



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

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 cytokines 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 cutis (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 consequentemente 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).

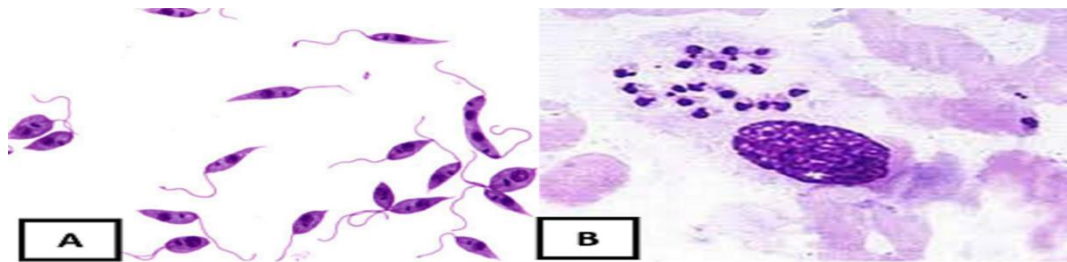


Fonte: BRASIL,2017.

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.

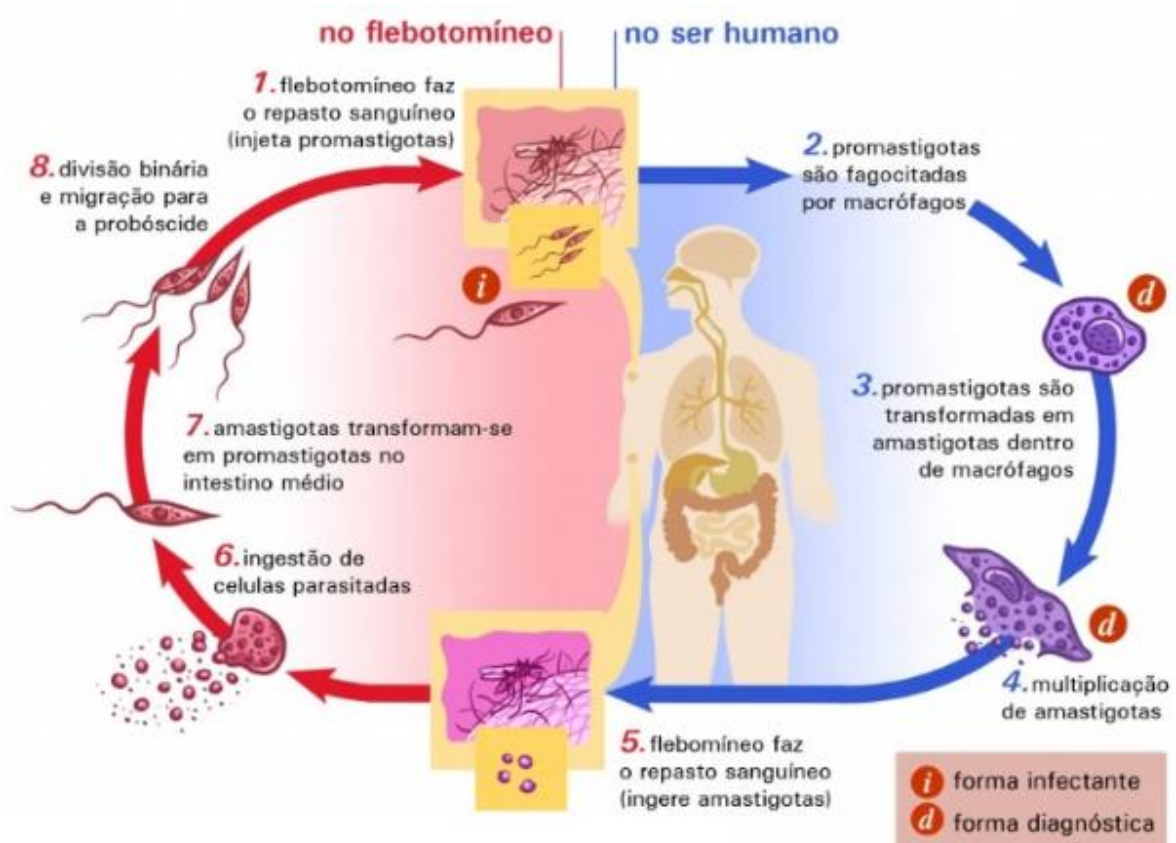
Figura 3- Formas promastigota (a) e amastigota (b) de *Leishmania* sp.



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

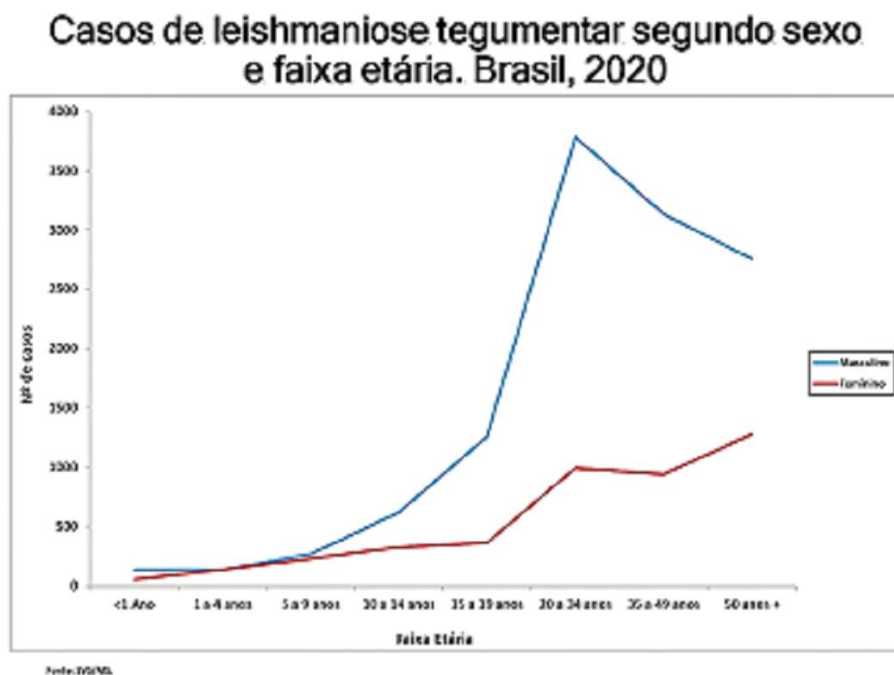
Fonte: SINAN/SVS/MS, 2021.

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 números 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).

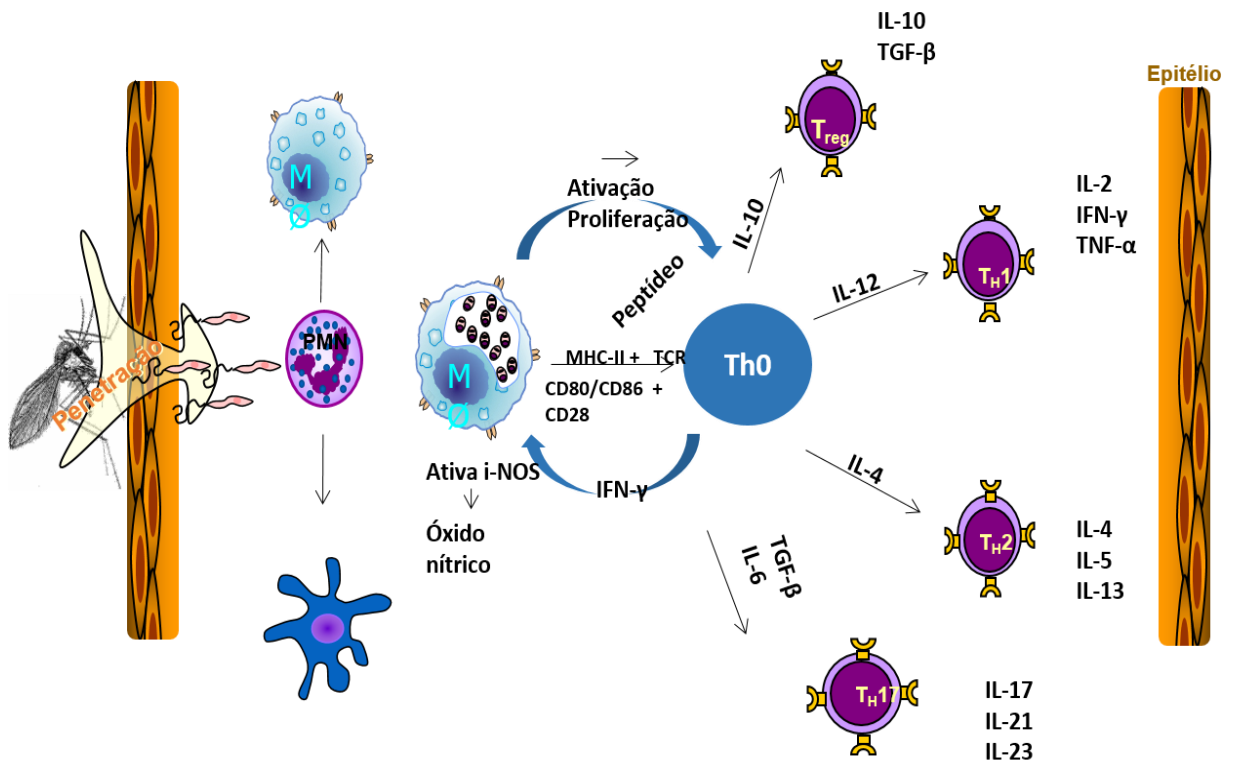
Após a fagocitose das promastigotas pelos macrófagos, o parasito internaliza seu flagelo passando a apresentar a forma amastigota, multiplicando-se por divisão binária e por conseguinte, levando ao rompimento da célula e liberação dos parasitos que irão infectar outros macrófagos (NATALE *et al.*, 2016).

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.	Isetionato 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

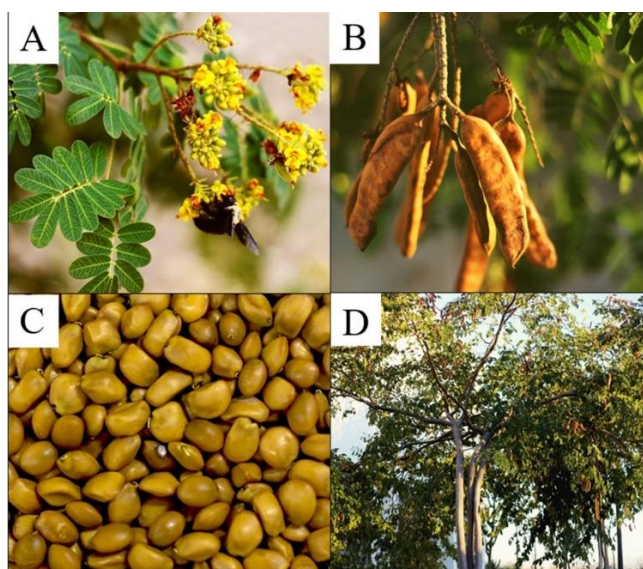
pré-clínicos com diferentes substâncias inovadoras, como complexos metálicos e produtos naturais, a fim de otimizar e proporcionar terapias de menores danos aos pacientes acometidos pela doença.

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 saudáveis 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 ressuspenso 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 μ L, 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 °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 ressuspenso 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 μ L/poço de cada substância conforme a Figura 7, somadas a 100 μ L/poço de células PBMC (2×10^5 /poço) extraídas a partir do sangue de pacientes, totalizando volume final de 200 μ L/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 μ g/mL]; produto natural – Extrato Diclorometano (LFME) [0,006 μ g/mL], Fração DCM [0,0012 μ g/mL]; Fitohemaglutinina (*Phytohemagglutinin* – PHA) [10 μ g/mL] e antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) [10 μ g/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, Fitohemaglutinina - PHA-M (10 µg / mL) a ser utilizada como controle 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 - Fitohemaglutinina; 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.

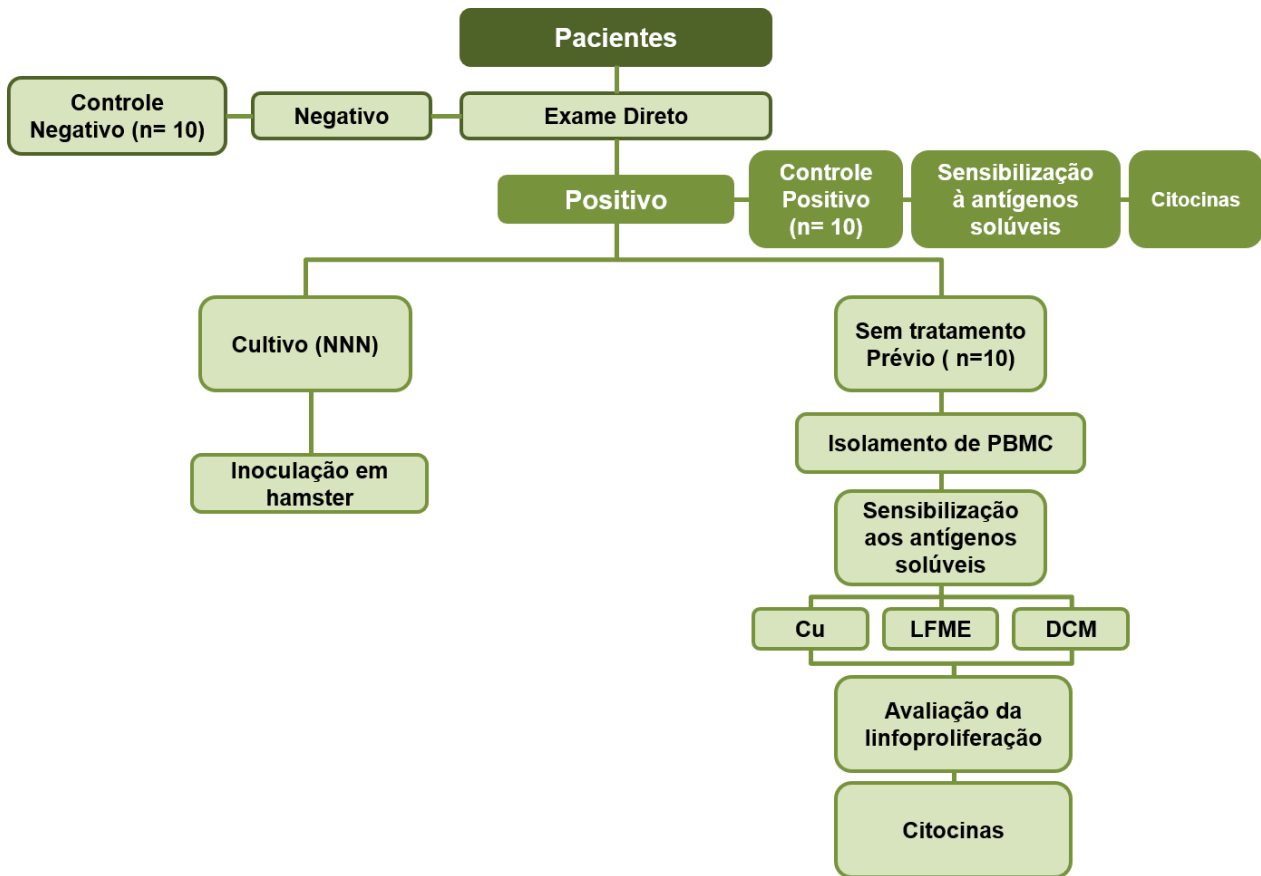
4.12 Leitura e análise estatística

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. *ericaoliveira@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 *Leishmania 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 µL/PBMC [2×10^5]. The tests were individually carried out with the PBMC samples from each participant. The wells of the microplates, with 100 µL/well for each test substance (final volume of 200 µg/well), were organized in triplicate as follows: wells containing cells stimulated with phytohemagglutinin-PHA [10 µg/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 µg/mL]; and wells with cells treated with the DCM fraction [120 µg/mL].

Prior to this, both substances were diluted in RPMI medium, and the DCM fraction was first dissolved in DMSO-dimethylsulfoxide (CH₃)₂SO (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 µM/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 & 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.

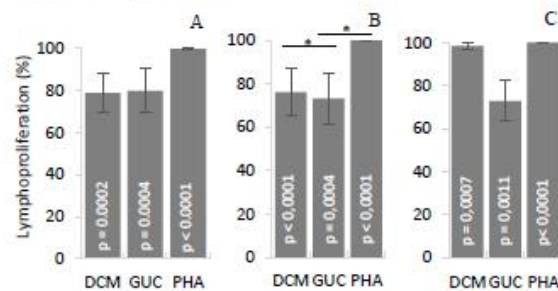


Figure 2. PBMC lymphoproliferation of participants evaluated in Rio Preto da Eva, Amazonas state, Brazil, during March and May 2020. A - primoinfected patients with cutaneous leishmaniasis; B - post-treatment cutaneous leishmaniasis patients; C - healthy people without cutaneous leishmaniasis. DCM: dichloromethane 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 (scopron) 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 antileishmaniana* (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., Schrieffer, 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 jucu 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-Wyrekowski, 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., Vinhot-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 SBV 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