. Sci.**, 11(3): 789–806. 2010.
- INIGUEZ, E. *et al.* The metal-drug synergy: new Ruthenium II complexes of ketoconazole are highly active against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and non-toxic to human or murine normal cells. **J BiolInorgChem**,v. 18, n. 7, p. 779-90, 2013.

IOSET, Jean-Robert. Natural products for neglected diseases: a review. **Current Organic Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 643-666, 2008.

JARAMILLO, Tatiana MaríaGiraldo. **Caracterização celular e imunológica da interação células dendríticas – *Leishmania braziliensis***. 2014. 127 f. Tese (Mestrado em Patologia Celular) - *Universidade de Brasília*, Brasília, 2014.

JARDIM, Armando *et al.* Immunoprotective *Leishmania major* synthetic T cell epitopes. **The Journal of experimental medicine**, v. 172, n. 2, p. 645-648, 1990.

JENSEN, Bruno Bezerra. **Atividade antileishmania da fração diclorometano de *Libidibia ferrea* (Fabales: Fabaceae)**. 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2017.

KOBETS, T.; GREKOV, I. Lipoldova M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. **Curr Med Chem.**;19(10):1443-74, 2012.

LAINSON, R. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina** 1997; 11(1): 29-40.

LAINSON, R; SHAW, J.J. New world Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species. In: Topley & Wilson. **Microbiology and Microbial Infections** (9^a ed). London: Ed. Feg Cox; 1988.

LAKHAL-NAOUAR, Ines; SLIKE, Bonnie M.; ARONSON, Naomi E.; MAROVICH, Mary A. The immunology of a healing response in cutaneous leishmaniasis treated with localized heat or systemic antimonial therapy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 10, p. e0004178, 2015.

MACKEY, T.K.; LIANG, B.A.; CUOMO, R.; HAFEN, R.; BROUWER, K.C.; LEEA, D.E. Emerging and Reemerging Neglected Tropical Diseases: a Review of Key Characteristics, Risk Factors, and the Policy and Innovation Environment. **Clinical Microbiology Reviews**, v.27, n.4, p. 949–979, 2014

MANETTI, R.; PARRONCHI, P.; GIUDIZI, M. G.; PICCINNI, M. P.; MAGGI, E.; TRINCHIERI, G. Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. **J. Exp. Med.** 1993; 177: 1199–1204

MARTINEZ, Fernando O.; HELMING, Laura; GORDON, Siamon. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 451-483, 2009.

MARTINS, D.A.; GOUVEA, L. R.; GAMA, J.B.D.; SILVA, P.B.; LOURO, S, R.; SOEIRO, M.; TEIXEIRA, L.R. Copper(II)–fluoro- quinolone complexes with anti-Trypanosoma cruzi activity and DNA binding ability. **BioMetals** 25:951–96, 2012.

MARZOCHI, M.C.; MARZOCHI, K.B. Tegumentary and visceral leishmaniases in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad Saúde Pública**. 10 Suppl2:359-75, 1994.

MASPI, Nahid; ABDOLI, Amir; GHAFARIFAR, Fathemeh. Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and global health**, v. 110, n. 6, p. 247-260, 2016.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n.1, p. 7-14, Jan 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria De Vigilância Em Saúde. MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: Série A. **Normas e Manuais Técnicos**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. v. 182. ISBN 978-85-334-1270-5.

MOMEN, Hooman; CUPOLILLO, Elisa. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 583-588, 2000.

MOSSER, David M.; EDWARDS, Justin P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

NAIFF JÚNIOR, Roberto DaibeS; PINHEIRO, Francimeire Gomes; NAIF, Maricleide de Farias; SOUZA, Iler de Souza; CASTRO, Lourival Maciel; MENEZES, Moézio Pereira; FRANCO, Antonia Maria Ramos. Estudo de uma série de casos de leishmaniose tegumentar americana no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 38, n. 2, p. 103-114, 2009.

NASSER, Nilton; WILL, Erisson. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO MUNICÍPIO DE BLUMENAU-SC. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 28-38, 1 jul. 2017.

NATALE, C. C.; SEIXAS, P. M.; ALMEIDA, D. M. A importância Dos Modelos Murinos Na Caracterização Das Respostas Imunológicas Às Leishmanioses: Uma Revisão. **Atas de Ciências da Saúde**, São Paulo, v.4, n.3, p. 35-59, 2016.

NOVAIS, Fernanda O. et al. CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006196, 2017.

OLEKHNOVITCH, Romain; BOUSSO, Philippe. Induction, propagation, and activity of host nitric oxide: lessons from *Leishmania* infection. **Trends in parasitology**, v. 31, n. 12, p. 653-664, 2015.

OLIVEIRA, A.F.; BATISTA, J.S.; PAIVA, E.S.; SILVA, A.E.; FARIAS, Y.J.M.D. *et al.* Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caealpinia ferrea* Mart. Ex Tul. var.ferrea) em lesões cuçãneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p.302-310, 2010.

OLIVEIRA-NETO, M.P.; SCHUBACH A.; ARAUJOS, M.L.; PIRMEZ C. High and low doses of antimony (sb^V) in American cutaneous leishmaniasis. A five-year follow-up study of 15 patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 207-209, 1996.

OLIVEIRA-NETO, M.P; MATTOS, M.S. Na alternative antimonial schedule to be used in cutaneous leishmaniasis when high doses of antimony are undesirable. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 223-236, 2006.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (WHO -World Health Organization) The world medicines situation 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva. p. 12, 2011.

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. **IJVR**, v. 16, n. 1, p. 1-19, 2015.

PATIL, Chetan *et al.* p38 MAPK regulates IL-1 β induced IL-6 expression through mRNA stability in osteoblasts. **Immunological investigations**, v. 33, n. 2, p. 213-233, 2004.

PELLEGRINI, M.; CALZASCIA, T.; TOE, J. G. et al. IL-7 Engages Multiple Mechanisms to Overcome Chronic Viral Infection and Limit Organ Pathology. **Cell**, v. 144, p. 601-613, 2011.

PINHEIRO, R. O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, p. 79-82, 2004

PINHEIRO, Roberta Olmo; ROSSI-BERGMANN, Bartira. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 79-82, 2007.

PRATES, D.; ARAÚJO-SANTOS, T.; LUZ, NF.; ANDRADE, BB.; FRANÇA-COSTA, J.; AFONSO, L.; CLARÊNCIO, J.; MIRANDA, JC.; BOZZA, PT.; DOSREIS, GA.; BRODSKY, C.; BARRAL-NETTO, M.; BORGES, VM.; BARRAL, A. Lutzomyia longipalpis saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **J Leukoc Biol**. Sep;90(3):575-82, 2011.

RANAWAKA, R.R.; WEERAKOON, H.S.; DE SILVA, S.H. The quality of life of Sri Lankan Patients with cutaneous leishmaniasis. *Mymensingh Med J*. 2014; 23(2):345-351. REGLI, Ivo B. *et al.* Resistance of *Leishmania (Viannia) Panamensis* to meglumine antimoniate or miltefosine modulates neutrophil effector functions. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 3040, 2018.

REIS, Luiza de Campos et al. **Caracterização da resposta imune celular em portadores de leishmaniose tegumentar americana antes e após tratamento quimioterápico**. 2007. Tese de Doutorado.

REITHINGER, R. *et al.* Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kabul, Afghanistan: a randomized, controlled trial. **Clinical infectious diseases**, v. 40, n. 8, p. 1148-1155, 2005.

RENAST. Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN). Disponível em: <http://renastonline.ensp.fiocruz.br/temas/sistema-nacional-agravos-notificacao-sinan>. Acesso em: 27 de julho de 2020.

ROCHA, D. P. *et al.* Coordenação de metais e antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v.34, n.1, p. 111-118, 2011.

RODRIGUES, V., CORDEIRO-DA-SILVA, A., LAFORGE, M., SILVESTRE, R., & ESTAQUIER, J. (2016). Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. **Parasites & Vectors**, 9(1), 118-118.

RODRIGUES, K. A.; AMORIM, L. V.; DIAS, C. N.; MORAES, D. F.; CARNEIRO, S. M.; CARVALHO, F. A. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent alpha-pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **J Ethnopharmacol**, 160, 32-40, 2015.

ROSÁRIO, Mychelle Senra; DE OLIVEIRA, Magnel Lima; LIMA, Cássio de Almeida; VIEIRA, Maria Aparecida; CARNEIRO, Jair Almeida; DA COSTA, Fernanda Marques. Doenças tropicais negligenciadas: caracterização dos indivíduos afetados e sua distribuição espacial. **Ev. Bras. Pesq. Saúde**, Vitória, v. 19, n. 3, p. 118-127, 1 jul. 2017.

SALAS, J. M.; CABALLERO, A. B.; ESTEBAN-PARRA, G. M.; MÉNDEZ-ARRIAGA, J. M. Leishmanicidal and Trypanocidal activity of metal complexes with 1,2,4-Triazolo[1,5-a]pyrimidines: Insights on their therapeutic potential against Leishmaniasis and Chagas Disease. **Current Med Chem**, v. 24, n. 25, p. 2796-2806, 2017.

SANTOS, Daniela *et al.* IL-1 β production by intermediate monocytes is associated with immunopathology in cutaneous leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 5, p. 1107-1115, 2018.

SANTOS-GOMES, Gabriela M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by Leishmaniainfantum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, n. 1-2, p. 21-30, 2002.

SANTIAGO, A.S.; PITA, S.S.R.; GUIMARÃES, E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, e29510716543, 2021.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1056-1069, 2011. DOI: doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.004.

SCHOENBORN, Jamie R.; WILSON, Christopher B. Regulation of interferon- γ during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology*, v. 96, p. 41-101, 2007.
SERPA, Hellen; DONATO, Cyntia; MORENO, Maria Rosa; FERREIRA, Riudo; SILVA, Juliana. Fatores Ambientais e comportamentais do homem relacionados à incidência de casos de leishmaniose tegumentar americana. **UNIFACIG**, [S. l.], p. 1-5, 7 nov. 2019.

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**. v.160, p. 55-59, 2009.

SINGH, K.; GARG, G.; VAHAB, A. Current Therapeutics, Their Problems and Thiol Metabolism as Potential Drug Targets in Leishmaniasis. **Current Drug Metabolism**, v.17, 1-23, 2016.

- SONI, Namita; PRAKASH, Soam. Efficacy of fungus mediated silver and gold nanoparticles against *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology research**, v. 110, n. 1, p. 175-184, 2012.
- SOUZA, A. C.; ALVES, M. M. M.; BRITO, L. M.; OLIVEIRA, L. G. C.; SOBRINHO-JUNIOR, E. P. C.; COSTA, I. C. G.; FREITAS, S. D. L.; RODRIGUES, K.; CHAVES, M. H.; ARCANJO, D. D. R.; CARVALHO, F. A. A. *Platonia insignis* Mart., a Brazilian Amazonian Plant: The Stem Barks Extract and Its Main Constituent Lupeol Exert Antileishmanial Effects Involving Macrophages Activation. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2017, 3126458, 2005.
- SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, pii: 170165, 2017.
Disponível em: .doi: 10.1098/rsob.170165.
- TEIXEIRA, Dirceu Esdras et al. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathog.**, v. 9, n. 10, e1003594, 2013.
- TIWARI, N.; GEDDA, M. R.; TIWARI, V. K.; SINGH, S. P.; Singh, R. K.; Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 18, n. 1, 2018.
- TOLEDO, A.; SILVA, R.E.; CARMO, R.F.; AMARAL, T.A.; LUZ, Z.M.P.; RABELLO, A. Assessment of the quality of life of patients with cutaneous leishmaniasis in Belo Horizonte, Brazil, 2009–2010. A pilot study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 2013;107(5):335-336.
- ULIANA, Silvia R. B.; TRICONI, Cristiana T.; COELHO, Adriano C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **National Library of Medicine**, 2018, v. 145, n. 4, p. 464-480.
- VALE, Everton Carlos Siviero do; FURTADO, Tancredo. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005.
- VARES, B.; MOHSENI, M.; HESHMATKHAH, A.; FARJZADEH, S.; SAFIZADEH, H.; SHAMSI-MEYMANDI, S. Quality of Life in Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **Arch Iran Med**, 2013; 16(8):474-477.
- WAILOO, Keith. Stigma, race, and disease in 20th century America. **The lancet**, v. 367, n. 9509, p. 531-533, 2006.
- WOLF, S. F.; TEMPLE, R. A.; KOBAYASHI, M.; YOUNG, D.; DICIG, M.; LOWE, L.; DZIALO, R.; FITZ, L.; FERENZ, C.; HEWICK, R. M.; KELLEHER, K.; HERRMANN, S. H.; CLARK, S. C.; AZZONI, L.; CHAN, S. H.; TRINCHIERI, G.; PERUSSIA, B. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a hetero-dimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. **J. Immunol** 1991; 146: 3074–3081.
- MELO, M. G. N. *et al.* Perfil clínico e epidemiológico de pacientes com leishmaniose tegumentar americana dos estados de Pernambuco e Amazonas, Brasil. Revista da **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 53, p. e20200083, 2020.

OLIART-GUZMÁN, H. *et al.* Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana na fronteira amazônica: estudo retrospectivo em Assis Brasil, Acre. **Rev Patol Trop.** v. 42, p. 187-200, 2013.

TANURE, A. *et al.* Diversity of phlebotomine sand flies and molecular detection of trypanosomatids in Brumadinho, Minas Gerais, Brazil. **PloS one.** v. 15, n. 6, p. e0234445, 2020.

TELES, C. B. G. *et al.* Molecular characterization of american cutaneous leishmaniasis in the tri-border area of Assis Brasil, Acre state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** v. 57, n. 4, p. 343-347, 2015.

TEMPONI, A. O. D. *et al.* American tegumentary leishmaniasis: a multivariate analysis of the spatial circuits for production of cases in Minas Gerais state, Brazil, 2007 to 2011. **Cadernos de saúde pública.** v. 34, n. 2, p. e00165716-e00165716, 2018.

ANEXOS

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos.

ANEXO A- Parecer do comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAZONAS - UFAM



Continuação do Parecer: 3.974.245

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_SemTratamentoPrevio.docx	17/12/2019 16:19:04	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Outros	anuencia_laboratorio.pdf	17/12/2019 15:10:43	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Outros	Coren_enfermeira.pdf	17/12/2019 15:09:03	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Outros	crm_medica.jpg	17/12/2019 15:08:28	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Outros	anuencia_medica.jpg	17/12/2019 15:08:12	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Outros	anuencia_diretora_icb.pdf	17/12/2019 15:06:41	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Outros	declaracao_biorrepositorio.pdf	17/12/2019 15:04:59	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Outros	termo_ressarcimento.pdf	17/12/2019 15:04:23	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Outros	termo_retorno_beneficios.pdf	17/12/2019 15:03:49	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracao_manuseio_material_biologico.pdf	17/12/2019 15:02:53	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_pesquisadores.pdf	17/12/2019 15:02:32	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Declaração do Patrocinador	declaracao_patrocinador.pdf	17/12/2019 15:02:06	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_infraestrutura.pdf	17/12/2019 15:01:43	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Outros	declaracao_compromisso.pdf	17/12/2019 15:01:01	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Cronograma	Cronograma_projeto.docx	17/12/2019 15:00:12	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Outros	anuencia_RioPreto.pdf	17/12/2019 14:59:47	Erika Oliveira da Silva	Aceito
Folha de Rosto	folha_derosto.pdf	17/12/2019 14:58:55	Erika Oliveira da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Teresina, 495

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

E-mail: cep.ufam@gmail.com

Página 08 de 09



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAZONAS - UFAM



Continuação do Parecer: 3.974.245

MANAUS, 15 de Abril de 2020