

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Maria Gabriella Nunes de Melo

IMUNOLOGIA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE NOVAS
ESTRATÉGIAS DE CONTROLE PARA AS LEISHMANIOSES: UMA
ABORDAGEM TERAPÊUTICA EM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA

RECIFE

2022

Maria Gabriella Nunes de Melo

**IMUNOLOGIA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE NOVAS
ESTRATÉGIAS DE CONTROLE PARA AS LEISHMANIOSES: UMA
ABORDAGEM TERAPÊUTICA EM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do Instituto
Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a
obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Milena de Paiva Cavalcanti

Coorientadora: Dra. Rayana Carla Silva de Moraes

RECIFE

2022

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

- M528i Melo, Maria Gabriella Nunes de.
Imunologia aplicada ao desenvolvimento de novas estratégias de controle para as leishmanioses: uma abordagem terapêutica em leishmaniose tegumentar americana / Maria Gabriella Nunes de Melo. – Recife: [s.n.], 2022.
140 p.: il., graf., tab.; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.
Orientadora: Milena de Paiva Cavalcanti; coorientadora: Rayana Carla Silva de Morais.
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde.
1. Leishmaniose Cutânea - tratamento farmacológico. 2. Leishmania braziliensis - efeitos dos fármacos. 3. Antiprotozoários - uso terapêutico. 4. Antiprotozoários - farmacologia. 5. Ftalimidas - uso terapêutico. 6. Triazóis - farmacologia. 7. Chlorella vulgaris. 8. Relação Estrutura-Atividade. 9. Equivalência Terapêutica. 10. Antimoniato de Meglumina - farmacocinética. 11. Imiquimode - farmacocinética. 12. Desenho de Fármacos. 13. Leucócitos Mononucleares. 14. Imunomodulação. 15. Compostos orgânicos. 16. Extrato celular. I. Cavalcanti, Milena de Paiva. II. Morais, Rayana Carla Silva de. III. Título.

Maria Gabriella Nunes de Melo

**IMUNOLOGIA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE NOVAS
ESTRATÉGIAS DE CONTROLE PARA AS LEISHMANIOSES: UMA
ABORDAGEM TERAPÊUTICA EM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em
Biotecnologia e Biociências em Saúde do Instituto
Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a
obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovado em: 31 de março de 2022 (trinta e um de março de dois mil e vinte dois).

BANCA EXAMINADORA

**Dr. Thiago Henrique Napoleão
(Titular – Externo)**

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Bioquímica

**Dra. Virginia Maria Barros de Lorena
(Titular – Interno)**

Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE
Departamento de Imunologia

**Dra Milena de Paiva Cavalcanti
(Orientadora)**

Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE
Departamento de Microbiologia

**Dra. Rayana Carla Silva de Morais
(Coorientadora)**

Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

A Deus, pela vida, conhecimento e resiliência.
Aos meus pais, por todo amor, esforço e dedicação
para minha formação acadêmica.
A todos, que contribuíram para a construção deste
trabalho e não desacreditaram do meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Apesar de tantas tentativas para realização deste mestrado, hoje eu acredito no quanto TUDO ACONTECE NO TEMPO CERTO, o sentimento de GRATIDÃO transborda meu coração e alívio por concretizar mais uma conquista acadêmica.

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida incrível que me proporciona, por tornar-me perseverante e me fazer acreditar cada vez mais em mim mesma.

Em especial, aos meus pais (Maria Simone e José Nunes) e a minha irmã (Alice), por serem minha base, motivo de força, orgulho e incentivo, promovendo sempre as melhores oportunidades de estudo. A minha tia Surami e minha avó Lulu, por todo carinho e auxílio em tantos momentos. A todos os meus familiares, que sempre me aconselhavam e me apoiaram para realização dos meus sonhos.

Ao meu namorado (Édipo), por ser tão paciente, me confortar quando algo dava errado e sempre me lembrar do quanto sou capaz de tudo, por tantos momentos em que pensei que iria desistir, sua parceria e palavras foram essenciais para a construção deste sonho.

As minhas orientadoras (Dra. Milena de Paiva e Dra. Rayana Morais), tenho tanto que agradecer, por todo carinho, apoio e conhecimento compartilhado, desde a iniciação científica. Vocês são inspiração, me transformaram numa cientista e na grande profissional que me tornei, não desacreditaram do meu potencial mesmo após os erros cotidianos, e hoje me fizeram ver o mundo com os olhos da ciência, contribuindo para que nossos projetos ajudem muitas vidas, de maneira ética e prazerosa.

Aos verdadeiros amigos que permaneceram ao meu lado, as minhas amigas de apartamento (Micaele, Amanda, Dayla e Vanessa) por todas as conversas descontraídas na madrugada e apoio, aos amigos de graduação e de pós-graduação da FAFIRE, todos vocês foram essenciais na conclusão desta etapa.

Aos companheiros de equipe e laboratório: Rayana, Victor, Cíntia, Isabelle, Jady, Rômulo, José, Alexsandra, Ana, Michelle, por toda paciência, ajuda e conselhos. Aos colegas que fazem parte do Laboratório de Imunoparasitologia-LIMP, que contribuíram de forma direta ou indireta na realização deste projeto, em especial Dra. Virginia pela empatia e disposição, a toda equipe do SRDC, a Dra. Edi e equipe do SRL pela colaboração, e aos colegas do Laboratório de Biologia Celular de Patógenos-BIOCEL.

Ao Instituto Aggeu Magalhães-IAM, por acolher e fornecer todo suporte, e estrutura necessários para o desenvolvimento deste estudo. À FACEPE, FIOCRUZ, PROEP e CNPq pelo financiamento dos projetos envolvidos.

A todos que compõe a turma 2020.1 de mestrado acadêmico em BBS. Aos professores por todo conhecimento repassado, e aos demais membros do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde.

MUITO OBRIGADA!

“Não deixe que as pessoas te façam desistir daquilo que você mais quer na vida. Acredite. Lute. Conquiste. E acima de tudo, seja feliz!” (Desconhecido)
“A persistência é o caminho do êxito.” (Charles Chaplin)

RESUMO

MELO, Maria Gabriella Nunes de. **Imunologia aplicada ao desenvolvimento de novas estratégias de controle para as leishmanioses: uma abordagem terapêutica em leishmaniose tegumentar americana**. 2022. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

O objetivo deste estudo é avaliar o potencial imunomodulador de novas estratégias terapêuticas para Leishmaniose tegumentar americana (LTA). Os compostos ftalimídicos-triazólicos (RN1, RN2 e RN3) e o extrato bruto da microalga *Chlorella vulgaris* (CV) foram obtidos pelo método de *Click Chemistry* e sonicação, respectivamente. As drogas de referência (miltefosina-M e antimoniato de meglumina-AM) e Imiquimod (Im) também foram avaliadas para comparação. Os índices de seletividade (IS) foram obtidos através de ensaios de concentração inibitória (IC₅₀), em formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, e concentrações citotóxicas (CC₅₀), em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) pelo método de MTT. A partir destas novas estratégias, foi realizada em PBMC de humanos saudáveis, a avaliação do potencial imunomodulador/ resposta imune por meio da expressão gênica (RT-qPCR), produção de citocinas (CBA-Citometria de fluxo) e óxido nítrico (NO). Verificou-se que o RN1 (IS=28,37) foi composto com a maior seletividade para o parasito (tornando-se o composto escolhido para os ensaios de resposta imune), o extrato natural da CV (IS=6,9) obteve resultados promissores por apresentar IS superior ao da droga de referência AM (IS=3,44), e a M (IS=156,36) foi a mais seletiva para o parasito. Ao verificar os dados de resposta imune, observou-se que as células tratadas com o RN1 apresentaram uma elevada expressão para os genes Tbx21, GATA3, RORc e NOS2, porém, observou-se uma supressão imunológica na síntese de citocinas perfil Th1 e Th2. A CV apresentou um perfil modulador, por estimular as citocinas do perfil Th1, mais do que as drogas de referência. O Im apresentou uma alta expressão para os genes Tbx21, GATA3, RORc e Foxp3, com aumento na produção apenas de TNF. Portanto, a CV e Im destacam-se como fortes candidatos terapêuticos ou adjuvantes contra a LTA, devido a modulação dos perfis da resposta imune, baixa toxicidade e ação tóxica sobre o parasito.

Palavras-chave: Terapia; Imunomodulação; Leishmaniose tegumentar americana; Compostos orgânicos; Extrato celular.

ABSTRACT

MELO, Maria Gabriella Nunes de. **Immunology applied to the development of new control strategies for leishmaniasis: a therapeutic approach in American tegumental leishmaniasis**. 2021. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology Applied to Health) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2022.

The objective of this study is to evaluate the immunomodulatory potential of new therapeutic strategies for American Tegumentary Leishmaniasis (ATL). The phthalimidic-triazole compounds (RN1, RN2 and RN3) and the crude extract of the microalgae *Chlorella vulgaris* (CV) were obtained by Click Chemistry and sonication method, respectively. The reference drugs (miltefosine-M and meglumine antimoniate-AM) and Imiquimod (Im) were also evaluated for comparison. Selectivity indices (SI) were obtained through inhibitory concentration (IC₅₀) assays, in promastigotes forms of *Leishmania braziliensis*, and cytotoxic concentrations (CC₅₀), in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by the MTT method. Based on these new strategies, the evaluation of the immunomodulatory potential/immune response through gene expression (RT-qPCR), cytokine production (CBA-Flow cytometry) and nitric oxide (NO) was performed in PBMC from healthy humans. It was found that RN1 (IS=28.37) was compound with the highest selectivity for the parasite (becoming the compound chosen for the immune response assays), the natural extract of CV (IS=6.9) obtained promising results by presenting higher IS than the reference drug AM (IS=3.44), and M (IS=156.36) was the most selective for the parasite. When checking the immune response data, it was observed that cells treated with RN1 showed high expression for Tbx21, GATA3, RORc and NOS2 genes, however, immune suppression was observed in Th1 and Th2 profile cytokine synthesis. CV showed a modulatory profile by stimulating Th1 profile cytokines more than the reference drugs. Im showed high expression for Tbx21, GATA3, RORc and Foxp3 genes, with increased production of TNF only. Therefore, CV and Im stand out as strong therapeutic or adjuvant candidates against ATL due to modulation of immune response profiles, low toxicity and toxic action on the parasite.

Keywords: Therapy; Immunomodulation; American Tegumentary Leishmaniasis; Organic Compounds; Cell Extract.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Status de endemicidade da leishmaniose tegumentar em todo mundo, no ano de 2018.	25
Figura 2 -	Estratificação de risco da leishmaniose tegumentar por município no Brasil, de 2017 a 2019.	25
Figura 3 -	Estratificação de risco da leishmaniose tegumentar por município no Brasil, de 2000 a 2019.	26
Figura 4 -	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp.	28
Figura 5 -	Regulação imunológica de macrófagos humanos contribuindo para diferentes formas clínicas durante a infecção por <i>Leishmania</i> sp.	36
Figura 6 -	Diferenciação dos linfócitos T <i>helper</i> para os perfis do tipo 1, 2 e 17 em resposta as diferentes espécies de <i>Leishmania</i> com definição da ativação macrofágica e impacto na carga parasitária.	38
Figura 7 -	Estrutura Química da Ftalimida.	44
Figura 8 -	Células da microalga <i>C. vulgaris</i> observadas em microscópio óptico (40x).	46
Figura 9 -	Estrutura química dos novos compostos derivados ftalimídicos-triazólicos: RN1, RN2 e RN3.	54
Figura 10 -	Estrutura química da Miltefosina e do Imiquimod.	55
Figura 11 -	Taxa de sobrevivência das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano tratadas com os compostos RN1, RN2 e RN3 em diferentes concentrações.	64
Figura 12 -	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> .	66
Figura 13 -	Taxa de sobrevivência das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano e de <i>Leishmania braziliensis</i> (promastigotas), tratadas com o extrato bioativo de <i>C. vulgaris</i> .	66
Figura 14 -	Taxa de sobrevivência das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano e de <i>Leishmania braziliensis</i>	68

	(promastigotas), tratadas com com antimoniato de meglumina e miltefosina.	
Figura 15 -	Taxa de sobrevivência das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano tratadas com Imiquimod.	69
Figura 16 -	Quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com o composto ftalimídico-triazólico RN1.	72
Figura 17 -	Quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com as drogas de referência.	74
Figura 18 -	Quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com a <i>C. vulgaris</i> .	76
Figura 19 -	Quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com o Imiquimod.	78
Figura 20 -	Dosagem das citocinas produzidas pelas células estimuladas com o composto ftalimídico-triazólico RN1.	81
Figura 21 -	Dosagem das citocinas produzidas pelas células estimuladas com as drogas de referência.	83
Figura 22 -	Dosagem das citocinas produzidas pelas células estimuladas com o extrato de <i>C. vulgaris</i> .	85
Figura 23 -	Dosagem das citocinas produzidas pelas células estimuladas com o Imiquimod.	87
Quadro 1 -	Avaliação geral das análises de resposta imune realizadas após a estímulo de PBMC humano com diferentes candidatos terapêuticos e drogas de referência.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais formas clínicas da leishmaniose tegumentar.	30
Tabela 2 -	Atividade sobre promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i> (IC ₅₀) e efeito citotóxico (CC ₅₀) em células humanas tratadas com os compostos sintéticos ftalimídicos-triazólicos.	65
Tabela 3 -	Atividade sobre promastigotas de <i>L. braziliensis</i> (IC ₅₀) e efeito citotóxico (CC ₅₀) em células humanas tratadas com o extrato bioativo de <i>C. vulgaris</i> .	67
Tabela 4 -	Atividade sobre promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i> (IC ₅₀) e efeito citotóxico (CC ₅₀) em células humanas tratadas com as drogas de referência para as leishmanioses.	68
Tabela 5 -	Índices de Seletividade (IS) dos compostos sintéticos, extrato natural e drogas de referências para o tratamento das leishmanioses.	71
Tabela 6 -	Média da quantificação relativa (RQ Log ₁₀) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com o composto ftalimídico-triazólico RN1 em diferentes concentrações.	72
Tabela 7 -	Comparação entre a o ASLb e a média da quantificação relativa (RQ Log ₁₀) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos, após o estímulo das células com o composto ftalimídico-triazólico RN1 em diferentes concentrações.	73
Tabela 8 -	Correlação entre os genes expressos após os estímulos com as diferentes concentrações do composto ftalimídico-triazólico RN1.	73
Tabela 9 -	Média da quantificação relativa (RQ Log ₁₀) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com as drogas de referência.	75
Tabela 10 -	Comparação entre a o ASLb e a média da quantificação relativa (RQ Log ₁₀) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com as drogas de referência em diferentes concentrações.	75

Tabela 11 -	Correlação entre os genes expressos após os estímulos com as diferentes concentrações das drogas de referência.	75
Tabela 12 -	Média da quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com o extrato de <i>C. vulgaris</i> .	77
Tabela 13 -	Comparação entre a o ASLb e a média da quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com o extrato de <i>C. vulgaris</i> em diferentes concentrações.	77
Tabela 14 -	Correlação entre os genes expressos após os estímulos com as diferentes concentrações do com o extrato de <i>C. vulgaris</i> .	77
Tabela 15 -	Média da quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com o Imiquimod.	79
Tabela 16 -	Comparação entre a o ASLb e a média da quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com o Imiquimod em diferentes concentrações.	79
Tabela 17 -	Correlação entre os genes expressos após os estímulos com as diferentes concentrações do com o Imiquimod.	80
Tabela 18 -	Médias das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células estimuladas com o composto ftalimídico-triazólico RN1.	81
Tabela 19 -	Comparação entre a o ASLb e a média das citocinas após o estímulo das células com o composto ftalimídico-triazólico RN1 em diferentes concentrações.	81
Tabela 20 -	Correlação entre as citocinas produzidas após os estímulos com as diferentes do composto ftalimídico-triazólico RN1.	82
Tabela 21 -	Médias das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células estimuladas com as drogas de referência.	83
Tabela 22 -	Comparação entre a o ASLb e a média das citocinas após o estímulo das células com as drogas de referência em diferentes concentrações.	83

Tabela 23 -	Correlação entre as citocinas produzidas após os estímulos com as diferentes concentrações das drogas de referência.	84
Tabela 24 -	Médias das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células estimuladas com o extrato de <i>C. vulgaris</i> .	85
Tabela 25 -	Comparação entre a o ASLb e a média das citocinas após o estímulo das com o extrato de <i>C. vulgaris</i> em diferentes concentrações.	86
Tabela 26 -	Correlação entre as citocinas produzidas após os estímulos com as diferentes concentrações do extrato de <i>C. vulgaris</i> .	86
Tabela 27 -	Médias das concentrações em pg/mL das citocinas produzidas pelas células estimuladas com o Imiquimod.	88
Tabela 28 -	Comparação entre a o ASLb e a média das citocinas após o estímulo das células com o Imiquimod em diferentes concentrações.	88
Tabela 29 -	Correlação entre as citocinas produzidas após os estímulos com as diferentes concentrações do Imiquimod.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Amazonas
AM-LT	Antimoniato de meglumina
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ASLb	<i>Leishmania braziliensis soluble antigen</i> (Antígeno solúvel de <i>Leishmania braziliensis</i>)
CC	Concentração citotóxica
CD4+	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupamento de diferenciação 4)
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO ₂	Gás Carbônico
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CV	microalga <i>Chlorella vulgaris</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ensaio de imunoadsorção ligado à enzima)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G3PD/	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> (gliceraldeído-3-fosfato
GAPDH	desidrogenase)
gC	Grupo controle
GP63	Glicoproteína 63
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
I	Imiquimod
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IC	<i>Inhibitory concentration</i> (Concentração inibitória)
IDRM	Intradermorreação de Montenegro (Teste de Montenegro)
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN- α	Interferon Alfa

IFNA	<i>Transcriptional activation of interferon</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IFNB	Interferon β
IL-	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IS	Índice de Seletividade
ITS	<i>Internal Transcribed Space</i>
kDNA	<i>Kinetoplast desoxyribonucleic acid</i> (DNA do cinetoplasto)
LCDf	Leishmaniose cutânea difusa
LCDs	Leishmaniose cutânea disseminada
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCRC	Leishmaniose cutânea recidiva cútis
LM	Leishmaniose mucosa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
mg	Miligramas
mL	Militros
mM	Milimolar
M	Miltefosina
MS	Ministério da Saúde
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NNN	Neal, Novy, Nicolle
NO	<i>Nitric Oxide</i> (Óxido Nítrico)
OMS	Organização Mundial da Saúde
Opas	Organização Pan-Americana da Saúde
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Células mononucleares do sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (salina tamponada)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação da Cadeia de Polimerase)
PCRc	PCR clássica ou convencional (PCR qualitativa)

PE	Pernambuco
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	<i>Phytohemagglutinin</i> (fitohemaglutinina)
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase quantitativa)
QIAGEN	QIAamp DNA Mini Kit
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico)
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RQ	<i>Relative quantitation</i> (Quantificação relativa)
RT-qPCR	<i>Reverse transcription quantitative PCR</i> (PCR quantitativa com transcrição reversa)
Sb ⁺⁵ Sb ^V	Antimonial pentavalente
SBF	Soro bovino fetal
SRL	Serviço de Referência em Leishmanioses
SSU rDNA	Subunidade pequena do RNA ribossomal
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor</i> (Fator de Transformação do Crescimento) -β
Th	T helper
Th(f)	Células T foliculares
TM	<i>Trademark</i> (marca registrada)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
Treg	T reguladoras
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
x g	Unidade de força gravitacional
μg	Micrograma
μL	Microlitros
μM	Micromolar
®	<i>Trademark</i> (marca registrada)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REFERENCIAL TEÓRICO/ REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 Aspectos gerais	24
2.2 O gênero <i>Leishmania</i>	26
<u>2.2.1 Ciclo biológico da <i>Leishmania</i></u>	27
2.3 Manifestações clínicas da LTA	29
2.4 Métodos de diagnóstico para LTA	31
<u>2.4.1 Parasitológico</u>	31
<u>2.4.2 Sorológico</u>	32
<u>2.4.3 Molecular</u>	33
2.5 Resposta imunológica para LTA	34
2.6 Métodos de prevenção e controle para LTA	39
2.7 Terapia para LTA	40
2.8 Novos candidatos terapêuticos	43
<u>2.8.1 Compostos sintéticos</u>	43
<u>2.8.2 Compostos naturais</u>	45
<u>2.8.2.1 <i>Chlorella vulgaris</i></u>	47
<u>2.8.3 Medicamentos disponíveis no mercado</u>	47
<u>2.8.3.1 Imiquimod</u>	47
3 JUSTIFICATIVA	49
4 PERGUNTA CONDUTORA	51
5 HIPÓTESE	52
6 OBJETIVO GERAL	53
6.1 Objetivos Específicos	53
7 MATERIAL E MÉTODOS	54
7.1 Tipo de estudo	54
7.2 Obtenção dos compostos sintéticos e extrato da microalga (<i>Chlorella vulgaris</i>)	54
<u>7.2.1 Descrição e obtenção dos compostos sintéticos</u>	54
<u>7.2.2 Cultivo e extração da microalga <i>Chlorella vulgaris</i></u>	55
<u>7.2.3 Drogas de Referência e Imiquimod</u>	55

7.3 Cultivo e obtenção das frações antigênicas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	56
7.4 Coleta de material biológico	56
7.5 Diagnóstico para as leishmanioses	57
7.6 Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) e cultivo celular	57
7.7 Definição das moléculas a serem avaliadas	57
<u>7.7.1 Determinação do índice de seletividade</u>	57
<u>7.7.2 Viabilidade celular</u>	58
<u>7.7.3 Efeito leishmanicida/ leishmaniostático</u>	58
7.8 Análise da resposta imune	59
<u>7.8.1 Expressão gênica</u>	59
<u>7.8.1.1 Extração de RNA - TRIzol® e transcrição reversa para cDNA</u>	60
<u>7.8.2 Dosagem para citocinas do perfil Th1, Th2/Treg e Th17 nos sobrenadantes de cultura</u>	61
<u>7.8.3 Avaliação da produção de Óxido Nítrico</u>	61
7.9 Análise dos dados	62
8 ASPECTOS ÉTICOS	62
9 RESULTADOS	63
9.1 Determinação do Índice de Seletividade (IS)	63
<u>9.1.1 Compostos sintéticos ftalimídicos-triazólicos</u>	63
<u>9.1.2 Extrato natural de <i>C. vulgaris</i></u>	65
<u>9.1.3 Drogas de referência</u>	67
<u>9.1.4 Imiquimod</u>	69
9.2 Análise comparativa	70
9.3 Análise da resposta imune	71
<u>9.3.1 Expressão gênica</u>	71
<u>9.3.2 Produção de citocinas</u>	80
<u>9.3.3 Produção de Óxido Nítrico (NO)</u>	89
<u>9.3.4 Análise comparativa geral</u>	89
10 DISCUSSÃO	92
11 CONCLUSÕES	98
12 PERSPECTIVAS	99
13 PRODUÇÕES ACADÊMICAS	100

13.1 Artigos publicados	100
13.2 Apresentação de trabalhos	100
13.3 Organização de evento	102
13.4 Avaliação de trabalhos	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
APÊNDICE A- TCLE ADULTO IAM	131
APÊNDICE B- TCLE MENOR IAM	132
APÊNDICE C- TERMO DE ASSENTIMENTO IAM	133
APÊNDICE D- ARTIGO RELACIONADO PUBLICADO EM REVISTA	134
ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – IAM	135

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma zoonose causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (GOSCH et al., 2017), que são parasitos intracelulares do sistema mononuclear fagocítico, transmitida aos seres humanos e animais selvagens ou domésticos por meio da picada de flebotomíneo infectado (TONELLI et al., 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017). No Novo Mundo, a LT é conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (BRASIL, 2017), que se caracteriza por um conjunto de doenças com manifestações clínicas e imunopatológicas distintas, nas quais o desenvolvimento e o agravamento dos sintomas relacionam-se com fatores diversos, tais como a espécie de parasito envolvida e a resposta imune do hospedeiro. A determinação da espécie infectante responsável pela LTA pode contribuir para a eficácia do regime terapêutico (HARTLEY, et al. 2014; MEHRAVARAN, et al. 2019; MELO et al., 2020).

Frente à infecção por esses parasitos, existem indivíduos naturalmente resistentes (assintomáticos) e indivíduos com diferentes graus de susceptibilidade (sintomáticos) (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). No entanto, não existe um consenso em relação aos mecanismos imunológicos de suscetibilidade e como diferentes reações poderão ser desencadeadas em um determinado hospedeiro (SOONG; HENARD; MELBY, 2012). Embora a dicotomia dos perfis Th1/Th2 (proteção/suscetibilidade) esteja bem estabelecida, a infecção por *L. (V.) braziliensis* necessita de um equilíbrio entre os dois perfis, devido a exacerbação da resposta Th1 elevar os níveis de IFN- γ e TNF, e provocar uma maior destruição tecidual com conseqüente aumento ou persistência da lesão (CAMPOS et al., 2017; RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998). A caracterização de populações de células T CD4⁺ regulatórias, bem como de outras subpopulações de células T efetoras como Th17, Th9, e células T foliculares (Th(f)), e o conhecimento da plasticidade funcional das células T *helper*, tornou ainda mais complexo o entendimento das interações entre patógeno e hospedeiro responsáveis pelo processo de cura espontânea e doença nesta parasitose (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012; GOLLOB et al., 2008; NYLÉN; GAUTAM, 2010).

Desde 1912, a droga antimonial trivalente descoberta por Gaspar Vianna, posteriormente substituído pelo antimonial pentavalente (Sb^V), é a droga utilizada como primeira escolha na terapia da LTA (RATH et al., 2003). No Brasil, a base de antimonial pentavalente é comercialmente conhecida como Glucantime® (Sanofi-Aventis) e o

tratamento é sistêmico, e tem como objetivo contribuir para a cura clínica, isto é, cicatrização das lesões cutâneas (BRASIL, 2017). No entanto, efeitos colaterais adversos e resistência ao tratamento são frequentemente observados com o uso desta droga, estando estes relacionados às condições particulares e o estado imunológico de cada indivíduo bem como, a espécie parasitária envolvida com a etiologia da doença (PEREZ-FRANCO et al., 2016).

Desta forma, visando o aprimoramento na terapêutica da LTA, a busca contínua por novos candidatos e combinações medicamentosas é fundamental, aliando-se esta busca à complexidade da relação parasito-hospedeiro. Entre os obstáculos a serem superados para o controle das leishmanioses, em infecção por *L. braziliensis*, a terapêutica é a área que apresenta maior escassez de dados científicos, devido à falta de ensaios clínicos em humanos, por necessitar de recursos e investimentos que contribuam para a finalização de etapas das pesquisas básicas, seja *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. Sendo assim, estudos que relacionem os fatores inerentes ao paciente são necessários para que novas estratégias possam surgir como alternativas à terapia atual.

Desta forma, com uma visão mais ampla para o controle das leishmanioses, este estudo tem como objetivo avaliar o potencial imunomodulador de compostos sintéticos derivados de grupamentos farmacofóricos ftalimídicos-triazólicos, extrato bruto de microalga *Chlorella vulgaris* e Imiquimod candidatos à terapia contra LTA.

2 REFERENCIAL TEÓRICO/ REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais

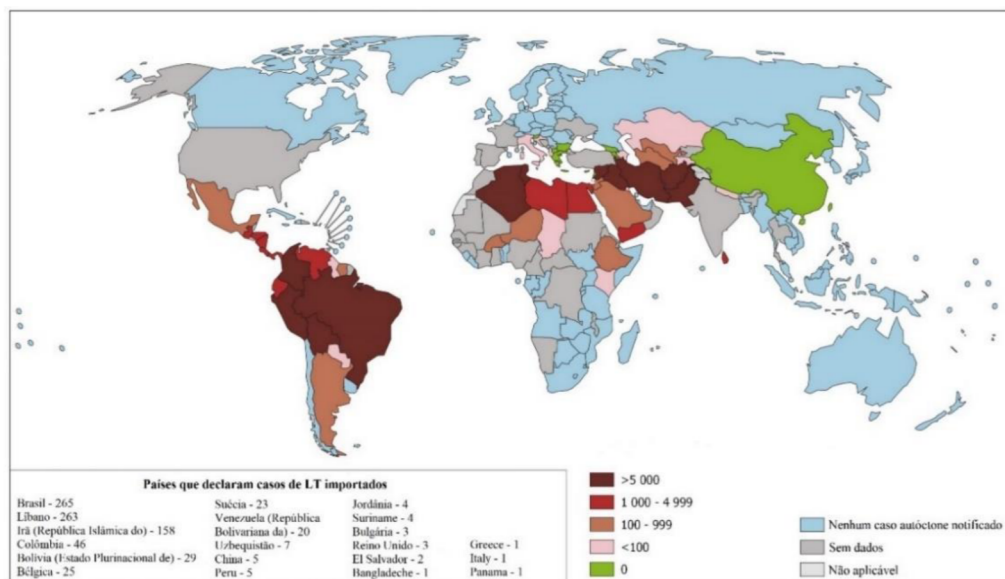
As leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas, por atingirem países em desenvolvimento com falta de atrativos econômicos que contribuam para terapias alternativas mais rápidas e eficazes (HOTEZ; PECOUL, 2010; YAMEY et al., 2018). Representam um grande problema de saúde pública, sendo um complexo de doenças parasitárias e zoonóticas causadas por diferentes espécies de *Leishmania*, transmitidas ao homem por picadas de fêmeas hematófagas de insetos flebotomíneos que, dependendo da região são popularmente conhecidos como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (BRASIL, 2017; CHAPPUIS et al. 2007; MORAIS, 2019; SOUZA, 2014). Com relação aos dados de todas as doenças parasitárias, a mortalidade por leishmaniose é a segunda mais alta, ficando atrás apenas da malária, no entanto, em termos de anos de vida ajustados por incapacidade, é a terceira causa mais comum de morbidade após a malária e a esquistossomose, as crianças <15 anos que mais sofrem com a doença (SisLeish – OPAS/OMS, 2019).

No Novo Mundo, os insetos vetores são do gênero *Lutzomyia*, e no Velho Mundo pertencem ao gênero *Phlebotomus* (MAROLI et al., 2012; MORAIS et al., 2013; TONELLI et al., 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017). Em análise epidemiológica, o vetor transmissor tem forte relação com áreas florestais, com a presença de diferentes espécies de *Leishmania*, no entanto, após o desmatamento, acabaram adentrando ao ambiente peridomiciliar (NEVES, 2011; SOUZA, 2014). Além da transmissão vetorial, a LT pode ser transmitida por acidentes laboratoriais, através de materiais biológicos perfuro-cortantes contaminados e por transfusão de sangue (CATONE et al., 2003; DELEGADO et al., 1996; ELMAHALLAWY et al., 2014; SYMMERS, 1960).

O homem é considerado hospedeiro acidental, pois o protozoário infecta cerca de nove ordens de mamíferos e répteis em áreas subtropicais e tropicais por todo mundo (MARINHO-JÚNIOR, 2015). A LT tem ampla distribuição mundial, mas no Continente Americano há registro de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile, Uruguai e El Salvador (TORRES-GUERRERO et al., 2017). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 350 milhões de pessoas podem estar expostas ao risco de infecção, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas por ano (Figura 1) (ALVAR et al. 2012; BRASIL, 2017; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). Nas Américas,

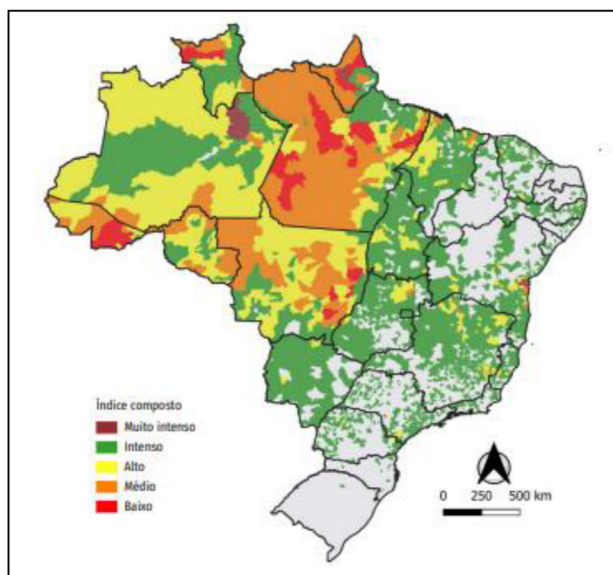
um total de 940.396 casos novos de LT e leishmaniose mucosa (LM) foi reportado por 17 dos 18 países endêmicos no período de 2001-2017, com uma média anual de 55.317 casos. Em 2019, confirmaram-se 15.484 casos novos de LT no Brasil, com coeficiente de detecção de 7,37 casos a cada 100 mil habitantes. Verificou-se no território brasileiro um maior número de casos registrados na região Norte, seguido da região Nordeste (Figura 2 e 3) (SisLeish – OPAS/OMS, 2019; BRASIL, 2021).

Figura 1. Status de endemicidade da leishmaniose tegumentar em todo mundo, no ano de 2018.



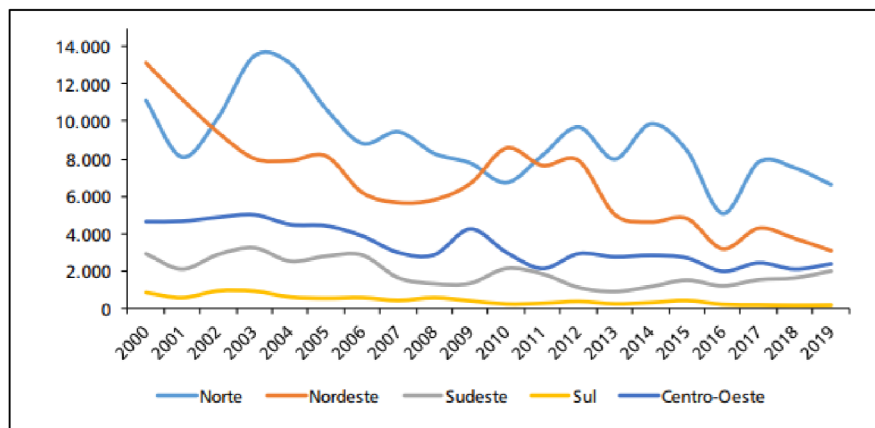
Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2018 (tradução realizada pela autora).

Figura 2. Estratificação de risco da leishmaniose tegumentar por município no Brasil, de 2017 a 2019.



Fonte: Boletim Epidemiológico (Sinan/ Ministério da Saúde), 2021.

Figura 3. Estratificação de risco da leishmaniose tegumentar por município no Brasil, de 2000 a 2019.



Fonte: Boletim Epidemiológico (Sinan/ Ministério da Saúde), 2021.

No entanto, a pandemia COVID-19 afetou ações de controle e vigilância de doenças, como as leishmanioses, devido ao impacto nas ações de busca ativa, diagnóstico precoce e acompanhamento no tratamento de pacientes casos, além de dificultar o avanço de outras atividades de campo (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2021).

2.2 O gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania* é subdividido em quatro subgêneros, sendo três destes infectantes em mamíferos (*Leishmania* [*Leishmania*], *Leishmania* [*Viannia*] e *Leishmania* [*Mundinia*]) e um infectante em répteis (*Leishmania* [*Sauroleishmania*]). Cerca de 20 espécies de *Leishmania* são patogênicas ao homem (AKHOUNDI et al., 2017; ASHFORD, 2000; CECCARELLI et al., 2017; GOSCH et al., 2017;). As espécies que causam a LT no continente europeu e asiático são: *Leishmania* (*Leishmania*) *tropica*, *L.* (*Leishmania*) *major* e *L.* (*Leishmania*) *aethiopica*. Algumas cepas de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* podem ser responsáveis por causar LT sem comprometimento dos órgãos internos em regiões do Velho Mundo (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVÁ, 2012; MASMOUDÍ et al. 2013).

Nas Américas, foram identificadas 12 espécies dermatrópicas da LTA, sendo oito pertencentes ao subgênero *Viannia* e três ao subgênero *Leishmania* (TORRES-GUERRERO et al., 2017), os quais fazem parte do complexo *Leishmania braziliensis*: *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* e *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana*, e

do complexo *Leishmania mexicana*: *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) waltoni*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*, além de *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVÁ, 2012; SHAW et al., 2015).

No Brasil, já foram isoladas sete espécies de *Leishmania* que causam LTA, sendo estas: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (L.) amazonensis* (ESPIR et al., 2016). As espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, são relacionadas a uma forma mais grave da doença, pois tendem ao comprometimento mucoso ou resistência ao tratamento convencional (GOMES et al., 2014; KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVÁ, 2012; VEASEY et al., 2020). A espécie mais prevalente em seres humanos é a espécie *Leishmania (V.) braziliensis*, encontrada em todas as áreas endêmicas do Brasil, responsável pela transmissão no estado de Pernambuco, com a qual relaciona-se as atividades profissionais dos hospedeiros vertebrados, tais como cultivo de cana de açúcar, cacau e banana (MARINHO-JÚNIOR, 2010), sendo transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos, tais como, *Lutzomyia whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei*, entre outras (BRITO et al., 2012).

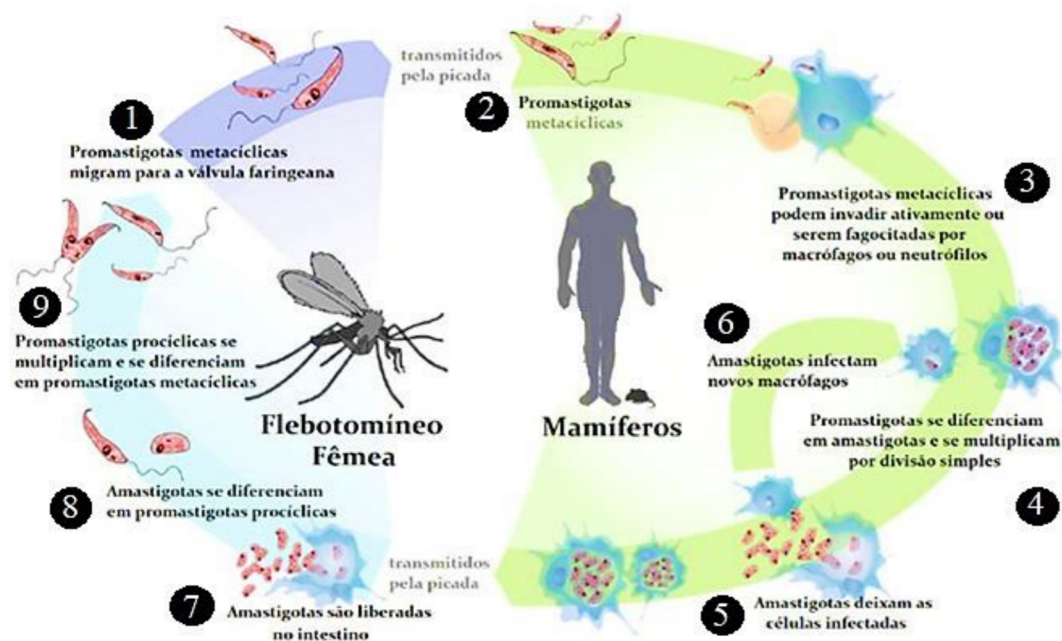
2.2.1 Ciclo biológico da *Leishmania*

Em áreas endêmicas para a doença, habitantes locais e viajantes tem mais riscos de infecção, devido à realização de ocupações em horários de atividade do inseto vetor (crepúsculo e noite). A *Leishmania* apresenta um ciclo biológico digenético que, com base nas diferenças anatômicas dos sítios de desenvolvimento dos parasitos dentro aparelho digestivo do flebotomíneo, necessita de um hospedeiro invertebrado, e outro vertebrado para finalização de seu ciclo (MORAIS, 2019). A saliva do inseto vetor tem biomoléculas, capazes de interferir com os processos hemostáticos, inflamatórios e imunológicos dos hospedeiros vertebrados. Desta forma, a saliva do inseto contribui no processo de hematofagia e favorece a transmissão do parasito, devido as substâncias anti-hemostáticas permitirem um curto tempo para a alimentação sanguínea, contribuindo para uma maior chance de sobrevivência do inseto. Estas biomoléculas também apresentam propriedades imunomoduladoras que interferem na apresentação dos antígenos pelos macrófagos e produção de citocinas, aumentando a produção de IL-4 e IL-6 e inibindo a

produção TNF, IFN- γ e IL-12 (ANVERSA et al., 2018; RIBEIRO, 2000; RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003).

O ciclo se inicia no flebotômíneo infectado, no qual as formas amastigotas ingeridas no sangue de mamíferos infectados modificam-se para promastigotas (forma flagelada e móvel) no intestino do inseto e realizam divisões binárias para multiplicação dos parasitos. Após diversas divisões, as formas promastigotas chegam à probóscide (aparelho bucal) do inseto, para que sejam liberadas durante o repasto sanguíneo, para o hospedeiro vertebrado. Nos vertebrados, os parasitos do gênero *Leishmania* infectam fagócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos) e utilizam as estruturas celulares para multiplicação. O sistema imune inato reconhece a presença do protozoário e células como os macrófagos fagocitam os parasitos, o qual transforma-se em amastigotas no meio intracelular. A forma amastigota do parasito realiza várias divisões binárias, até que possa causar a lise celular. Após a lise do macrófago, as amastigotas são liberadas para o meio extracelular, facilitando a exposição destas para outros fagócitos. Assim, outro flebotômíneo será infectado ao se alimentar deste vertebrado, dando início a um novo ciclo (Figura 4) (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; NEVES, 2011; REY, 2008; ROQUE; JANSEN, 2014).

Figura 4. Ciclo de vida da *Leishmania* sp.



Fonte: LadyofHats Mariana Ruiz Villarreal, 2008 (modificado pela autora, 2021).

Legenda: Descrição do ciclo de vida da *Leishmania* sp. no inseto vetor e no mamífero hospedeiro. No esquema, as figuras de 1-6 representam as etapas do ciclo heteroxênico do parasito no hospedeiro

vertebrado: (1) Promastigotas metacíclicas migram até a probóscide do inseto. (2) Durante o repasto sanguíneo ocorre a infecção do hospedeiro vertebrado. (3) As formas promastigotas podem ser fagocitadas ativamente e infectar fagócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos). (4) Após serem fagocitadas, as promastigotas diferenciam-se em amastigotas e utilizam estruturas do meio intracelular para multiplicar-se por divisão binária. (5) A forma amastigota permite que o parasito realize várias divisões binárias, até que possa causar uma a lise celular. (6) Após a lise, o fagócito libera as amastigotas para o meio extracelular, facilitando a exposição destas, para que outras células fagocite-as, e estas continuem multiplicando-se. As figuras de 7-9 representam as etapas do ciclo heteroxênico do parasito no hospedeiro invertebrado: (7) O flebotômíneo ao realizar seu repasto sanguíneo no mamífero infectado dará início a um novo ciclo. (8) A amastigota diferencia-se em promastigota procíclica. (9) Promastigotas procíclicas multiplicam-se por divisão binária e diferenciam-se em promastigotas metacíclicas (forma infectante).

2.3 Manifestações clínicas da LTA

As manifestações clínicas da LTA variam de acordo com a espécie do parasito responsável pela infecção, área endêmica, vetor transmissor, ecossistema, local da picada e localização das lesões, além de associar-se com a resposta imune do indivíduo infectado (BRASIL, 2017; VASCONCELOS et al., 2018). Após infecção, o período de incubação varia entre duas semanas e dois meses (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Na LTA, o parasito acomete o tecido epitelial de revestimento através de lesões cutâneas; no entanto, dependendo da espécie etiológica, pode evoluir após dias ou anos para a forma mucosa, por meio dos vasos sanguíneos/ linfáticos, podendo comprometer as mucosas do trato respiratório superior, como nariz, faringe e laringe (GOTO, LINDOSO, 2010; LESSA et al., 2007). O desenvolvimento da lesão ulcerada é precedido por uma mácula, que perdura de um a dois dias após picada do flebotômíneo. A mácula evolui para uma pápula que aumenta progressivamente e produz, geralmente, uma úlcera indolor, que pode se autocicatizar sem tratamento. A úlcera típica da LTA costuma localizar-se em áreas expostas da pele, tais como cabeça, membros superiores e inferiores (MELO et al., 2020). Outros tipos de feridas cutâneas podem ser encontrados, mas com menos frequência, tais como as lesões nodulares, papulares, pápulo-tuberosas, vegetantes e verrucosas. As lesões podem permanecer localizadas e evoluírem para uma cura espontânea, ou disseminar-se através dos vasos linfáticos, e produzir lesões secundárias em outras regiões da pele e mucosas (BRASIL, 2017; GOTO; LINDOSO, 2012; MORAIS, 2019; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Diante da diversidade de características clínicas, a LTA recebe diferentes classificações, tais como leishmaniose cutânea localizada (LCL), cutânea disseminada (LCDs), cutânea difusa (LCDf), mucocutânea (LMC) e cutânea recidiva cútis (LCRC) (BRASIL, 2017) (Tabela 1). Frente à infecção por estes parasitos, existem indivíduos naturalmente resistentes (assintomáticos) e indivíduos com diferentes graus de susceptibilidade (sintomáticos) (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). A LCL é a primeira a apresentar-se na maioria dos casos, podendo progredir para outras formas dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da quantidade de picadas realizadas pelo inseto (GOTO; LINDOSO et al. 2012).

Tabela 1. Principais formas clínicas da leishmaniose tegumentar.

Classificação	Manifestação clínica
Leishmaniose cutânea localizada (LCL)	Apresenta única ou múltiplas lesões, do tipo ulcerada com bordas elevadas; localizadas exclusivamente na pele (onde ocorreu a picada do flebotomíneo) com tendência a cura espontânea e boa resposta ao tratamento.
Leishmaniose cutânea disseminada (LCDs)	Forma incomum, com lesões papulares/acneiformes em 2 áreas diferentes do corpo; a disseminação das lesões ocorre por via hemática ou linfática, sendo causada em até 2% dos casos de LCDs; apresenta resultados variados ao tratamento, necessita, na maioria dos casos, medicamentos adicionais para alcançar a cura clínica.
Leishmaniose cutânea difusa (LCDf)	Forma rara e grave, acomete pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de <i>Leishmania</i> ; com nódulos múltiplos e disseminados, não ulcerados, repletos de macrófagos parasitados.
Leishmaniose mucocutânea (LMC)	Lesões desfigurantes e destrutivas, localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores envolvendo membranas mucosas; no Brasil, cerca de 3% a 6% são casos de LMC, mas em municípios endêmicos pode ultrapassar 25%; pacientes com alguma forma cutânea crônica (lesões que ultrapassam seis semanas ou mais para cicatriza) pode evoluir para a LMC.
Leishmaniose cutânea recidiva cútis (LCRC)	Caracteriza-se pela reativação da lesão nas bordas, após cicatrização da lesão por cura espontânea ou medicamentosa, mantendo-se o fundo com aspecto cicatricial; o reaparecimento costuma ocorrer na borda da lesão cicatrizada anteriormente, e a resposta terapêutica costuma ser inferior à da lesão primária.

Fonte: a autora (baseada em BANDEIRA et al., 2018; BRASIL, 2017; COSTA et al., 2009; MORAIS, 2019).

Na maioria dos casos, as lesões são capazes de se autocicatrizarem sem tratamento. No entanto, a cura espontânea da lesão pode levar meses ou anos para ocorrer, mas o DNA dos parasitos pode ser encontrado em pacientes curados, mesmo após anos do tratamento e com cura clínica bem-sucedida (SCHUBACH et al., 1998a; SCHUBACH et al., 1998b; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

2.4 Métodos de diagnóstico para LTA

O diagnóstico da LT é baseado em critérios que consideram dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (ESPIR et al., 2016; GOMES et al., 2014; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015); contribuindo para o diagnóstico final e o rápido tratamento do paciente, estabelecendo importantes estratégias de intervenção para o controle desta doença (MOREIRA; YADON; CUPOLILLO, 2018). A seleção do teste diagnóstico depende da estrutura e recursos disponíveis para empregar o tipo de exame (VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

Os dados epidemiológicos contribuem para identificar regiões endêmicas, e focos do inseto vetor responsável pela infecção. O diagnóstico clínico é realizado pela anamnese da lesão característica da LTA (GONTIJO; CARVALHO, 2003). O diagnóstico diferencial com outras doenças sempre deve ser considerado, com base na forma clínica e as características da lesão (BRASIL, 2017). No entanto, o diagnóstico laboratorial é feito a partir de exames parasitológicos, sorológicos e moleculares.

2.4.1 Parasitológico

O diagnóstico parasitológico é considerado o padrão ouro, devido à alta especificidade, seja pela realização do exame histopatológico ou isolamento *in vitro* do parasito. A pesquisa direta é realizada pela identificação de formas amastigotas em esfregaços com escarificação ou *imprint* da borda da lesão (com o auxílio de bisturi estéreis), *imprint* do fragmento cutâneo da biópsia em lâmina por aposição e punção aspirativa, sendo coradas posteriormente com derivados do Romanowsky (Giemsa ou Leishman) (BRASIL, 2017; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). O isolamento é realizado a partir de aspirado ou biópsia da lesão inseridos em meio ágar sangue, NNN (Neal, Novy, Nicolle), ou Schneider, entre 24°C e 26°C nos quais o parasito cresce bem, ou através da inoculação de material infectado em animais de laboratório susceptíveis à infecção, sendo este último mais utilizado em laboratórios de pesquisa (ALAM et al.,

2016; BART et al., 2013; BRASIL, 2017; GOTO; LINDOSO, 2010;). A pesquisa direta em escarificados da lesão possui uma baixa sensibilidade (50-70%) quando comparado a identificação de parasitos em amostras de biópsia, que por sua vez pode apresentar boa sensibilidade (70-100%) (ANDRADE et al., 2005; VEGA-LOPEZ, 2003).

2.4.2 Sorológico

Os testes sorológicos têm a finalidade de identificar anticorpos anti-*Leishmania* no soro de pacientes com LT e estes podem ser detectados por teste imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* [ELISA]) ou imunofluorescência indireta (IFI), aglutinação direta e outros ensaios. Esses métodos devem ser realizados em centros de referência, por técnicos treinados, desencadeando uma aplicabilidade limitada no diagnóstico de um caso de LTA, não sendo rotineiramente utilizados na prática clínica, além da reação cruzada com outras tripanossomíases (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2010; SARKARI et al., 2014).

Com relação ao ELISA, a utilização de antígenos solúveis de *L. braziliensis* apresentou melhor desempenho do que os antígenos solúveis das demais espécies utilizadas no diagnóstico sorológico de LTA (ZANETTI et al., 2019). A IFI é uma técnica sensível, mas existe a possibilidade de reações cruzadas, especialmente com o *Trypanosoma cruzi*, agente da doença de Chagas, e com a *L. infantum*, agente da leishmaniose visceral (ANDRADE et al., 2005). Aos pacientes com múltiplas lesões, que apresentaram sorologia positiva, os títulos de anticorpos médios, principalmente IgG, são significativamente mais elevados, refletindo numa exposição antigênica mais expressiva (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

No Brasil, a intradermorreação de Montenegro (IDRM), também conhecida como Teste de Montenegro, é uma reação de hipersensibilidade celular retardada, identificada através da presença de inflamação, eritema ou erupção cutânea, após inoculação de um antígeno específico de *Leishmania* por via subcutânea. O exame pode apresentar negatividade nas primeiras quatro a seis semanas após o surgimento da lesão cutânea. A técnica é utilizada em inquérito diagnóstico populacional como apoio ao método de pesquisa direta, conforme fluxo sugerido pelo Ministério da Saúde. Em casos de cura clínica (espontânea ou por tratamento), a IDRM pode permanecer positiva durante vários anos, obtendo limitação no diagnóstico de pacientes com eventual recidiva, devido ao teste não diferenciar entre infecções recentes e antigas (GOTO; LINDOSO, 2010;

BRASIL, 2017). Atualmente, com liberação de nota informativa oficial pelo Ministério da Saúde em 2016, não há lotes disponíveis da IDRM, devido a suspensão da produção dos antígenos pelo Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiologia (CPPI - Secretaria Estadual de Saúde, Piraquara, PR, Brasil) (ALBUQUERQUE, 2018; MORAIS, 2019).

2.4.3 Molecular

A utilização de técnicas moleculares modernas, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), traz alternativas às dificuldades encontradas nas técnicas clássicas de diagnóstico da LTA, devido a detecção com grande sensibilidade e especificidade das frações do DNA do parasito e rapidez na obtenção dos resultados, contribuindo para o acompanhamento dos níveis parasitários na corrente sanguínea do indivíduo infectado, e análise de um maior número de amostras (PAIVA CAVALCANTI et al., 2009; 2013; PIERCE, 2016). A PCR qualitativa (PCR clássica ou convencional, PCRc) baseia-se na amplificação de uma região específica de DNA/cDNA em amostras positivas, utilizando *primers* (iniciadores) escolhidos para a reação. O produto originado da região amplificada é visualizado por eletroforese (com gel de agarose ou poliacrilamida) (CAMARA-COELHO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2005; PIERCE, 2016).

A qPCR (PCR em tempo real) revolucionou o processo de quantificação de ácidos nucleicos (DNA ou RNA), de forma precisa e mais reprodutível, devido a determinação de valores na fase exponencial da reação, denominado de *Cycle Threshold* (*Ct*). A detecção exata do *Ct* é realizada por fluoróforos (*SYBR Green* ou *TaqMan*), que aumentam a fluorescência de acordo com a quantidade de produto amplificado. Estudos confirmam as vantagens da qPCR para a identificação e verificação do seguimento terapêutico dos pacientes, além de identificar/quantificar a espécie de *Leishmania* responsável pela infecção, pois requer quantidades muito pequenas de DNA/cDNA, trazendo grandes vantagens de diagnóstico para pacientes com baixa parasitemia, além da utilização de diferentes espécimes clínicos, como amostras de sangue, biópsia e *imprint* de lesão (ANDRADE et al., 2005; MORAIS et al., 2020; PAIVA-CAVALCANTI, 2008; PAIVACAVALCANTI et al., 2009; 2013).

Os alvos mais utilizados na PCR para diagnóstico das leishmanioses são DNA do cinetoplasto (kDNA) (região altamente conservada) e DNA ribossomal (como *Internal Transcribed Space* [ITS] e subunidade menor [SSU rDNA]) (GOTO; LINDOSO, 2012; MORAIS et al., 2020; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009, 2013, 2015; TOZ et al.,

2013). O kDNA apresenta duas grandes moléculas chamadas de maxicírculos e minicírculos de DNA, mas a maioria dos *primers* utilizados no diagnóstico utilizam a região das sequências de minicírculo do kDNA (LOPES, 2010; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013). No entanto, ainda é necessário desenvolver uma metodologia de consenso, que avalie a carga parasitária como um possível marcador substituto de prognóstico e monitoramento do tratamento, mas os elevados custos associados à realização desta técnica e a necessidade de equipamento apropriado ainda impedem a implantação da PCR em algumas áreas endêmicas (ANDRADE et al., 2005; MOREIRA; YADON; CUPOLILLO, 2018).

2.5 Resposta imunológica para LTA

O controle da infecção depende do sistema imune do hospedeiro dirigir-se para o sítio de infecção (imunidade celular), pois a capacidade de evasão do parasito, adaptação/virulência determinam a evolução da doença. As formas promastigotas da *Leishmania* são injetadas na derme, através da picada do flebotomíneo, desta forma a pele serve como local de entrada do parasito para o organismo do hospedeiro, no entanto, as promastigotas induzem a ativação do sistema imune inato, pois dependem da ação fagocítica das células. O sistema imune inato recruta células inflamatórias (como neutrófilos, macrófagos, células *natural killer* e células dendríticas) para local da lesão e ativação da resposta adaptativa (linfócitos B e T) (ANVERSA et al., 2018; CAVALCANTE, 2018; CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO; COUTINHO, 2014).

As promastigotas podem induzir os neutrófilos a produzirem TGF- β , ocasionando a inibição das funções efectoras antimicrobianas dos fagócitos, colaborando para a multiplicação parasitária (NASCIMENTO, 2012). Outro fato relevante é que a saliva do flebotomíneo contém uma grande variedade de moléculas hemostáticas, inflamatórias e imunomodulatórias, sendo capazes de proteger o parasito e aumentar sua infectividade (MARZOUKI et al., 2011).

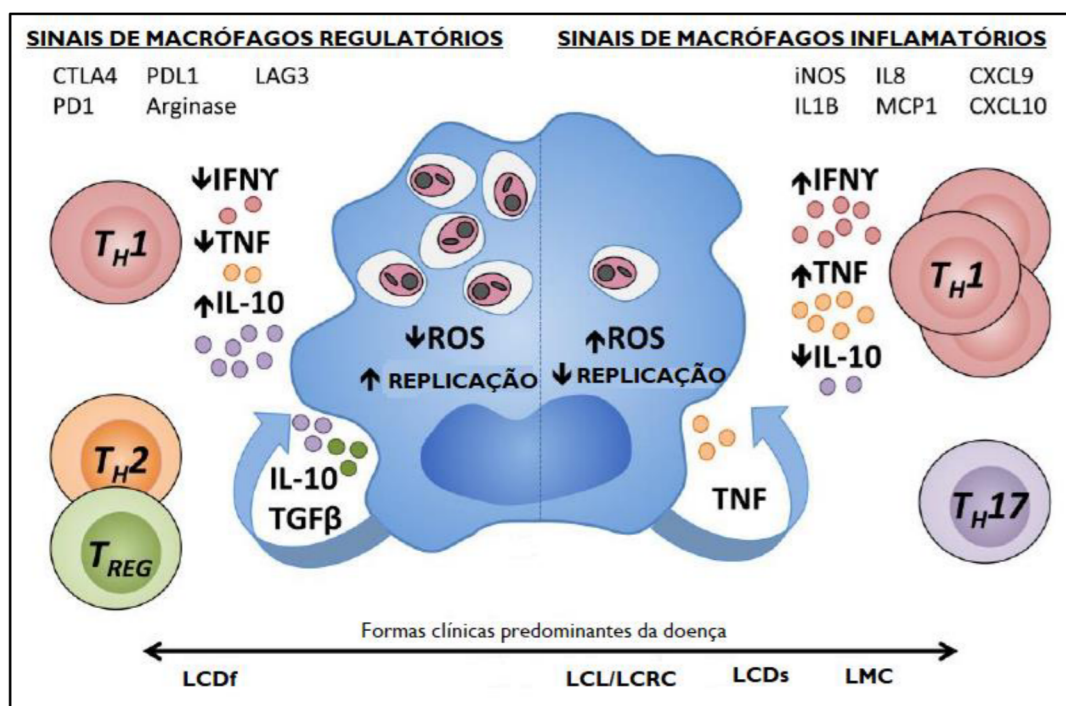
Entre outros mecanismos de defesa do parasito, destaca-se a produção de dois glicoconjugados de superfície: o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína 63 (gp63), que conferem resistência à lise mediada pelo complemento. O LPG atua na ativação do sistema complemento, que induz a fagocitose e inibição das enzimas lisossomais do complexo lítico (com função de destruição do parasito), o qual impede a inserção do complexo C5b-9 de ataque à membrana, para a formação de “poros” na membrana da

célula, com consequente turgência e lise, devido a entrada de água e íons. A gp63 promove a clivagem C3b em C3bi (forma inativa) na superfície do parasito, impedindo a formação de C5 convertase, e consequentemente a clivagem de C5 para produção de C5b que ativa a via de ataque à membrana. Assim, LPG e gp63 evitam a formação do complexo de ataque de membrana. A gp63 vai auxiliar na ligação do parasito com os receptores dos macrófagos. A internalização dos parasitos na célula depende da interação das moléculas C3b e C3bi, que atuam na opsonização, facilitando a fagocitose devido a ligação destas moléculas aos receptores do sistema complemento (CR1 e CR3), presentes nas células (como macrófagos). O receptor CR3 é um importante mecanismo de escape, pois inativa o efeito microbicida dos macrófagos e inibe a produção de IL-12 induzida pela imunidade mediada por células, permitindo a multiplicação do parasito no interior da célula (ABBAS; KUMAR; FAUSTO, 2005; ANVERSA et al., 2018; CAVALCANTE, 2018; SUKUMARAN; MADHUBALA, 2004).

Desta forma, a sobrevivência da *Leishmania* em macrófagos envolve diversas interações e o reconhecimento de ligantes específicos do parasito, por receptores presentes na membrana celular dos macrófagos, para que após a diferenciação em amastigotas ocorra a proliferação por divisão binária, até o rompimento celular, ocasionando a infecção de novas células, como outros macrófagos ou células dendríticas e fibroblastos. A eliminação do parasito baseia-se no pH ácido das células que promove a transformação das promastigotas em amastigotas, sendo mais resistentes à atividade microbicida dos macrófagos, pois podem inibir enzimas hidrolíticas e resistir à produção de óxido nítrico (NO) (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; ANVERSA et al., 2018; GONTIJO; CARVALHO, 2003; RAI et al., 2017). No entanto, os macrófagos constituem um grupo heterogêneo, com duas formas de ativação baseadas nas diferentes manifestações clínicas, sendo classificadas em fenótipos M1 (ativação clássica) e M2 (ativação alternativa). Os macrófagos M1 caracterizam-se pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF), IL-12, quimiocinas e NO, geradas por óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Diferente dos macrófagos M2 que apresentam propriedades regulatórias/anti-inflamatórias caracterizadas pela liberação de IL-10 e/ou TGF- β ; que contribuem no desenvolvimento do parasita ativando a Arginase-1, uma enzima que compete com a iNOS pelo L-arginina (Figura 5) (MUXEL et al., 2018; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

A resposta imune adaptativa celular além de ser ativada através das células apresentadoras de antígenos (como as células dendríticas e macrófagos), pode ser induzida de início por fatores transcricionais específicos, para diferenciar as subpopulações de células T CD4⁺. Como os reguladores principais: Tbet (Tbx21) que induz para o perfil Th1, GATA3 para o perfil Th2, RORc para o perfil Th17 e FOXP3 para o perfil Treg (FANG; ZHU, 2017; ZHU, 2010), NOS2 para o NO (MUXEL; LARANJEIRA-SILVA; ZAMPIERI; FLOETER-WINTER, 2017), entre outros.

Figura 5. Regulação imunológica de macrófagos humanos contribuindo para diferentes formas clínicas durante a infecção por *Leishmania* sp.



Fonte: Scorza, Carvalho e Wilson (2017) – tradução realizada pela autora.

Legenda: Macrófagos humanos parasitados por *Leishmania* sp. são regulados por citocinas presentes no local da infecção. As citocinas inflamatórias do perfil Th1, IFN e TNF podem induzir sinergicamente a produção de ROS por macrófagos, inibindo assim a replicação do parasito dentro do fagolisossomo. As células Th17 estão aumentadas nas lesões inflamatórias na LMC. Os transcritos quimioatraentes (IL8, MCP1, CXCL9 e CXCL10) e os transcritos associados à ativação clássica (tipo 1) de macrófagos (iNOS, IL1) são medidos em lesões inflamatórias na LC. Em um ambiente regulatório (à esquerda), existem níveis baixos de citocinas do perfil Th1 com falta de efetores microbicidas. Células T ou citocinas derivadas de macrófagos, incluindo citocinas do perfil Th2, IL-10 e TGF antagonizam os efeitos de IFN e TNF, e poliaminas aumentadas podem resultar na proliferação do parasito. As células TREG podem suprimir os efeitos do IFN. Os receptores inibitórios em células T CD4⁺ ou CD8⁺ (CTLA4, PD1 e LAG3) e seus contra-ligantes (CD80, CD86 e PDL1) estão associados à exaustão de células T. A atividade da arginase está associada à ativação de macrófagos não clássicos do tipo M2. iNOS: Óxido nítrico sintase induzível;

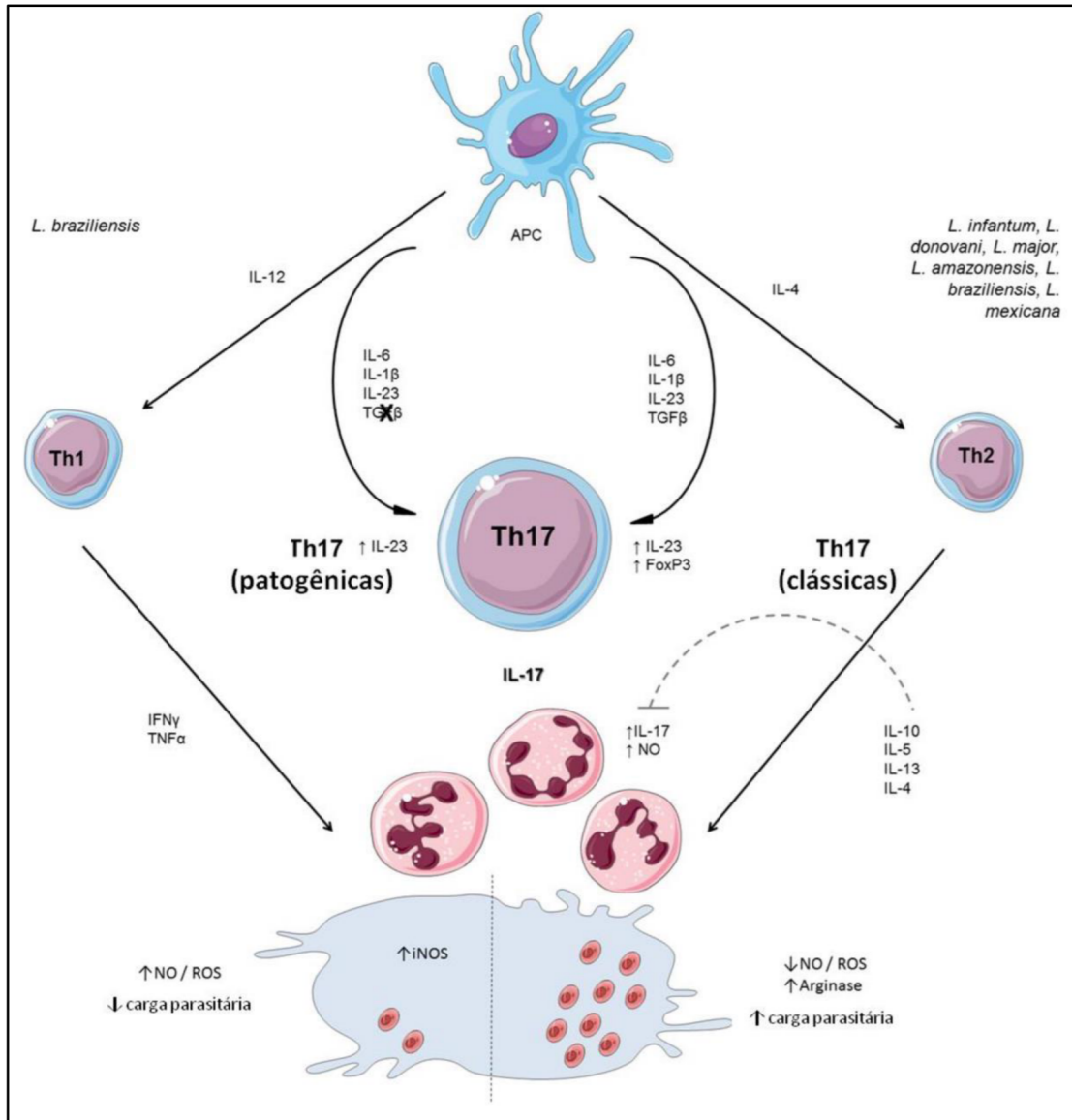
ROS: espécies reativas de oxigênio LCL: leishmaniose cutânea localizada, LCDs: leishmaniose cutânea disseminada, LCDf: leishmaniose cutânea difusa, LMC: leishmaniose mucocutânea, LCRC: leishmaniose cutânea recidiva cútis; MCP1: proteína quimioatraente de monócito 1; CXCL: ligante de quimiocina (motivo C-X-C); IFN γ : Interferon γ ; TNF: Fator de necrose tumoral, IL10: Interleucina 10, TGF β : Fator de crescimento transformador β , ROS: Espécies reativas de oxigênio, DTH: Hipersensibilidade tipo 1 retardada; TREG: célula T reguladora; TH: célula T auxiliar; MCP: proteína quimioatraente de monócitos, CTLA4: Linf T citotóxico.

O sistema imunológico do indivíduo com LTA desencadeia uma resposta imune adaptativa, através da atividade dos linfócitos T CD4+, podendo promover uma resposta protetora (Th1) ou de suscetibilidade à doença (Th2). O perfil de citocinas do tipo Th1 caracteriza-se por níveis elevados de IFN- γ , IL-12, IL-2 e TNF, enquanto do tipo Th2 aumenta a produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que inibem a ativação macrófagica, e consequentemente ocorre a formação das manifestações clínicas. Após diferenciação dos linfócitos T CD4+ para o tipo Th1, a citocina IL-12 produzida por células apresentadoras de antígenos (APCs), linfócitos B, células dendríticas e macrófagos, medeia a resposta de proteção e induz a produção do TNF e interferon gama (IFN- γ) para promover o controle e destruição de parasitos através da ativação de macrófagos infectados. A citocina IFN- γ , de forma sinérgica com o TNF, atua ativando a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) de macrófagos, para produção de NO, sendo gerada através de um processo denominado “*respiratory burst*” (explosão respiratória), que pode ser definida como um aumento do consumo de metabólitos de oxigênio no interior dos macrófagos, resultando na morte intracelular do parasito e controle da doença. Na resposta do perfil Th2, existem fatores que antagonizam os efeitos destas citocinas e favorecem a multiplicação do parasito, tais como a interleucina (IL)-4, IL-10 e o fator de crescimento tumoral beta (*tumor growth factor beta* - TGF- β), que são moléculas anti-inflamatórias, que inibem a produção de IFN- γ e bloqueiam a ativação de macrófagos/ neutrófilos (Figura 6) (ALEXANDER; BROMBACKER, 2012; AMEEN, 2010; BARRAL et al., 1995; BOGDAN; ROLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000; BOURREAU et al., 2001; NYLEEN; GAUTAM, 2010; RIBEIRO-ÁVILA, 2017; SALHI et al., 2008).

No entanto, embora a produção de citocinas proinflamatórias ser essencial no controle da morbidade da LT, a produção excessiva desses fatores solúveis pode desencadear a imunopatologia mais grave da doença, como a forma clínica mucocutânea. O perfil Th2 associa-se à persistência do parasito no local da infecção, a produção de citocinas anti-inflamatórias em baixos níveis diminui as reações inflamatórias e acelera o

processo de cicatrização de feridas (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016), pois mantém um equilíbrio entre os perfis para uma cura clínica mais rápida.

Figura 6. Diferenciação dos linfócitos T *helper* para os perfis do tipo 1, 2 e 17 em resposta as diferentes espécies de *Leishmania* com definição da ativação macrofágica e impacto na carga parasitária.



Fonte: Gonçalves-de-Albuquerque et al. (2017), traduzido pelo autor.

Legenda: Células T virgens se diferenciam no tipo Th1 na presença de IL-12, que atua na ativação de genes pró inflamatórios como IFN γ e TNF. Na presença de IL-4 são ativados genes do perfil Th2, que incluem IL-10, uma importante citocina reguladora da ativação macrofágica e inflamação. A diferenciação de células Th17 decorre da ativação de células T pela combinação de TGF β , IL-6, IL-1 β e IL-23. A presença de IL-23 é determinante para a manutenção de células Th17. As células Th17 também podem ser geradas independentemente do TGF β , numa via alternativa de ativação. Quando as células Th17 "clássicas" foram comparadas com aquelas geradas de modo alternativo as células "Th17 alternativas" foram mais patogênicas por apresentar maior produção de IFN γ . O IFN γ produzido por Th1 ativa a enzima iNOS e aumenta a produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), necessários para eliminação das amastigotas. A produção de ROS no microambiente de infecção é reforçada pela presença

dos neutrófilos recrutados pela IL-17 e, na ausência de regulação por IL-10, pode levar ao agravamento do dano tecidual.

Legenda: NO: Óxido Nítrico; ROS: espécies reativas de oxigênio.

Em diversos estudos, a resposta imunológica do perfil Th17 tem apresentado papel especial contra a leishmaniose, devido à citocina IL-17 relacionar-se ao complexo de regulação ascendente e descendente de citocinas anti e pró-inflamatórias, assim como a produção da IL-17 interliga-se ao mecanismo genético do hospedeiro. O indivíduo infectado por *Leishmania* spp. estimula a produção de IL-17, contribuindo na ativação de macrófagos e recrutamento de neutrófilos para o local da ferida. A diferenciação de células Th17 é mediada pela ativação de células T *naives* numa combinação de TGF- β , IL-6, IL-1 β , e IL-23. TGF- β e IL-21 regulam a IL-23 e o receptor de IL-23, decisivo para a manutenção das células Th17. O estudo de Nascimento (2012), sugere que a IL-17 regula negativamente a produção de IL-10, contribuindo para o controle da infecção. Além de promover a modulação de IL-10, a IL-17 foi capaz de potencializar a produção de NO *in vitro* e *in vivo*. A IL-17 é uma importante citocina reguladora que controla a diferenciação de células Th17 e regula a produção de NO. Mas a influência de Th17 / IL-17 na LTA depende da espécie de *Leishmania*, o que já foi avaliado em pacientes infectados por *L. braziliensis*, verificando que a IL-17 não atua de forma direta na eliminação do parasito, pois depende diretamente da presença de IFN- γ (ANVERSA et al., 2018; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017; KHADER; GOPAL, 2010 KORN et al., 2009).

No entanto, a resistência ou susceptibilidade à doença nos seres humanos além de estarem interligados a resposta imune do hospedeiro, também relaciona-se a fatores como desnutrição, supressão imunitária (por exemplo, HIV) e componentes genéticos (ANVERSA et al., 2018).

2.6 Métodos de prevenção e controle para LTA

A LTA é considerada um grave problema de saúde pública, devido ao aumento no número de casos no decorrer dos anos. Devido a esta expansão faz-se necessário realizar o acompanhamento dos pacientes, no intuito de contribuir para uma rápida cura clínica e investigação dos focos endêmicos. Diante disso ações de saúde e vigilância podem auxiliar na conscientização da população e controle desta doença no país (BRASIL, 2017MIRANDA; ANDRADE, 2018).

Para evitar riscos de infecção, importante utilizar estratégias de interrupção da transmissão vetorial, impedindo a proliferação do vetor ou a picada através de barreiras físicas ou químicas (RIBEIRO et al., 2018), utilizando as principais medidas preventivas em ambientes individuais e coletivos, tais como: o uso de repelente e mosquiteiros de malha fina (uma vez que estes insetos medem de 2 a 5 mm) em ambientes de área endêmica; evitar exposição nos horários de atividade do inseto vetor (crepúsculo e noite); uso de telas de proteção, evitar o acúmulo de lixo em quintais e terrenos que beneficiem criadouros para formas imaturas do vetor; poda de árvores para diminuição do sombreamento do solo (temperatura e umidade) que propicie a criação de larvas do flebotomíneo; distância mínima de 400 a 500 metros entre as residências e a mata considerada endêmica (BRASIL, 2017). Para definir as estratégias e ações de controle é necessário considerar os aspectos epidemiológicos de cada área endêmica a ser trabalhada.

O controle da LTA deve ser abordado de forma abrangente, relacionando cinco principais aspectos: vigilância epidemiológica, medidas de atuação na cadeia de transmissão, medidas educativas, medidas administrativas e futuramente vacinais (BASANO; CAMARGO, 2004). Devido ao aumento da incidência de leishmanioses em todo o mundo, o desenvolvimento de novas estratégias, como vacinas profiláticas para prevenir a infecção e diminuir a doença, tornou-se uma prioridade (BRITO et al., 2018).

2.7 Terapia para LTA

O primeiro fármaco desenvolvido para o tratamento das leishmanioses foi o Tartarato Emético (tartarato duplo de antimônio e potássio - $C_4H_4O_7Sb$), descoberto por Gaspar Vianna, mas devido a sua toxicidade, foi substituído pelo antimonial pentavalente (Sb^{+5}) (VIANNA, 1912), o qual continua sendo utilizado como primeira escolha para tratamento da LTA atualmente (ALMEIDA; SANTOS, 2011; CARVALHO, 2012).

No mercado internacional, ocorre a fabricação de duas formulações de antimoniais pentavalentes disponíveis: o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, mas o último não é comercializado no Brasil. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), recomenda-se que a dose de antimoniato de meglumina seja calculada em miligramas de Sb^{+5} por quilograma de peso corporal por dia ($mg\ Sb^{+5}/kg/dia$), para padronizar o esquema terapêutico (BRASIL, 2017). Os mecanismos de ação do Sb^{+5} parecem atuar na forma amastigota da *Leishmania* inibindo a atividade enzimática do

metabolismo energético, levando à depleção de ATP intracelular, e a via oxidativa dos ácidos graxos (BENTO et al., 2013). Outros estudos indicam a apoptose de amastigotas, envolvendo fragmentação do DNA e externalização de fosfatidilserina (SERENO et al., 2001; SUDHANDIRAN; SHAHA, 2003). Sugere-se que Sb^V seja um pró-fármaco, o qual seria reduzido *in vivo* a Sb^{III} (fármaco mais ativo contra amastigotas axênicas), por um mecanismo que envolve tióis e/ou enzimas específicas (BENTO et al., 2013). Devido à escassez de opções terapêuticas eficazes e o uso dos medicamentos atuais causarem grande toxicidade, em 2013, a Organização Pan-Americana da Saúde (Opas) atualizou e adaptou as recomendações da OMS para a realidade do tratamento nas Américas. A recomendação da droga para os pacientes com a forma clínica LCL deve considerar a espécie da *Leishmania* infectante.

Em áreas onde há predomínio de *L. guyanensis* ocorre uma nova recomendação para o uso de Isiotionato de Pentamidina como fármaco de primeira escolha, devido a resistência ao tratamento com o antimoníato de meglumina por esta espécie. Dessa forma, o médico responsável deve diferenciar o tratamento a ser utilizado, considerando a situação epidemiológica da área endêmica e a espécie responsável pela forma clínica do paciente (detectada a partir de métodos como: *Multilocus Enzyme Electrophoresis*-MLEE, Anticorpos Monoclonais, *Restriction Fragment Length Polymorphism*-RFLP, Sequenciamento, qPCR) (BRASIL, 2017; BAPTISTA et al., 2009). Na prática, o médico desconhece a espécie causadora da infecção e utiliza como primeira escolha o antimoníato de meglumina. Espera-se observar uma resposta terapêutica favorável após até três aplicações, mas caso não ocorra progressão para uma cicatrização da lesão, até o terceiro mês do término do tratamento, o mesmo esquema terapêutico poderá ser reiniciado ou recomenda-se o uso do segundo fármaco de escolha, como o Pentamidina.

Miranda-Verástegui et al. (2005), afirmaram que o tratamento com antimônio pentavalente é de longo prazo (injeções diárias por até 3 semanas) e é altamente tóxico (desencadeando fadiga, cardiopatia e pancreatite). Além disso, a resistência ao antimônio pentavalente está aumentando em algumas regiões do mundo, onde LT é endêmica, sendo necessárias novas formas de tratamento (ALIREZA-FIROOZ et al., 2006; LIRA et al., 1999). A identificação da espécie de *Leishmania* é crucial para um melhor direcionamento da conduta terapêutica (CARVALHO, 2012), devido à heterogeneidade etiológica da LTA ter implicação direta com as apresentações clínicas e resistência ao tratamento pelos métodos convencionais disponíveis (BRASIL, 2017).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é outro medicamento existente para o tratamento da LT, de via de administração oral, mas o Ministério da Saúde do Brasil preconiza apenas medicamentos com via de administração sistêmica, com um potencial hepato, cardio e nefrotóxico, como o antimoniato de meglumina. No entanto, os efeitos adversos da Miltefosina geralmente acometem apenas o trato gastrointestinal, ocasionando em dor abdominal e diarreia, náuseas e vômitos, que não interferem na terapia. A maioria dos casos de LTA acomete áreas rurais e de difícil acesso, dificultando o acompanhamento dos pacientes e aplicação parenteral do medicamento (CONITEC, 2018). A miltefosina foi desenvolvida para tratamento de metástases cutâneas em carcinomas mamários, mas em estudos realizados na Índia, descobriu-se a eficácia terapêutica no tratamento das leishmanioses. A disponibilização de um medicamento de uso oral e efetivo contra a leishmaniose aumentaria a adesão ao tratamento nas áreas mais pobres e de difícil acesso do Brasil, tais como regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste que possuem maior número de casos (BRASIL, 2017; CONITEC, 2018;). Esta droga age na membrana celular do parasito, sem interagir com o DNA, interferindo na composição lipídica, permeabilidade e fluidez da membrana, assim como no metabolismo de fosfolípeos, para induzir a morte celular por apoptose (FILHO; LUCAS; SAMPAIO, 2008).

Em ensaios clínicos realizados no Brasil comparando a miltefosina com o antimoniato de meglumina para tratamento de *Leishmania braziliensis*, os resultados mostram-se distintos com taxas de cura após seis meses, sendo um total de 75% curados com o uso da miltefosina, e 53,3% para o grupo tratado com o antimoniato de meglumina (MACHADO et al., 2010). Na Colômbia, pacientes foram tratados com Miltefosina e antimoniato de meglumina, durante 28 dias (via oral) e 20 dias (injeção intramuscular), sendo a eficácia por protocolo de 69,8% e 58,6% para a miltefosina, e 85,1% e 72% para o antimoniato de meglumina (VÉLEZ et al., 2010). Na Bolívia a combinação de miltefosina com pentamidina curou 92% dos pacientes com LT (SOTO, 2018). No Irã, verificou-se que pacientes com LT que foram tratados com miltefosina ou antimoniato de meglumina, obtiveram cura clínica em 92,9% e 83,3%, respectivamente (MOHEBALI et al., 2007). Desta forma, verificou-se que a Miltefosina é mais eficaz do que medicamento de primeira escolha indicado no Brasil, podendo acelerar o tempo de cicatrização da lesão e prevenir o desenvolvimento de resistência, fornecendo uma dosagem diária mais baixa,

por ser um medicamento de uso oral, e provável diminuição dos efeitos colaterais (MACHADO et al., 2020).

Em outubro de 2018, o Ministério da Saúde incorporou a miltefosina como fármaco de primeira linha para o tratamento da LTA (humana) no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS, por meio da Portaria nº 56, de 30 de outubro de 2018. Diante disso, será feita a importação pelo Ministério da Saúde (ANVISA, 2020).

2.8 Novos candidatos terapêuticos

O desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, tendo conexão com as inovações científicas e tecnológicas. Os avanços expressivos dos estudos químicos e biológicos, acarretam na melhor compreensão de vias bioquímicas e farmacológicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças, possibilitando a descoberta de inovações terapêuticas notáveis, proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações no mundo (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; GUIDO et al., 2008; SANGI, 2016).

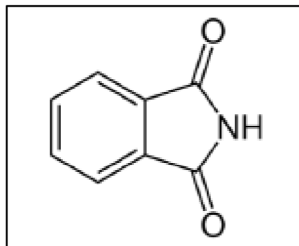
2.8.1 Compostos sintéticos

Os processos biotecnológicos associados aos métodos de Química Medicinal destacam-se no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010), além de verificar a diversidade estrutural química para síntese orientada de fármacos, através da triagem de diversos compostos candidatos a terapia (BITTERMAN, SPYCHER, GOSS, 2016; SANGI, 2016;). Com base nessas informações, destacam-se os derivados ftalimidas e os heterocíclicos 1,2,3-triazóis como substâncias químicas com ampla variedade de atividades biológicas, com um potencial leishmanicida e baixa toxicidade para as células do hospedeiro (HOLANDA, 2018).

As ftalimidas pertencem à família das iminas cíclicas, compostos heteroaromáticos que contêm o grupamento $-\text{CO}-\text{N}(\text{R})-\text{CO}-$, sendo R um átomo de hidrogênio, grupo alquila ou grupo arila, os quais podem ser subdivididos em maleimidas, succinimidas, glutarimidas, ftalimidas e naftalimidas (AL-RAZZAK; AL-AZZAWL, 2012; CECHINEL et al., 2003). Dentre as imidas cíclicas, verificou-se que os compostos contendo o grupamento ftalimídico vêm apresentando atividades anti-inflamatórias, anticonvulsivantes, analgésicas, antimalárico, hipolipídicas, imunomoduladoras e

leishmanicida (Figura 7) (ALIANÇA et al., 2017; GONZÁLEZ; CLARK; CONNELLY; RIVAS, 2014; LIMA et al., 2002; SHARMA; KUMAR; KUMAR; SINGH, 2010).

Figura 7. Estrutura Química da Ftalimida.



Fonte: SHARMA; KUMAR; KUMAR; SINGH, 2010.

O tiazol, um heterociclo único que contém átomos de enxofre e nitrogênio, ocupa um lugar importante na química medicinal, sendo parte essencial do núcleo da penicilina e alguns de seus derivados apresentam atividades antimicrobiana (sulfazol), antirretroviral (ritonavir), antifúngica (abafungina), anti-histamínica, anticâncer (tiazofurina), anti-helmínticos, anti-inflamatórias, anti-úlceras, leishmanicida e antitireoidiana (ALIANÇA et al., 2017; CHHABRIA; PATEL; MODI; BRAHMKSHATRIYA, 2016; MOHAREB; AL-OMRAN; ABDELAZIZ; IBRAHIM, 2017).

Além dos tiazóis, derivados triazólicos são importantes compostos orgânicos heterocíclicos de cinco membros, com três átomos de nitrogênio e dois átomos de carbono, e vêm apresentando resultados promissores, inclusive atividade leishmanicida (ALIANÇA et al., 2017; CHHABRIA; PATEL; MODI; BRAHMKSHATRIYA, 2016; RODRIGUES, 2015).

Existem estudos que provam a eficácia da combinação de compostos que possuem na sua estrutura química as classes ftalimida e tiazol, incluindo na inibição de tripanosomatídeos (ALIANÇA et al., 2017; GOMES et al., 2016), assim como compostos contendo os grupamentos ftalimídicos e triazólicos, sendo facilmente obtidos pelo método de *Click Chemistry* (HOLANDA, 2018), reforçando o incentivo a aplicação de novas drogas que contenham esses grupamentos na inibição de microrganismos patogênicos. O método de *Click Chemistry* caracteriza-se por apresentar reações rápidas, com altos rendimentos, subprodutos inofensivos, estereoespecífica e sem o uso de solventes ou que estes não sejam tóxicos (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001). Como

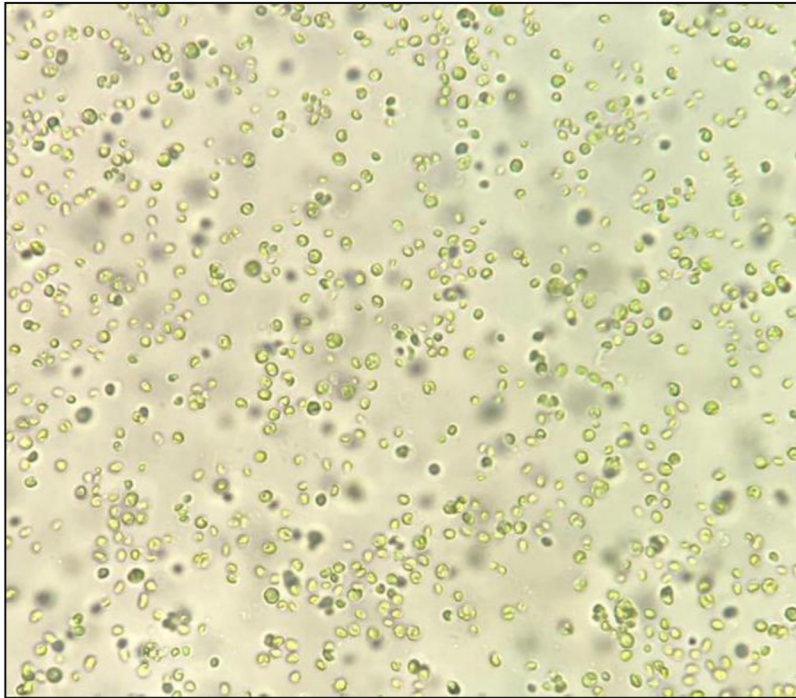
exemplo desse tipo de reação, caracteriza-se a formação do triazol pela cicloadição de um alcino com uma azida catalisada por Cu(I), reação também conhecida como CuAAC.

2.8.2 Compostos naturais

Os primeiros compostos com propriedades terapêuticas tiveram origem natural, obtidos principalmente de plantas e destinavam-se ao tratamento de doenças infecciosas. Os produtos naturais e suas estruturas moleculares têm relevância por constituírem diversos pontos de partida para a Química Medicinal e a descoberta de medicamentos, sendo empregados em indústrias farmacêuticas e biotecnológicas (HARVEY, 2008; PATRIDGE et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016). Sabe-se que novos agentes anti-inflamatórios de fontes naturais apresentam menos efeitos adversos, tornando-se alternativas para um desenvolvimento a longo prazo de administração (EL GAMAL, 2010; SIBI; RABINA, 2016).

Devido à sobrevivência das algas em ambiente competitivo, estas puderam desenvolver estratégias de defesa. As microalgas apresentam diversas vantagens no cultivo, como a alta taxa de crescimento, facilidade de cultivo e baixos custos para o crescimento. A composição química das microalgas depende da espécie e das condições, como temperatura, iluminação, pH, CO₂, sal e nutrientes. Dentre os produtos naturais, podemos destacar os microrganismos fotossintetizantes, como a *Chlorella vulgaris* (Figura 8), ainda pouco explorados, mas com estudos que relatam uma atividade anti-inflamatória (EL GAMAL, 2010). Microrganismos fotossintetizantes, como cianobactérias procarióticas e microalgas eucarióticas, são fontes de substâncias bioativas mas ainda são pouco descritas, tais como, esteróis, ácidos graxos poliinsaturados, polissacarídeos, enzimas, peptídeos, lipídios, carboidratos, antibióticos, antioxidantes e proteínas. No entanto, a composição da biomassa depende da espécie e das condições de cultivo (CHEN; JIANG, 2017; CHISTI, 2007; GÓMEZ-ZORITA et al., 2019; MIMOUNI et al., 2012; POTVIN; ZHANG, 2010; TORRES et al., 2014; VEAS et al., 2020; WANG et al., 2014). Existem poucos relatos de novos metabolitos secundários entre as clorofitas, mas devido a facilidade na cultura, propagação e sensibilidade tornaram-se excelentes modelos para avaliação da toxicidade (DEHGHANPOUR et al., 2020).

Figura 8. Células da microalga *C. vulgaris* observadas em microscópio óptico (40x).



Fonte: A autora.

Estudos indicam que as algas marinhas são uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos compostos bioquimicamente ativos, especialmente com atividades antiprotozoárias (leishmanicida e tripanocida), anti-inflamatórias, analgésicas, imunomoduladoras, antioxidante, antitumorais, microbicida, anti-obesidade, antivirais e antiparasitárias, além de contribuir na diminuição de triacilglicerídeos (presentes no fígado e soro) (BLUNT et al., 2013; CARDOZO et al., 2007; GÓMEZ-ZORITA et al., 2019; MAYER et al., 2013; NEWMAN; CRAGG, 2004; SOUSA et al., 2017; STEIN et al., 2011; TEMPONE; MARTINS-DE-OLIVEIRA; BERLINK, 2011; TIWARI et al., 2019; TORRES et al., 2014; VEAS et al., 2020).

As microalgas, juntamente com as cianobactérias (Cyanophyceae), fornecem energia para todos os níveis tróficos acima delas. As principais microalgas classificam-se em: clorofíceas (Chlorophyceae), diatomáceas (Bacillariophyceae), dinoflagelados (Dinophyceae) e euglenofíceas (Euglenophyceae). No entanto, apesar da grande biodiversidade destes organismos fotossintetizantes, as mais estudadas são *Chlorella*, *Spirulina*, *Haematococcus*, *Dunaliella* e *Scenedesmus* (GÓMEZ-ZORITA et al., 2019; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

2.8.2.1 *Chlorella vulgaris*

A *C. vulgaris* é uma microalga verde unicelular, de forma esférica e o diâmetro micrométrico (Figura 6), com propriedades biológicas e farmacológicas importantes para a saúde humana, pois contém cerca de 55-67% de proteína, 1-4% de clorofila, 9-18% de fibra dietética, dentre outros diversos macro e micronutrientes funcionais utilizados como suplemento alimentício, incluindo proteínas, ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, polissacarídeos, vitaminas e minerais. Verificou-se que a suplementação com *C. vulgaris* pode melhorar a hiperlipidemia e a hiperglicemia, além de proteger o organismo contra o estresse oxidativo, câncer e doença pulmonar obstrutiva crônica (PANAHI et al., 2015).

Na avaliação de extratos da *C. vulgaris* verificou-se sua atividade como antioxidantes naturais, suplementos alimentares ou aditivos, rações, antibacterianos, antifúngicos, cicatrizantes e imunoestimuladores (GUZMAN et al., 2003; FRADIQUE et al., 2010; PANAHI et al., 2016; SAFI et al., 2014; SHIM et al., 2018; ZIELINSKI et al., 2020). Diferentes estudos verificaram efeitos hepato-protetores, imunomoduladores, anti-hipertensivos, anti-aterogênicos, anti-hiperglicêmicos, anti-hiperlipidêmicos, antiinflamatórios, anti-hiperglicêmicos, antioxidantes, anti-tumorais, anti-bacterianos e anti-virais de *Chlorella* (PANAHI et al., 2016). Assim, ensaios que avaliem a segurança e eficácia desta microalga para tratamentos antiparasitários estão se tornando ainda mais cruciais.

2.8.3 Medicamento disponível no mercado

2.8.3.1 *Imiquimod*

O derivado de imidazoquinolineamina 1- (2-metil propil) -1H-imidazol [4,5-c] quinolina-4-amina (Imiquimod) é utilizado para o tratamento de verrugas genitais, de uso tópico, relacionadas a infecções sexualmente transmissíveis, sendo um potente estimulador de citocinas, particularmente interferons (HENGGE et al., 2000; MOORE et al., 2001). Este medicamento é um eficaz imunomodulador, devido à estimulação de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a produção de TNF, IFN- γ e IL12, que regulam positivamente a resposta imune celular, podendo apresentar uma atividade leishmanicida por estimular o macrófago (derivados da medula óssea de camundongos BALB/c fêmeas) a produzir óxido nítrico (BUATES; KAPSENBERG, 2003; MATLASHEWSKI, 1999; SKINNER, 2003). Além disso, induz a síntese de interferon alfa (IFN- α) tanto *in vivo*

quanto *in vitro* nas células mononucleares do sangue periférico, podendo gerar a expressão de vários genes do IFNA (ativação transcricional de interferon A - *transcriptional activation of interferon A*) (IFNA1, IFNA2, IFNA5, IFNA6 e IFNA8), bem como do gene IFNB, e genes da IL -6, IL-8 e do TNF (MEGYERI et al., 1995). Segundo dados do estudo de Gibson et al. (1995), o imiquimod não estimula apenas os monócitos do sangue periférico, mas também a produção de IFN- α , IL-12 e TNF por macrófagos e células dendríticas. A IL-12 vai estimular as células auxiliares da resposta celular Th1, diretamente envolvidas com imunidade celular.

O imiquimod inibe a produção de IL-4 e IL-5, parcialmente mediada por IFN- α , sendo fatores associados a resposta Th2 (WAGNER et al., 1999), responsável pela suscetibilidade à infecção na LTA. Assim, o Imiquimod parece potencializar as respostas das citocinas pró-inflamatórias enquanto suprime simultaneamente a liberação de citocinas anti-inflamatórias e/ou regulatórias (PARRONCHI et al., 1992; PARRONCHI et al., 1996). O uso tópico do Imiquimod em conjunto com o Sb+5 promoveu cura clínica de pacientes com LT em 50%, 61% e 72% dos indivíduos tratados durante um, dois e três meses, respectivamente. Estes resultados foram superiores quando comparados ao Sb+5 utilizado isoladamente, mas apenas 15%, 25% e 35% obtiveram cura clínica, nos respectivos meses e foram relatados efeitos adversos como edema, prurido, queimadura, eritema e dor (MIRANDA-VERÁSTEGUI et al., 2005). O uso tópico do Imiquimod ativa as funções imunológicas locais (ALIREZA-FIROOZ et al., 2006). Arevalo e colaboradores (2007) relataram que a terapia combinada do antimoniato de meglumina com o imiquimod foi mais eficaz, devido a cura clínica (cicatrização da lesão) mais rápida. O estudo de Emani et al. (2018) utilizou o imiquimod como ligantes de TLR adjuvantes, para aumentar a imunogenicidade e a taxa de proteção contra a leishmaniose, após indução da via de imunidade celular.

3 JUSTIFICATIVA

Em estudo anterior, pacientes com LTA procedentes de áreas endêmicas do Amazonas (AM) e Pernambuco (PE), foram acompanhados e ensaios de qPCR para quantificação da carga parasitária foram realizados durante o protocolo terapêutico estabelecido pelo médico infectologista. Um total de 95,24% dos pacientes foram tratados com o medicamento convencional (Glucantime®), e constatou-se que apenas metade dos pacientes tratados, apresentaram cura clínica (cicatrização da lesão) e mesmo naqueles com remissão dos sintomas, pode-se observar permanência e até o aumento da carga parasitária após a terapia. Nos pacientes em que não houve a cura clínica, ou seja, permanência da lesão, diferentes cenários foram observados, tal como a cura parasitológica, demonstrando a necessidade de modulação da resposta imune (MORAIS et al., 2020). Sabe-se que o tratamento da LTA é uma importante medida de controle, mas devido a problemas como alta toxicidade e inúmeros efeitos colaterais, torna-se relevante investir em novas alternativas terapêuticas que contribuam na modulação dos perfis pró e anti-inflamatórios.

A indução da cura pela resposta imune é realizada pela ativação de células capazes de produzir citocinas protetoras, que ativam macrófagos via IFN- γ , resultando na síntese de NO, ocasionando a morte dos parasitos intracelulares. Apesar da resposta Th1 ser benéfica, o controle da resposta inflamatória através da produção de IL-10 pelo perfil Th2 bloqueia a ativação das células Th1, contribuindo para um equilíbrio entre os perfis e resultando na cura clínica (REIS, 2007; SOUZA-LEMOS et al., 2011).

Os dados obtidos demonstram que, em relação à LTA, um medicamento ideal teria que apresentar uma ação anti-inflamatória, propriedade não encontrada no antimoniato de meglumina. Tal efeito auxiliaria na modulação da resposta Th1, através da redução de TNF, contribuindo na redução do processo inflamatório e favorecendo a cura clínica. Através dos avanços dos estudos químicos e farmacológicos, têm-se obtido resultados de novas drogas, como os derivados ftalimidas e os heterocíclicos 1,2,3-triazóis, para os tratamentos de doenças infecciosas, que apresentam ampla variedade de atividades biológicas investigadas, incluindo atividade leishmanicida e possível atividade anti-inflamatória (BROCKSOM et al., 2015; SANGI, 2016; SOUZA, 2014). No entanto, bioativos obtidos a partir de microrganismos fotossintetizantes, como os extratos e/ou purificados proteicos oriundos das microalgas poderiam atuar na inibição do crescimento de *Leishmania* sp. e imunomodulação da resposta imune, sem induzir importantes efeitos

citotóxicos em células do hospedeiro. Neste contexto, a microalga *Chlorella vulgaris*, surge como um importante fornecedor de bioativos, sem toxicidade, candidata a novas terapias contra a LTA, o que torna este estudo inédito.

A inclusão de medicamentos já disponíveis no mercado, de forma aditiva à terapia atualmente usada, contribuirá para a otimização do esquema terapêutico, como a redução da duração do tratamento, dose administrada, além de imunomodulação. O Imiquimod, família dos imidazoquinolonas, é uma medicação aprovada para o tratamento de infecções virais e tem sido avaliado quanto sua atividade imunomoduladora nas leishmanioses (BUATES; MATLASHEWSKI, 2001; MEHRAVARAN et al., 2019).

Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro*, por cultivo de células humanas, novos compostos derivados ftalimídicos-triazólicos, medicações existentes e extrato bruto da microalga *Chlorella vulgaris* em relação ao seu potencial imunomodulador, à serem aplicados de forma aditiva ou substituta ao tratamento das leishmanioses, visando a promoção de melhorias na conduta terapêutica da população afetada.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Compostos sintéticos ftalimídicos-triazólicos, imiquimod e extrato bruto da microalga *Chlorella vulgaris* possuem atividade imunomodulatória em células de indivíduos saudáveis?

5 HIPÓTESE

Compostos sintéticos ftalimídicos-triazólicos, imiquimod e extrato bruto da microalga *Chlorella vulgaris* possuem atividade imunomodulatória em células de indivíduos saudáveis.

6 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial imunomodulador, leishmanicida/ leishmaniostática de novas estratégias terapêuticas para LTA.

6.1 Objetivos específicos

- a) Determinar a concentração mais adequada e índice de seletividade dos novos compostos/medicamentos e extrato bruto da microalga (*Chlorella vulgaris*), para o estímulo *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis;
- b) Avaliar a expressão dos principais genes reguladores relacionados aos perfis Th1, Th2, Treg e Th17 em células humanas saudáveis, após o estímulo *in vitro* com o antígeno solúvel de *Leishmania braziliensis*, novos compostos/ medicamentos e extrato bruto da microalga (*Chlorella vulgaris*);
- c) Avaliar a produção de citocinas relacionadas aos perfis Th1, Th2, Treg em células humanas saudáveis, após o estímulo *in vitro* com o antígeno solúvel de *Leishmania braziliensis*, novos compostos/ medicamentos e extrato bruto da microalga (*Chlorella vulgaris*);
- d) Avaliar a produção de NO das culturas (sobrenadante) em células humanas saudáveis, frente aos novos compostos/medicamentos e extrato bruto da microalga (*Chlorella vulgaris*);
- e) Correlacionar as respostas obtidas pelos novos compostos/ medicamentos e extrato bruto da microalga (*Chlorella vulgaris*).

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Tipo de estudo

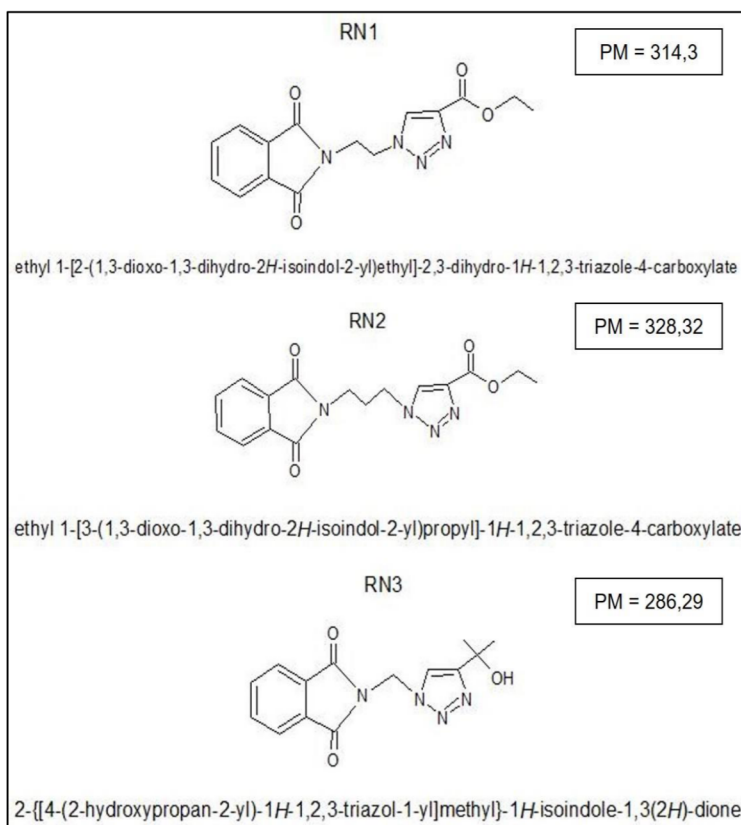
Trata-se de um estudo experimental (*in vitro*) para desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da LTA.

7.2 Obtenção dos compostos sintéticos e extrato da microalga (*Chlorella vulgaris*)

7.2.1 Descrição e obtenção dos compostos sintéticos

Os novos compostos derivados ftalimídicos-triazólicos, nomeados de RN1, RN2 e RN3, foram sintetizados a partir da técnica de *Click Chemistry*, e cedidos por pesquisadores parceiros, incluindo a equipe da Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, Departamento de Bioquímica da UFPE, do Dr. Ronaldo Nascimento de Oliveira, UFRPE e da Dra. Regina Bressan, IAM/FIOCRUZ, para serem avaliados quanto ao mecanismo de ação e toxicidade pelas respectivas equipes. As estruturas químicas estão representadas na Figura 9.

Figura 9. Estrutura química dos novos compostos derivados ftalimídicos-triazólicos: RN1, RN2 e RN3.



Fonte: A autora.

Legenda: PM = Peso Molecular.

7.2.2 Cultivo e extração da microalga *Chlorella vulgaris*

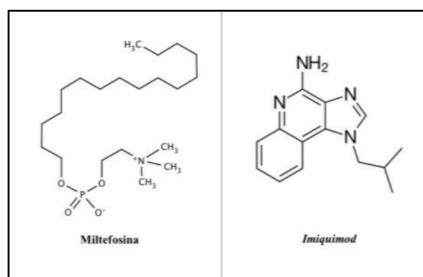
A microalga *Chlorella vulgaris* (Utex 1803) foi selecionada a partir da coleção de cultura da Universidade do Texas (Utex, 2010). O cultivo desta microalga foi realizado em meio Bold's basal Stein (Ed.), com 1% de milhocina (SILVA et al., 2018), com uma concentração celular inicial de 50 mg/mL, temperatura de 28 ± 2 °C e iluminância de 72 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob aeração constante até atingir a fase exponencial de crescimento celular. A concentração celular foi determinada por turbidimetria, utilizando uma curva de calibração em função da biomassa seca, no comprimento de onda (λ) 680 nm (COSTA et al., 2002).

A biomassa foi liofilizada e ressuspendida em tampão Tris HCl 0,1M (pH 7,4) e então as células foram lisadas pelo método de sonicação (20 pulsos de 60 segundos, com intervalos de 60 segundos), logo após foram centrifugadas para obtenção do sobrenadante denominado de extrato bruto. As proteínas no extrato bruto foram quantificadas antes da filtração, pelo método do ácido bicinonínico utilizando o kit BCA (BCATM Protein Assay Kit, Thermo-Scientific) e submetidos a filtração em membrana de 0,22 μM , para posterior avaliação da atividade biológica.

7.2.3 Drogas de referência e Imiquimod

Foram utilizadas duas drogas de referência: Glucantime® (Antimoniato de meglumina - Sanofi-Aventis Farmac\u00eautica Ltda.) (Peso Molecular = 365,98 g/mol) e MilteforanTM (Miltefosina - Virbac do Brasil Ind\u00fastria e Com\u00e9rcio Ltda.) (Peso Molecular = 407,568 g/mol) (Figura 10). O antimoniato de meglumina foi adquirido por meio da parceria estabelecida com o Hospital das Cl\u00ednicas - UFPE. A miltefosina e o Imiquimod (Peso Molecular = 240,3g/mol) foram submetidos \u00e0 s\u00edntese de seu princ\u00edpio ativo por empresa especializada.

Figura 10. Estrutura qu\u00edmica da Miltefosina e do Imiquimod.



Fonte: Nogueira et al. (2011); Enosi-Tuipulotu et al. (2018).

7.3 Cultivo e obtenção das frações antigênicas de *L. (V.) braziliensis*

Formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (cepa MHOM/BR/1975/M2903) foram expandidas em cultura em meio Schneider's (Sigma-Aldrich) de pH 7,2, e/ou meio RPMI 1640, ambos meios contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina 200U/mL). Para obtenção da fase de crescimento exponencial, foram realizados repiques entre o terceiro e quinto dia de cultivo, e incubados em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD), para verificar o efeito leishmanicida/leishmaniostático, com uma concentração de 3×10^6 células/mL (PORCINO et al., 2019).

Para a obtenção das frações antigênicas, a massa parasitária foi submetida a três lavagens com salina tamponada (PBS – pH 7,2) através de centrifugações a 1000 x g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi removido e armazenado a -20°C. O *pellet* (sedimento) resultante foi ressuspenso em um tampão de lise (50mM Tris/ 5mM EDTA/HCl, pH7) ou PBS, sendo utilizado 1mL de PBS para cada 1×10^9 parasitos. Em seguida, foi acrescentado o inibidor de proteases (10mg/mL) para cada 1mL da solução. Posteriormente as células foram submetidas a congelamentos rápidos, em temperatura de -196°C (Nitrogênio Líquido) seguido de descongelamento 40°C (Banho-Maria). Em seguida, a suspensão celular foi submetida ao processo de ultrassonicação (60 segundos/ 40W), por três vezes, sendo centrifugada a 10.000 x g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante é a fração antigênica solúvel (*L. braziliensis soluble antigen*: ASLb), enquanto o sedimento é a fração antigênica insolúvel. Apenas o ASLb foi submetido a uma dosagem proteica, segundo o método de Bradford (1976). Após esses procedimentos, as frações antigênicas foram armazenadas a -20°C. O ASLb foi utilizado nos ensaios de cultura celular.

7.4 Coleta de material biológico

A coleta do material biológico foi realizada em voluntários saudáveis que aceitaram participar da pesquisa. Após antisepsia com algodão embebido em álcool etílico 70% foram coletados com auxílio de agulhas 25x7 mm, 4 mL de sangue total, acondicionados em um tubo de coleta a vácuo (4 mL), com anticoagulante EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) (Vacutainer®) (para o diagnóstico por qPCR da LV e LT, como descrito no item 7.5), para posterior extração do DNA. Para a avaliação da

resposta imune e realização das culturas de células, foram coletados 20 mL de sangue, divididos em 2 tubos Vacutainer® com heparina (2 x 10 mL).

7.5 Diagnóstico para as leishmanioses

Exame molecular - qPCR para LV e LT: para extração de DNA das amostras de sangue foi utilizado o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi mantido em freezer a -20°C para posterior análise molecular (PCR convencional-PCRc e qPCR). Como controle endógeno das amostras, foi realizada PCRc utilizando o alvo G3PD, conforme desenvolvido por Gonçalves et al. (2012). A amplificação do produto foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com *Sybr safe*.

Para a detecção de *L. (L.) infantum*, foi utilizado o sistema LINf 1B (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009), o diagnóstico para LT foi realizado pelo sistema kDNA1, de acordo com Paiva-Cavalcanti et al. (2013).

7.6 Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) e cultivo celular

Ao sangue heparinizado foi adicionado a salina tamponada (PBS - pH 7,2) na proporção de 1:2. Esta mistura foi adicionada ao *Ficoll-hypaque* (proporção de 1:3), para obtenção do anel de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) após centrifugação a 900 x g por 30 minutos sem freio (a 25°C). As células foram lavadas por centrifugação (400 x g por 10 minutos a 25°C) duas vezes em PBS estéril (pH=7,2) (1:2), e o *pellet* contendo as células mononucleares foi ressuspenso em 1mL de meio RPMI 1640 suplementado com SBF a 10% e 1% de penicilina/estreptomicina (200 U/mL), e posteriormente foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante de viabilidade Azul de *Trypan*. O valor obtido de células foi ajustado para a concentração de 1×10^6 células/mL através da adição de meio RPMI 1640 suplementado com SBF a 10%, para a utilização nos ensaios imunológicos.

7.7 Definição das moléculas avaliadas

7.7.1 Determinação do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) foi calculado através da razão entre a concentração citotóxica 50% (CC₅₀) e a concentração inibitória de 50% (IC₅₀ – *inhibitory*

concentration). A determinação da CC_{50} foi realizada a partir de experimentos realizados com células humanas, por sua vez a IC_{50} foi determinada em células promastigotas de *Leishmania braziliensis*. Todas as células foram tratadas com os compostos ftalimídicos-triazólicos, extrato bioativo da *Chlorella vulgaris*, drogas de referência ou Imiquimod. Foram adotados parâmetros para determinar se os compostos sintéticos e o extrato natural eram promissores para seguirem com as análises: 1) apresentar baixa toxicidade para as células dos hospedeiros e alta toxicidade para o parasito; 2) apresentar desempenho melhor quando comparado com as drogas de referência, sendo ideal aqueles que apresentassem IS superior a 10 (SHARIFI et al., 2018; WENIGER et al., 2001).

7.7.2 Viabilidade celular

Para a realização dos ensaios de avaliação da CC_{50} , as PBMCs de humanos saudáveis foram cultivadas numa concentração de 1×10^6 células/mL, em placas de 96 poços, contendo um volume final de 200 μ L. O extrato de *C. vulgaris*, Imiquimod e as drogas de referência foram diluídos em meio RPMI 1640, nas seguintes concentrações: 1000, 500, 250, 125 e 62,5 μ g/mL, para realizar os tratamentos (CORREIA et al., 2016; SHEELA-DEVI; JOSEPH; BHUVANESHWARI, 2018). Já para os compostos sintéticos, foram diluídos em meio RPMI 1640, e testados nas seguintes concentrações: 400, 200, 100, 50 e 25 μ g/mL (ALIANÇA et al., 2014; HOLANDA, 2018).

O tratamento das células foi realizado em triplicata para cada estímulo, com incubação de 24 horas (FENG; LIU; GAO; GENG; DAI, 2019). Após o tempo de cultivo, foi realizada uma centrifugação a 2500 x g durante 5 minutos, sendo descartado o sobrenadante e adicionado o MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) na concentração de 1 mg/mL, solubilizado em meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol, deixando incubar em estufa de CO_2 a 37°C durante 3 horas. O MTT passou por um processo de redução de sais de tetrazólio pela enzima Desidrogenase, formando cristais de Formazan nas células viáveis, estes cristais foram solubilizados com DMSO (Dimetilsulfóxido) e posteriormente a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540nm (MOSMANN, 1983).

7.7.3 Efeito leishmanicida/ leishmanioestático

A IC_{50} foi obtida a partir dos ensaios em cultura de *Leishmania braziliensis*, com uma concentração de 3×10^6 células/mL (PORCINO et al., 2019), em placas de 96 poços,

tratados com compostos sintéticos nas seguintes concentrações: 100, 50, 25, 12,5 e 6,25µg/mL (ALIANÇA, 2017). Para o extrato de *C. vulgaris*, utilizou-se as seguintes concentrações proteicas: 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,63 µg/mL (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI et al., 2017). Para o antimoniato de meglumina e a miltefosina, a curva de concentração foi de 250µg/mL a 15,63µg/mL, e 4µg/mL a 0,1µg/mL, respectivamente (MORAIS-TEIXEIRA et al., 2008; 2011). Após o tempo de cultivo, as células foram contadas e avaliadas quanto a sua morfologia/ motilidade por microscopia óptica.

Apenas para os compostos derivados ftalimídicos-triazólicos, o valor da IC₅₀ foi fornecido pelos pesquisadores parceiros. Para o Imiquimod, foi utilizado o valor da metade da concentração efetiva máxima (EC₅₀= 1,5µM), conforme descrito por Tuipulotu et al. (2018).

7.8 Análise da resposta imune

Foi adotada uma amostragem de conveniência (REIS, 2003), sendo coletado o sangue de cinco voluntários saudáveis, sem sinais clínicos, que não receberam transfusão sanguínea e que foram negativos nos testes moleculares realizados para as leishmanioses.

As PBMC foram cultivadas e depositadas em placas de 48 poços de poliestireno (1x10⁶ células/poço) contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF e foram estimuladas com o mitógeno Fitohemaglutinina (*phytohemagglutinin* – PHA 5µg/mL) (controle positivo do cultivo), com o ASLb (5 µg/mL), com o antimoniato de meglumina (Glucantime®- Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda.) e a Miltefosina (MilteforanTM - Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda.), ambos na concentração do valor da IC₅₀; com o extrato bruto da microalga *Chlorella vulgaris* (nas concentrações dos valores de ¼ da CC₅₀, IC₅₀, ½ da IC₅₀); o novo composto selecionado (nas concentrações dos valores da CC₅₀; ½ da CC₅₀; ¼ da CC₅₀ e IC₅₀), e o Imiquimod nas concentrações dos valores de 2x EC₅₀, EC₅₀, ½ da EC₅₀, ¼ da EC₅₀, com base no estudo de Tuipulotu e colaboradores (2018). Poços contendo células sem estímulo serviram como o controle negativo, permanecendo em estufa de CO₂ (5%) a 37°C durante tempo de cultivo pré-estabelecido (48h) (PESSOA-E-SILVA et al., 2021).

7.8.1 Expressão gênica

Foi realizada a avaliação da expressão relativa de RNA mensageiro (mRNA) dos principais genes reguladores relacionados aos perfis de resistência e susceptibilidade, a

partir de PBMC dos indivíduos pertencentes aos grupos de estudo, após os estímulos com PHA (5µg/mL), com o extrato bruto da microalga (*Chlorella vulgaris*), com o derivado ftalimídico-triazólico, com o ASLb (5 µg/mL), com o antimoniato de meglumina (AM), miltefosina (M), Imiquimod (I) e sem estímulo (controle negativo).

7.8.1.1 Extração de RNA - TRIzol® e transcrição reversa para cDNA

Após o tempo de cultivo com os estímulos, foi realizada uma centrifugação de 1.800 xg por 10 minutos, para remoção dos sobrenadantes. Em seguida, adicionou-se 1 mL de PBS para remoção da suspensão celular, a qual foi centrifugada a 300 xg por 5 minutos a 4°C. O *pellet* resultante foi ressuscitado em 750µL de TRIzol®(Invitrogen) e estocado a -80°C.

Após descongelar as amostras estocadas, adicionou-se 200µL de clorofórmio incubando por 15 minutos à temperatura ambiente, e em seguida foram centrifugadas a 10.840 xg à 4°C por 15 minutos. A fase aquosa resultante foi transferida para novo tubo e feita a adição de Álcool Isopropílico (Isopropanol), na mesma quantidade, incubando por 10 minutos à -20°C, e posteriormente realizando uma nova centrifugação. Em seguida, foi removido o sobrenadante, adicionando 1mL de Etanol a 75%, centrifugando a 3670 xg à 4°C por 5 minutos. Posteriormente, foi descartado o sobrenadante, deixando o tubo secar totalmente, e ao final foi ressuscitado o RNA em 30µL de água contendo Diethylpyrocarbonate (DEPC) na concentração de 0,2%, realizando a dosagem da concentração de mRNA em espectrofotômetro e armazenando a -80°C.

O mRNA obtido foi transformado por transcrição reversa para DNA complementar (cDNA), utilizando o kit *TaqMan Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante, o qual contém a enzima *Multiscribe reverse transcriptase* (50U/µL), inibidor de RNase (20 U/µL), mix de dNTPs (10mM), *primers* randômicos (50µM), tampão de reação (10X RT Buffer) e solução de cloreto de magnésio (MgCl₂ – 25mM). As condições de ciclagem utilizadas seguiram as instruções do fabricante (25°C por 10 minutos; 37°C por 30 minutos; 95°C por 5 minutos; 4°C até retirar). Após dosagem da concentração das amostras em espectrofotômetro, foi realizada a RT-PCR.

Os níveis de mRNA foram quantificados a partir do cDNA, por PCR em tempo real (Sistema *TaqMan*®) através do sistema de detecção de sequências *QuantStudio 5 Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific) e usando o kit *TaqMan*® *Gene*

Expression PCR Master Mix (Applied Biosystems) para os genes reguladores principais T-bet/Tbx21 (ID: Hs00894392_m1), GATA3 (ID: Hs00231122_m1), RORc (ID: Hs01076112_m1) e FOXP3 (ID: Hs01085834_m1), como também o NOS2 (Hs01075529_m1). Como controle endógeno da reação foi utilizado o *Human GAPDH* (ID: Hs02786624_g1).

A expressão relativa (*Relative quantification* - RQ) do mRNA foi calculada após normalização das amostras com o controle endógeno pelo método do *Ct* (*Cycle threshold*) comparativo ($\Delta\Delta Ct$), o qual consiste na subtração do ΔCt (variação entre a média do *Ct* do gene de interesse pelo *Ct* do controle endógeno) do estímulo pelo ΔCt do calibrador, a ser definido de acordo com a análise a ser realizada. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e expressas com a média \pm desvio-padrão.

7.8.2 Dosagem para citocinas do perfil Th1/Th2 nos sobrenadantes de cultura

A dosagem de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) nos sobrenadantes de cultura de PBMC foi realizada utilizando o kit *BD™ Human Th1/Th2 Cytokine Cytometric Bead Array (CBA) Kit II* (Becton Dickinson). Inicialmente, preparou-se uma curva padrão com diluições seriadas entre 1:2 (2,500 pg/mL) e 1:256 (20pg/mL). O mix de *beads* de captura foi preparado e adicionado nos tubos de ensaio, para posteriormente adicionar as alíquotas dos sobrenadantes de cultura das amostras, e o reagente de detecção em todos os tubos, sendo incubado durante três horas a temperatura ambiente, protegido de luz.

Após a incubação, adicionou-se 500 μ L do tampão de lavagem, em cada tubo de ensaio, para centrifugar por 200g por 5 minutos. Em seguida, foi descartado o sobrenadante, cuidadosamente, e por fim ressuspendeu-se o *pellet* de *beads* em 250 μ L de tampão de lavagem. A aquisição de 1800 eventos foi realizada no citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson), presente no Núcleo de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ-PE, conforme as instruções do fabricante. Os resultados foram analisados utilizando o *software* FCAP Array 3.0 (Becton Dickinson), e expressos pela subtração obtida entre as culturas com tratamento e o controle negativo (células sem estímulo).

7.8.3 Avaliação da produção de Óxido Nítrico

A quantificação dos níveis de NO foi realizada indiretamente pela medição do nitrito nos sobrenadantes das culturas de PBMC, após os estímulos (PHA; ASLb;

composto ftalimídico-triazólico; Antimoniato de meglumina; Miltefosina; extrato bruto de *C. vulgaris*), pela reação de Griess, de acordo com Resende et al. (2013), sendo posteriormente comparados com o controle negativo (PBMC sem estímulo).

7.9 Análise dos dados

Para o valor da IC₅₀ e CC₅₀ foram realizados cálculos de sobrevivência (média do estímulo/ média do controle multiplicado por 100) e inibição (100 subtraído pelo valor da sobrevivência) no Microsoft Excel, e a partir dos valores de inibição foi realizado uma análise de Regressão por Probit, através do *software* IBM SPSS Statistic 25 8.0 para Windows, no qual obteve-se a concentração que inibiu de 50% da população celular, tanto células dos hospedeiros humanos como as células de *L. braziliensis*.

Foram realizados também análises comparativas por técnicas de estatística descritiva por meio de distribuições absolutas e percentuais. Foi empregado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, e de acordo com a análise, foi realizado o teste T de Student (paramétrico) ou teste de Mann-Whitney (não-paramétrico), para comparações entre duas categorias; ou testes de análise de variância por ANOVA (One-way ou Kruskal-Wallis), com um pós-teste de comparações múltiplas de Tukey (paramétrico) ou Dunns (não-paramétrico), para comparação entre mais de duas categorias.

As análises comparativas dos estímulos foram realizadas de acordo com os resultados obtidos. Foram utilizadas técnicas de estatística descritiva por meio de distribuições absolutas e percentuais. As análises de correlação também foram realizadas através do teste de Spearman (amostras não normais) e o teste de Pearson (amostras normais) (MUKAKA, 2012). Todos os testes foram realizados com o auxílio do programa GraphPad Prism 5 (Graphpad *Software* Inc. 2007, San Diego, CA, USA), sendo considerados resultados significativos quando $p \leq 0,05$.

8 ASPECTOS ÉTICOS

Para captação dos indivíduos inclusos no estudo foi realizado o convite para participação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A ao C), autorizando a utilização do material biológico coletado para fins científicos. Este estudo está inserido no projeto “Imunologia aplicada ao desenvolvimento de novas estratégias de controle para as leishmanioses.” que possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-IAM): Parecer 4.077.060 (FIOCRUZ/PE) (ANEXO A).

9 RESULTADOS

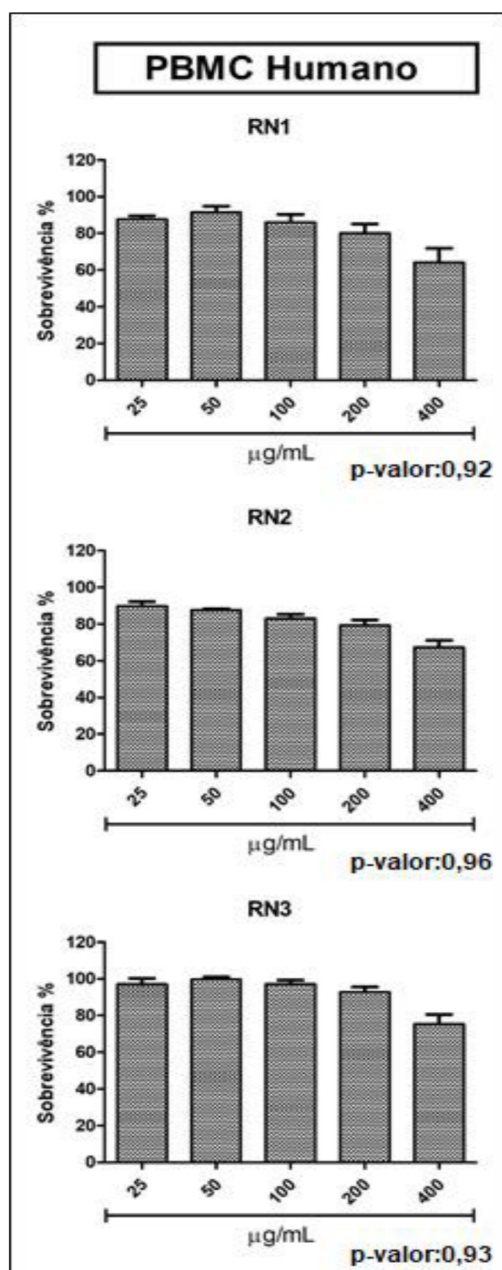
9.1 Determinação do Índice de Seletividade (IS)

9.1.1 Compostos sintéticos ftalimídicos-triazólicos

Foram obtidos 50 mg dos compostos ftalimídicos-triazólicos RN1, RN2 e RN3 na forma liofilizada, sendo posteriormente solubilizados em DMSO. Diante da saturação dos compostos sintéticos em altas concentrações, não foi possível realizar a análise em concentração superior a 400µg/mL.

Dentre as concentrações avaliadas em células humanas, foi possível determinar a CC_{50} , não havendo uma diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$). Sendo possível observar baixa viabilidade celular equivalente a diminuição do valor da concentração (Figura 11). Os valores de IC_{50} , CC_{50} e do IS dos compostos estão apresentados na Tabela 2.

Figura 11. Taxa de sobrevivência das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano tratadas com os compostos RN1, RN2 e RN3 em diferentes concentrações.



Fonte: A autora.

Legenda: PBMC: células mononucleares do sangue periférico. Cada coluna corresponde a média da taxa de sobrevivência (viabilidade celular) verificada nas subseqüentes concentrações analisadas. A análise estatística foi realizada utilizando o Teste ANOVA Kruskal-Wallis, para verificar diferença significativa ($p \leq 0,05$) em cada teste efetuado.

Tabela 2. Atividade sobre promastigotas de *Leishmania braziliensis* (IC₅₀) e efeito citotóxico (CC₅₀) em células humanas tratadas com os compostos sintéticos ftalimidicos-triazólicos.

Compostos	IC ₅₀		CC ₅₀		IS
	<i>L. braziliensis</i> (L.b)		PBMC Humano		
	µg/mL	µM	µg/mL	µM	
RN1	15,85	50,4	>400	>1.430,5	>28,37*
RN2	49,9	152,0	>400	>2.084,12	>13,71
RN3	80,5	281,2	>400	>1.950,1	>6,94

Fonte: a autora.

Legenda: IS: índice de seletividade. PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*. * Melhor IS, composto escolhido para análise imunológica nos grupos de estudo.

Apesar da citotoxicidade em células humanas ser semelhante para os três compostos, demonstrada na figura 11, ao se analisar o IS, observa-se que o composto RN1 possui a maior seletividade para o parasito (IS= 28,37), sendo selecionado para avaliação quanto ao efeito imunomodulador nos ensaios de resposta imune.

9.1.2 Extrato natural de *C. vulgaris*

O cultivo de *C. vulgaris* (Figura 12) foi realizado obtendo-se a média de biomassa de 10 gramas, sendo suficiente para a realização de todos os experimentos. Para os ensaios de IC₅₀ com *L. braziliensis* e CC₅₀ em PBMC humano, verificou-se baixa toxicidade demonstrada pela elevada viabilidade celular (Figura 13). Havendo uma diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre a maioria das concentrações avaliadas para determinação da IC₅₀, exceto entre 31,25 µg/mL e 15,625 µg/mL. A análise de seletividade demonstra uma toxicidade, aproximadamente, sete vezes maior para promastigotas de *L. braziliensis*. Os valores de IC₅₀, CC₅₀ e do IS de *C. vulgaris* estão apresentados na Tabela 3.

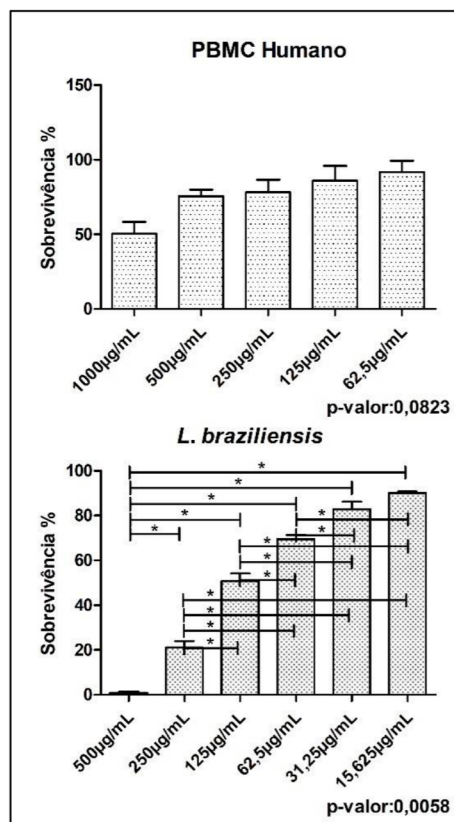
Figura 12. Cultivo de *Chlorella vulgaris*.



Fonte: A autora.

Legenda: Tubos tipo Erlenmeyer contendo o cultivo da *Chlorella vulgaris* (Utex 1803) em meio Bold's basal Stein (Ed.), sob aeração constante para atingir a fase exponencial de crescimento celular.

Figura 13. Taxa de sobrevivência das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano e de *Leishmania braziliensis* (promastigotas), tratadas com o extrato bioativo de *C. vulgaris*.



Fonte: A autora.

Legenda: PBMC: Células mononucleares do sangue periférico. Cada coluna corresponde a média da taxa de sobrevivência (viabilidade celular) verificada nas subseqüentes concentrações analisadas. A análise estatística foi realizada utilizando o Teste ANOVA Kruskal-Wallis, para verificar diferença significativa ($p \leq 0,05$) em cada teste efetuado, e observar uma significância após o Teste de comparação, entre todas as concentrações avaliadas na IC_{50} com *L. braziliensis*, exceto entre 31,25 µg/mL e 15,625 µg/mL.

Tabela 3. Atividade sobre promastigotas de *L. braziliensis* (IC₅₀) e efeito citotóxico (CC₅₀) em células humanas tratadas com o extrato bioativo de *C. vulgaris*.

Extrato	IC ₅₀	CC ₅₀	IS
	<i>L. braziliensis</i> (<i>L.b</i>)	PBMC Humano	
	µg/mL	µg/mL	
<i>C. vulgaris</i>	144,93	999,66	6,9

Fonte: A autora.

Legenda: IS: índice de seletividade. PBMC: células mononucleares do sangue periférico.

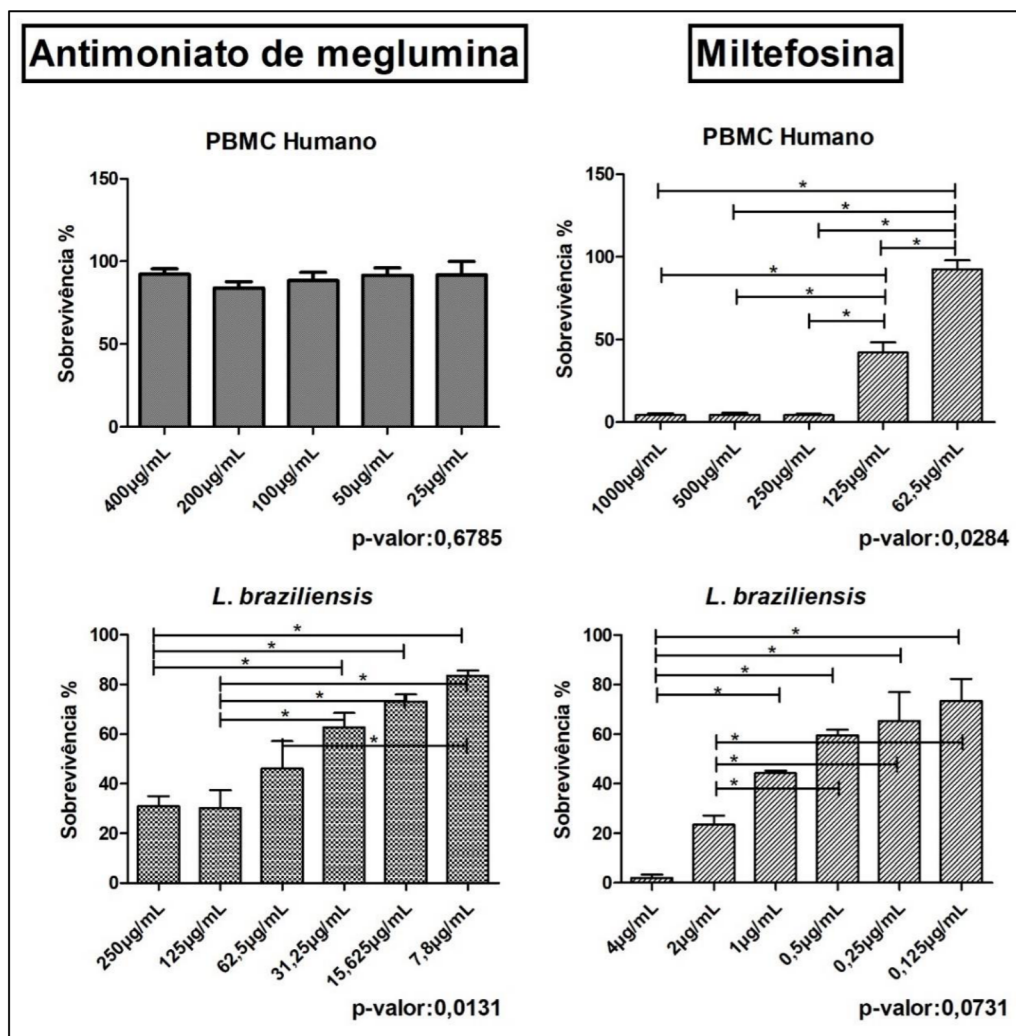
9.1.3 Drogas de referência

Após análise das drogas de referência, pode-se verificar para o antimoniato de meglumina uma baixa toxicidade tanto em células humanas como em promastigotas de *L. braziliensis*; com uma diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) apenas entre as concentrações 250 e 7,8 µg/mL presentes nas análises com a *L. braziliensis*, confirmando a necessidade de altas concentrações desta droga para ocorrer uma ação sobre o parasito.

De forma diferente que o antimoniato de meglumina, a miltefosina apresenta uma alta toxicidade para células humanas e promastigotas de *L. braziliensis*, sendo esta droga ainda mais tóxica para *L. braziliensis*, em comparação com o tratamento em PBMC humano. Dentre as concentrações avaliadas em PBMC humano, observou-se uma diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre as maiores e menores concentrações (Figura 14). Além disso, observou-se que a *L. braziliensis* tratada com miltefosina apresentou elevada sobrevivência das células proporcionada pela diminuição da concentração estudada (Figura 14).

Os valores de IC₅₀, CC₅₀ e do IS das drogas de referência estão apresentados na Tabela 4.

Figura 14. Taxa de sobrevivência das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano e de *Leishmania braziliensis* (promastigotas), tratadas com com antimoniato de meglumina e miltefosina.



Fonte: A autora.

Legenda: PBMC: células mononucleares do sangue periférico. *: Significância estatística. Cada coluna corresponde a média da taxa de sobrevivência (viabilidade celular) verificada nas subsequentes concentrações analisadas. A análise estatística foi realizada utilizando o Teste ANOVA Kruskal-Wallis, para verificar diferença significativa ($p \leq 0,05$) em cada teste efetuado, além do Teste T entre cada concentração avaliada.

Tabela 4. Atividade sobre promastigotas de *Leishmania braziliensis* (IC_{50}) e efeito citotóxico (CC_{50}) em células humanas tratadas com as drogas de referência para as leishmanioses.

Compostos	IC_{50}		CC_{50}		IS
	<i>L. braziliensis</i> (<i>L.b</i>)		PBMC Humano		Humano
	µg/mL	µM	µg/mL	µM	
Sb ^V	119,76	327,23	>400	1127	3,44
Miltefosina	1,02	2,5	159,49	391,32	156,36

Fonte: A autora.

Legenda: Sb^V: antimoniato de meglumina; IS: índice de seletividade; PBMC: células mononucleares do sangue periférico.

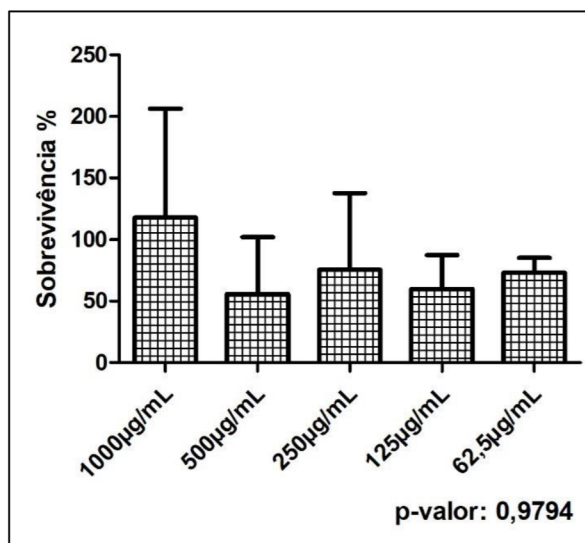
Em pequenas concentrações a miltefosina apresentou alta toxicidade para promastigotas de *L. braziliensis*, com o IS superior ao antimoniato de meglumina. Estas drogas estão sendo atualmente usadas para o tratamento das leishmanioses, mas não apresentam efeitos sobre a resposta imune do hospedeiro, com relatos de falhas terapêuticas.

9.1.4 Imiquimod

Foram obtidos 200 mg do Imiquimod, na forma liofilizada, sendo posteriormente solubilizado em DMSO. No entanto, ao realizar as diluições de uso com o meio RPMI, o medicamento decantou, por ser insolúvel em H₂O, podendo visualizar cristais por microscopia óptica.

Após avaliação da CC₅₀, determinou-se o valor de 195,63 µg/mL (814.107,36 µM), mas a decantação do medicamento nos poços em análise pode ter influenciado na leitura do MTT, ocasionando picos de desvio-padrão, principalmente na maior concentração (1000 µg/mL), não sendo observadas significâncias estatísticas (Figura 15).

Figura 15. Taxa de sobrevivência das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano tratadas com Imiquimod.



Fonte: A autora.

Legenda: PBMC: células mononucleares do sangue periférico. Cada coluna corresponde a média da taxa de sobrevivência (viabilidade celular) verificada nas subseqüentes concentrações analisadas. A análise estatística foi realizada utilizando o Teste ANOVA Kruskal-Wallis, para verificar diferença significativa ($p \leq 0,05$) em cada teste efetuado.

Devido a interferência no experimento, o cultivo realizado para células humanas tratadas com o Imiquimod baseou-se no estudo de Tuipulotu e colaboradores (2018), que descreve o valor de 0,36045µg/mL (1,5µM) para a EC₅₀ (concentração de eficiência).

9.2 Análise comparativa

Comparando-se as drogas de referências com as diferentes estratégias terapêuticas (compostos ftalimídicos-triazólicos e extratos bioativos de *Chlorella vulgaris*) pode-se observar que a Miltefosina apresentou a maior atividade sobre o parasito, porém foi o mais tóxico para PBMC humano (Milttefosina: IC₅₀=1,02µg/mL; CC₅₀= 159,49µg/mL). Após a Miltefosina, o composto RN1 foi o que apresentou maior seletividade para *L. braziliensis* (RN1: IS=28,37; Miltefosina: IS=156,36). O extrato bioativo de *C. vulgaris*, apresentou baixa toxicidade para a *L. braziliensis*, com dados próximos ao antimoniato de meglumina (*C. vulgaris*: IC₅₀= 144,93µg/mL; antimoniato de meglumina: IC₅₀= 119,76µg/mL).

As drogas de referência (antimoniato de meglumina: CC₅₀= 412,46 µg/mL; miltefosina: CC₅₀= 159,49µg/mL) apresentaram uma maior toxicidade para o PBMC humano quando comparado com os resultados do composto RN1 (CC₅₀= 449,59 µg/mL) e extrato bioativo de *C. vulgaris* (CC₅₀= 999,656 µg/mL), os quais possuem um valor de CC₅₀ mais elevado, ou seja, uma menor toxicidade para as células do hospedeiro humano, principalmente no extrato natural. O Imiquimod (CC₅₀= 195,63µg/mL), mostrou-se tóxico como a miltefosina (CC₅₀= 159,49µg/mL).

Dessa forma, analisou-se o IS de todas as estratégias terapêuticas (Tabela 5), obteve-se que a miltefosina possui o maior valor, sendo 100 vezes mais seletivo para o parasito do que para as células humanas (IS: 156,36; CC₅₀= 159,49µg/mL; IC₅₀= 1,02 µg/mL). Os novos candidatos terapêuticos, natural ou sintético, possuem potencial para dar continuidade aos ensaios imunológicos, devido a seletividade contra o parasito e menor toxicidade em PBMC humano, obtendo resultados de IS superiores ao antimoniato de meglumina, droga de referência para tratamento da LTA.

Tabela 5. Índices de Seletividade (IS) dos compostos sintéticos, extrato natural e drogas de referências para o tratamento das leishmanioses.

IS	Composto Sintético			Extrato natural	DR	
	RN1	RN2	RN3	<i>Chlorella vulgaris</i>	Sb ^v	M
	28,37	13,71	6,94	6,9	3,44	156,36

Fonte: A autora.

Legenda: IS = CC_{50} de PBMC/ IC_{50} de *Leishmania braziliensis* (L.b); DR: droga de referência; Sb^v: antimoníato de meglumina.; M: Miltefosina.

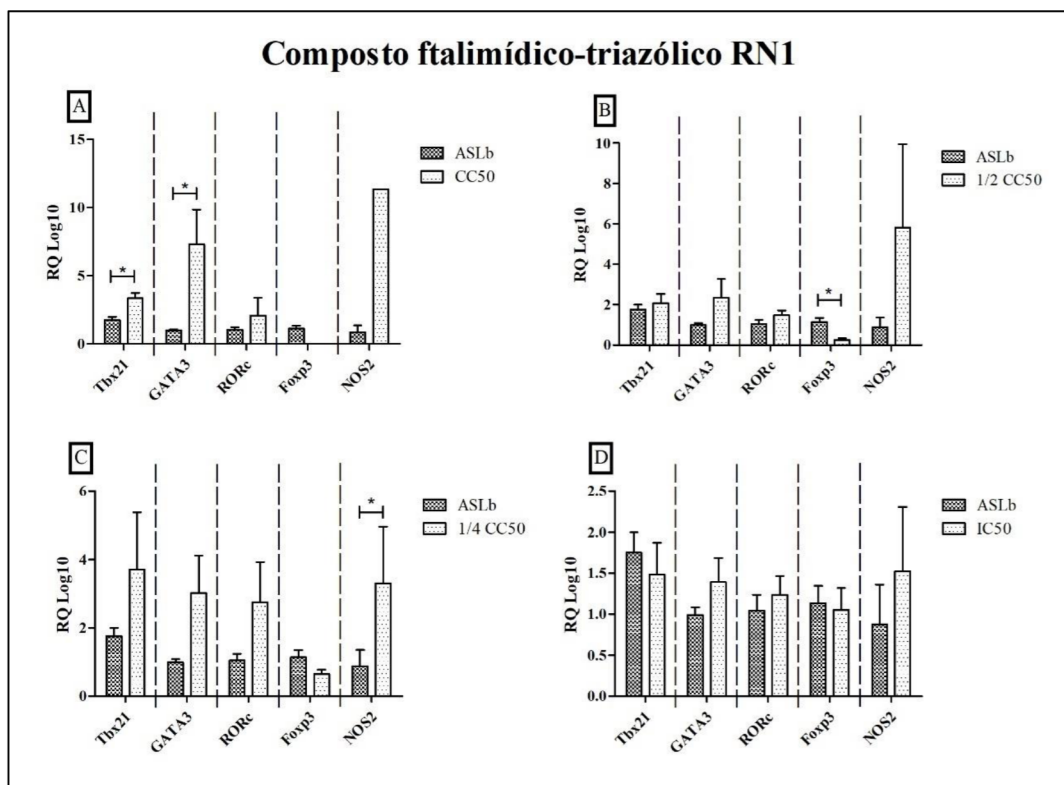
9.3 Análise da resposta imune

9.3.1 Expressão gênica

Após extração do RNA do PBMC humano, realizou-se a transcrição reversa em cDNA, para quantificar os genes Tbx21, GATA3, RORc, FOXP3 e NOS2, relacionados a diferenciação de células T para os perfis Th1, Th2, Th17, Treg e produção de NO, respectivamente.

Desta forma, ao verificar os dados da expressão gênica estimulada com o composto ftalimídico-triazólico RN1 (Figura 16), observou-se que nas três primeiras concentrações avaliadas existe um estímulo da produção de células dos perfis Th1, Th2, Th17, além do NO, devido a maior expressão dos genes Tbx21, GATA3, RORc e NOS2, quando comparados com a expressão do ASLb. Havendo uma diferença estatística significativa entre o ASLb e os genes Tbx21 ($p\text{-value}=0,0080$) / GATA3 ($p\text{-value}=0,0375$), ambos na concentração da CC_{50} . O gene FOXP3 apresentou uma baixa expressão em todas as concentrações analisadas, e ao comparar com o ASLb ocorreu uma diferença estatística significativa em $\frac{1}{2}$ da CC_{50} ($p\text{-value}=0,0050$); por sua vez, observou-se que a diminuição da concentração utilizada para o estímulo com o composto RN1, apresentou um aumento na média de expressão deste gene (Tabela 6). Na concentração da IC_{50} , o gene NOS2 apresentou uma diferença estatística significativa quando comparado ao ASLb ($p\text{-value}=0,0091$) (Tabela 7).

Figura 16. Quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcripcionais específicos após o estímulo das células com o composto ftalimídico-triazólico RN1.



Fonte: a autora.

Legenda: A (valor da CC₅₀); B (metade do valor da CC₅₀); C (um quarto do valor da CC₅₀); D (valor da IC₅₀); ASLb (Antígeno Solúvel de *Leishmania braziliensis*); CC₅₀ (Concentração Citolóxica de 50%); IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%); * (Significância estatística).

Tabela 6. Média da quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcripcionais específicos após o estímulo das células com o composto ftalimídico-triazólico RN1 em diferentes concentrações.

Genes	RN1			
	CC ₅₀	½ CC ₅₀	¼ CC ₅₀	IC ₅₀
Tbx21	3,356	2,074	3,706	1,484
GATA3	7,319	2,349	3,015	1,392
RORc	2,089	1,481	2,759	1,235
FOXP3	-	0,2476	0,6494	1,050
NOS2	11,35	5,828	3,309	1,525

Fonte: a autora.

Legenda: CC₅₀ (Concentração Citolóxica de 50%); IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%); - (não determinado).

Tabela 7. Comparação entre o ASLb e a média da quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos, após o estímulo das células com o composto ftalimídico-triazólico RN1 em diferentes concentrações.

RN1 CC ₅₀ p-value					
X	Tbx21	GATA3	RORc	FOXP3	NOS2
ASLb	0,0080*	0,0375*	0,2299	-	-
RN1 ½ CC ₅₀ p-value					
X	Tbx21	GATA3	RORc	FOXP3	NOS2
ASLb	0,5483	0,1802	0,1829	0,0050*	0,2813
RN1 ¼ CC ₅₀ p-value					
X	Tbx21	GATA3	RORc	FOXP3	NOS2
ASLb	0,2823	0,1030	0,1841	0,0824	0,0091*
RN1 IC ₅₀ p-value					
X	Tbx21	GATA3	RORc	FOXP3	NOS2
ASLb	0,5772	0,2310	0,5413	0,8090	0,1803

Fonte: a autora.

Legenda: CC₅₀ (Concentração Citotóxica de 50%); IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%); * (*p-value* < 0,05); - (não determinado).

Ao analisar a correlação entre os genes para o RN1, a partir da concentração de ½ da CC₅₀ verificou-se diversas correlações positivas muito fortes, sendo estatisticamente significativa as correlações entre Tbx21 e GATA3 (*p-value*=0,023), Tbx21 e Foxp3 (*p-value*=0,003), além de GATA3 e Foxp3 (*p-value*=0,012) (Tabela 8). Em relação a concentração de ¼ da CC₅₀ verificou-se uma correlação positiva muito forte entre Tbx21 x GATA3 (*p-value*=0,029), e Tbx21 x RORc (*p-value*=0,035), e com o valor da IC₅₀, entre GATA3 e Foxp3 (*p-value*=0,008).

Tabela 8. Correlação entre os genes expressos após os estímulos com as diferentes concentrações do composto ftalimídico-triazólico RN1.

	A x B	A x C	A x D	A x E	B x C	B x D	B x E	C x D	C x E	D x E
CC ₅₀										
<i>r</i>	0,435	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p-value</i>	0,565	-	-	-	-	-	-	-	-	-
½ CC ₅₀										
<i>r</i>	0,928	0,803	0,982	-0,182	0,787	0,953	0,322	0,713	0,935	-0,110
<i>p-value</i>	0,023*	0,102	0,003*	0,884	0,114	0,012*	0,791	0,176	0,231	0,930
¼ CC ₅₀										
<i>r</i>	0,915	0,904	0,306	-0,989	0,996	0,648	-0,975	0,681	-0,967	-0,297
<i>p-value</i>	0,029*	0,035*	0,617	0,094	-	0,237	0,143	0,205	0,164	0,808
IC ₅₀										
<i>r</i>	0,382	-0,064	0,568	0,081	0,771	0,964	0,958	0,682	-0,467	0,621
<i>p-value</i>	0,525	0,919	0,318	0,949	0,127	0,008*	0,185	0,204	0,691	0,574

Fonte: a autora.

Legenda: A (Tbx21); B (GATA3); C (RORc); D (FOXP3); E (NOS2); r (Coeficiente de correlação de Pearson); rs (Coeficiente de correlação de Spearman); CC₅₀ (Concentração Citotóxica de 50%); IC₅₀

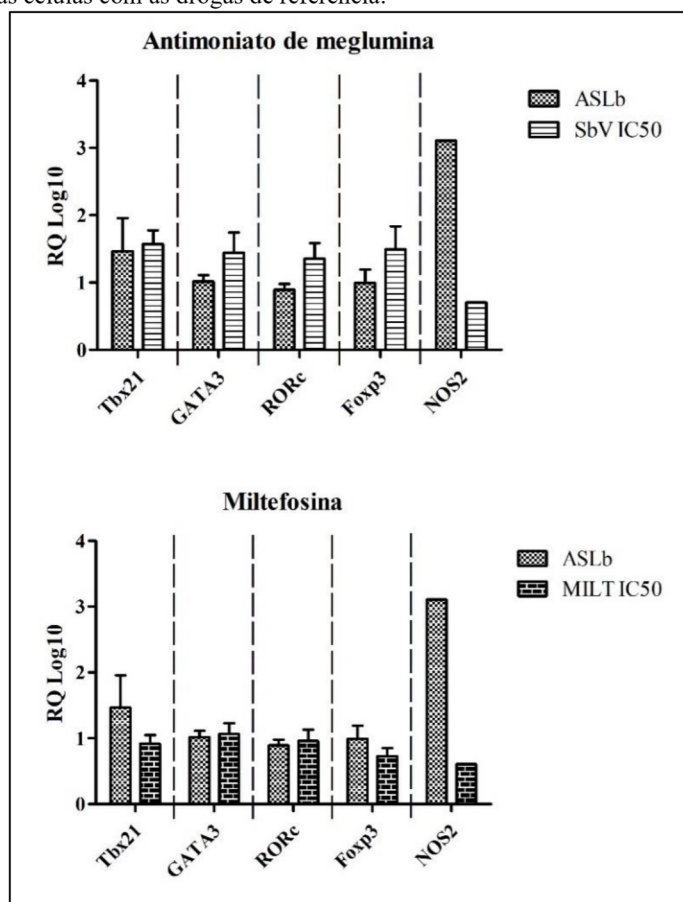
(Concentração Inibitória de 50%); * (p -value < 0,05); - (não determinado). Valores em negrito demonstram uma correlação muito forte.

Com relação as drogas de referência, o antimoniato de meglumina apresentou uma maior expressão para os genes GATA3, RORc e Foxp3, quando comparado com o ASLb, além disso, observa-se um equilíbrio na expressão dos perfis Th1xTh2xTh17xTreg (Figura 17). O gene NOS2 apresentou uma expressão inferior ao ASLb.

Já para a miltefosina, observou-se um equilíbrio na expressão dos perfis Th1xTh2xTh17 (Figura 17), além disso, os genes GATA3 e RORc apresentaram fatores transcricionais semelhantes aos expressos no ASLb. Apenas o gene do NOS2, obteve uma expressão bastante inferior ao comparar com o ASLb. As médias das quantificações relativas dos genes encontram-se na Tabela 9.

As drogas de referência não apresentaram diferença estatística significativa ao comparar com o ASLb (Tabela 10).

Figura 17. Quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com as drogas de referência.



Fonte: a autora.

Legenda: ASLb (Antígeno Solúvel de *Leishmania braziliensis*); Sb^V (Antimoniato de meglumina); MILT: Miltefosina; IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%).

Tabela 9. Média da quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com as drogas de referência.

Genes	Sb ^V IC ₅₀	Miltefosina IC ₅₀
Tbx21	1,572	0,9138
GATA3	1,442	1,066
RORc	1,355	0,9590
FOXP3	1,494	0,7274
NOS2	0,7060	0,6040

Fonte: a autora.

Legenda: Sb^V (Antimoniato de meglumina); IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%); - (não determinado).

Tabela 10. Comparação entre o ASLb e a média da quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com as drogas de referência em diferentes concentrações.

Sb ^V IC ₅₀ p-value					
X	Tbx21	GATA3	RORc	FOXP3	NOS2
ASLb	0,8442	0,2167	0,0960	0,2390	-
Miltefosina IC ₅₀ p-value					
X	Tbx21	GATA3	RORc	FOXP3	NOS2
ASLb	0,3117	0,7961	0,7354	0,2923	-

Fonte: a autora.

Legenda: Sb^V (Antimoniato de meglumina); IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%); * (*p-value* < 0,05); - (não determinado).

Ao analisar a correlação entre os genes das drogas de referência, o antimoniato de meglumina apresentou uma correlação positiva muito forte e significativa, entre GATA3 e RORc na concentração da IC₅₀ (*p-value*=0,006) (Tabela 11). No entanto, para a miltefosina não foram observadas correlações estatisticamente significativas.

Tabela 11. Correlação entre os genes expressos após os estímulos com as diferentes concentrações das drogas de referência.

	A x B	A x C	A x D	A x E	B x C	B x D	B x E	C x D	C x E	D x E
Sb ^V IC ₅₀										
<i>r</i>	0,705	0,575	0,298	-	0,970	0,732	-	0,872	-	-
<i>p-value</i>	0,184	0,310	0,626	-	0,006*	0,160	-	0,054	-	-
Miltefosina IC ₅₀										
<i>r</i>	0,711	0,474	0,102	-	0,771	0,242	-	0,747	-	-
<i>p-value</i>	0,178	0,420	0,871	-	0,127	0,695	-	0,146	-	-

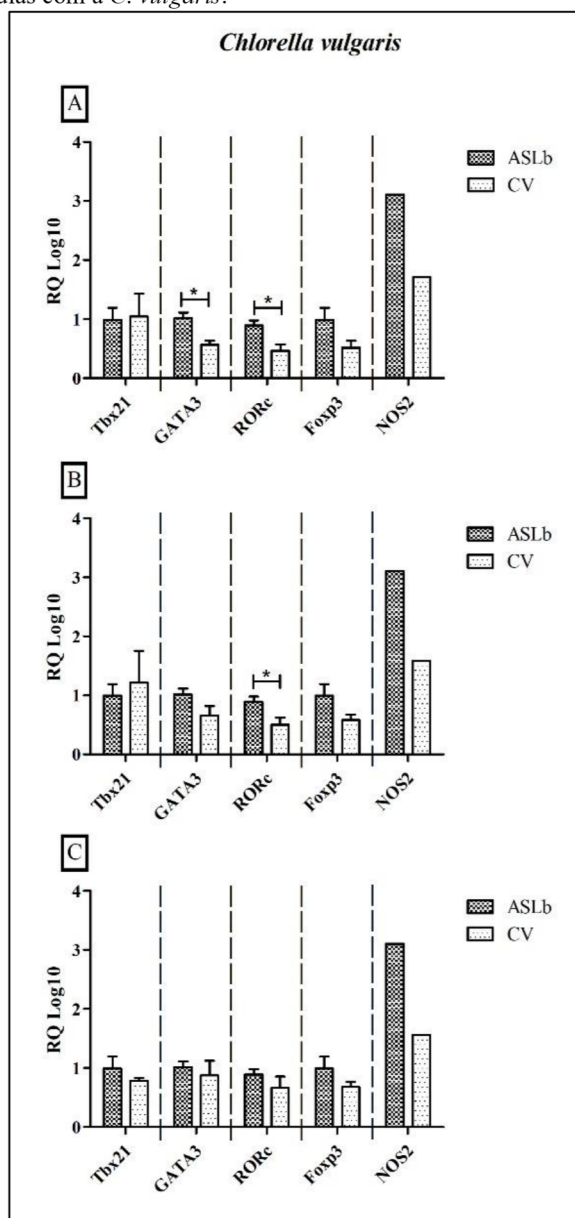
Fonte: a autora.

Legenda: A (Tbx21); B (GATA3); C (RORc); D (FOXP3); E (NOS2); *r* (Coeficiente de correlação de Pearson); *rs* (Coeficiente de correlação de Spearman); Sb^V (Antimoniato de meglumina); IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%); * (*p-value* < 0,05); - (não determinado). Valores em negrito demonstram uma correlação muito forte.

Nas células tratadas com extrato de *C. vulgaris*, observa-se um estímulo da expressão do gene Tbx21, o qual induz o perfil Th1, ao comparar com o ASLb, nas concentrações de ¼ da CC₅₀ e IC₅₀, com diferença estatística significativa para a expressão dos genes GATA3 (*p-value*=0,0057) e RORc (*p-value*=0,0136 e 0,0285) com

o ASLb (Figura 18), podendo se notar um equilíbrio no estímulo dos perfis Th2xTh17xTreg. Observou-se níveis baixos de expressão para o gene NOS2, ao comparar com o ASLb, em todas as concentrações. Devido a não expressão deste gene (NOS2) pela maioria dos cDNAs analisados, a análise de significância não pode ser realizada. As médias das quantificações relativas dos genes encontram-se na Tabela 12, e os valores de p na Tabela 13.

Figura 18. Quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcripcionais específicos após o estímulo das células com a *C. vulgaris*.



Fonte: a autora.

Legenda: A (um quarto do valor da CC_{50}); B (valor da IC_{50}); C (metade do valor da IC_{50}); ASLb (Antígeno Solúvel de *Leishmania braziliensis*); CC_{50} (Concentração Citotóxica de 50%); IC_{50} (Concentração Inibitória de 50%); CV (*Chlorella vulgaris*); * (Significância estatística).

Tabela 12. Média da quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com o extrato de *C. vulgaris*.

<i>C. vulgaris</i>			
Genes	¼ CC ₅₀	IC ₅₀	½ IC ₅₀
Tbx21	1,045	1,218	0,7830
GATA3	0,5658	0,6570	0,8756
RORc	0,4660	0,5004	0,6642
FOXP3	0,5164	0,5832	0,6788
NOS2	1,710	1,585	1,563

Fonte: a autora.

Legenda: CC₅₀ (Concentração Citotóxica de 50%); IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%); - (não determinado).

Tabela 13. Comparação entre o ASLb e a média da quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com o extrato de *C. vulgaris* em diferentes concentrações.

CV ¼ CC ₅₀ p-value					
X	Tbx21	GATA3	RORc	FOXP3	NOS2
ASLb	0,9048	0,0057*	0,0136*	0,0725	-
CV IC ₅₀ p-value					
X	Tbx21	GATA3	RORc	FOXP3	NOS2
ASLb	0,7036	0,0914	0,0285*	0,0974	-
CV ½ IC ₅₀ p-value					
X	Tbx21	GATA3	RORc	FOXP3	NOS2
ASLb	0,3393	0,6093	0,3059	0,1892	-

Fonte: a autora.

Legenda: CV (*C. vulgaris*); CC₅₀ (Concentração Citotóxica de 50%); IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%); * (*p-value* < 0,05); - (não determinado).

A *C. vulgaris* apresentou uma correlação muito forte mas não significativa, entre GATA3 e RORc na concentração de ½ da IC₅₀ (Tabela 14), nas demais concentrações avaliadas correlações estatisticamente significativas não foram encontradas.

Tabela 14. Correlação entre os genes expressos após os estímulos com as diferentes concentrações do com o extrato de *C. vulgaris*.

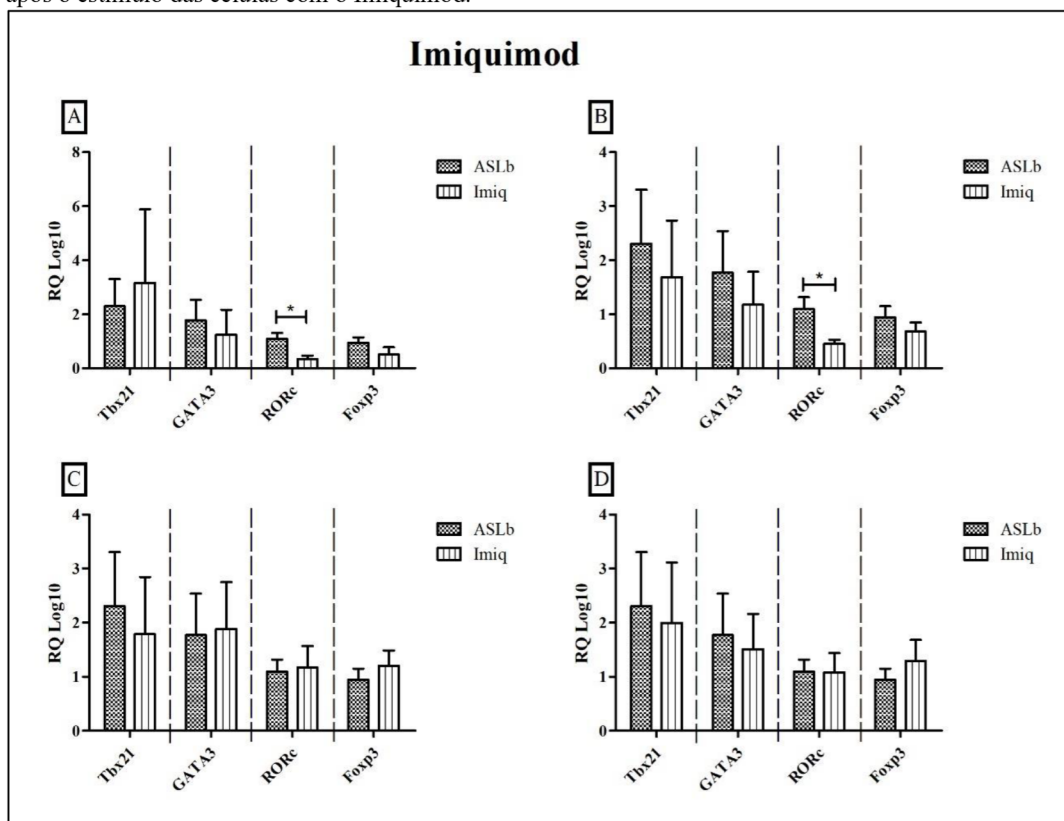
	A x B	A x C	A x D	A x E	B x C	B x D	B x E	C x D	C x E	D x E
¼ CC ₅₀										
<i>r</i>	0,277	-0,384	0,449	-	0,722	0,562	-	0,445	-	-
<i>p-value</i>	0,652	0,523	0,448	-	0,168	0,324	-	0,453	-	-
IC ₅₀										
<i>r</i>	-0,181	-0,347	0,298	-	0,722	0,763	-	0,712	-	-
<i>p-value</i>	0,771	0,567	0,626	-	0,169	0,133	-	0,178	-	-
½ IC ₅₀										
<i>r</i>	-0,612	-0,635	-0,631	-	0,957	0,746	-	0,713	-	-
<i>p-value</i>	0,721	0,564	0,345	-	0,515	0,472	-	0,946	-	-

Fonte: o autor.

Legenda: A (Tbx21); B (GATA3); C (RORc); D (FOXP3); E (NOS2); *r* (Coeficiente de correlação de Pearson); *rs* (Coeficiente de correlação de Spearman); CC₅₀ (Concentração Citotóxica de 50%); IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%); * (*p-value* < 0,05); - (não determinado). Valores em negrito demonstram uma correlação muito forte.

Para o Imiquimod, observou-se a expressão do gene Tbx21, o qual apresentou uma média de quantificação relativa superior aos demais genes, na concentração de 2x o valor da EC_{50} (Figura 19) (Tabela 15). Além disso, verificou-se uma diferença estatística significativa para a expressão do gene RORc ($p\text{-value}=0,0190$ e $p\text{-value}=0,0249$), nas concentrações de 2x EC_{50} e EC_{50} , ao comparar com o ASLb (Tabela 16). Por outro lado, nota-se um equilíbrio na expressão dos perfis Th1xTh2 e Th17xTreg, na concentração de $\frac{1}{2}$ do valor da EC_{50} , indicando um estímulo imunomodulador. Por sua vez, o gene FOXP3, na concentração de $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da EC_{50} , apresentou uma expressão superior ao obtido pelo ASLb, além de apresentar um aumento nas médias das quantificações relativas dos genes, conforme a diminuição do valor da concentração avaliado.

Figura 19. Quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com o Imiquimod.



Fonte: a autora.

Legenda: A (duas vezes o valor da EC_{50}); B (valor da EC_{50}); C (metade do valor da EC_{50}); D (um quarto do valor da EC_{50}); ASLb (Antígeno Solúvel de *Leishmania braziliensis*); Imiq (Imiquimod); * (Significância estatística).

Tabela 15. Média da quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com o Imiquimod.

Imiquimod				
Genes	2x EC ₅₀	EC ₅₀	½ EC ₅₀	¼ EC ₅₀
Tbx21	3,154	1,686	1,785	1,999
GATA3	1,245	1,176	1,877	1,509
RORc	0,3362	0,4530	1,172	1,078
FOXP3	0,5172	0,6848	1,203	1,293
NOS2	-	-	-	-

Fonte: a autora.

Legenda: CC₅₀ (Concentração Citotóxica de 50%); IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%); - (não determinado).

Tabela 16. Comparação entre o ASLb e a média da quantificação relativa (RQ Log10) da expressão gênica dos fatores transcricionais específicos após o estímulo das células com o Imiquimod em diferentes concentrações.

I 2x EC ₅₀ p-value				
X	Tbx21	GATA3	RORc	FOXP3
ASLb	0,7772	0,6751	0,0190*	0,2362
I EC ₅₀ p-value				
X	Tbx21	GATA3	RORc	FOXP3
ASLb	0,6818	0,5640	0,0249*	0,3575
I ½ EC ₅₀ p-value				
X	Tbx21	GATA3	RORc	FOXP3
ASLb	0,7316	0,9275	0,8755	0,4747
I ¼ EC ₅₀ p-value				
X	Tbx21	GATA3	RORc	FOXP3
ASLb	0,8438	0,8038	0,9626	0,4509

Fonte: a autora.

Legenda: CC₅₀ (Concentração Citotóxica de 50%); IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%); * (*p-value* < 0,05); - (não determinado).

Analisando a correlação entre os genes para o Imiquimod, observou-se uma correlação positiva muito forte, mas não significativa entre Tbx21 e FOXP3 na concentração da EC₅₀ (Tabela 17). Verificou-se uma correlação positiva muito forte entre Tbx21 e GATA3, nas últimas concentrações avaliadas, ½ (*p-value*=0,001) e ¼ (*p-value*=0,002) da EC₅₀, observando um equilíbrio na expressão dos perfis Th1xTh2.