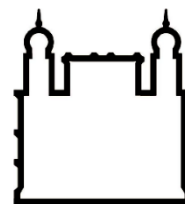




**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO DO PAPEL IMUNOMODULADOR E ANTILEISHMANIA  
DA FISALINA F EM MACRÓFAGOS HUMANOS**

**GABRIELA BITTENCOURT GRIMALDI**

**Salvador – Bahia  
2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**ESTUDO DO PAPEL IMUNOMODULADOR E ANTILEISHMANIA  
DA FISALINA F EM MACRÓFAGOS HUMANOS**

**GABRIELA BITTENCOURT GRIMALDI**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Patologia Humana e Experimental para a obtenção  
do grau de Mestra

Orientadora: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Coorientadora: Dra. Elisalva Teixeira Guimarães

**Salvador – Bahia  
2022**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

**G861e** Grimaldi, Gabriela Bittencourt

Estudo do papel imunomodulador e antileishmania da fisalina F em macrófagos humanos/ Gabriela Bittencourt Grimaldi. \_ Salvador, 2022.

79 f.: il.: 30 cm

Orientadora: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Coorientadora: Dra. Elisalva Teixeira Guimarães

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. Macrófago humano. 2. Fisalina F. 3. Imunomodulação. 4. Leishmaniose cutânea. I. Título.

CDU 616.928.5

**"ESTUDO DO PAPEL IMUNOMODULADOR E ANTILEISHMANIADA FISALINA F EM  
MACRÓFRAGOS HUMANOS".**

Gabriela Bittencourt Grimaldi

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

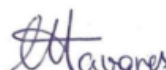
Salvador, 22 de julho de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA



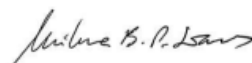
---

Dra. Valéria Pereira Hernandez  
Pesquisadora  
IAM/FIOCRUZ



---

Dra. Natália Machado Tavares  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



---

Dra. Milena Botelho Pereira Soares  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) do Instituto Gonçalo

Moniz.

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Patologia Humana.

À Universidade Federal da Bahia.

Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina- UFBA.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha orientadora e chefe do laboratório, Dra. Milena Soares, por me orientar com maestria e trazer luz durante percalços. Agradeço por toda a confiança e oportunidade proporcionada a minha semente ser cientista. Por todo acolhimento durante o percurso, com trocas de riquezas de sabedoria. Cientista modelo de inspiração para a minha vida, pela ética e compromisso.

À minha coorientadora, Dra. Elisalva Guimarães, por me dar as mãos como um anjo e acreditar nas minhas potencialidades. Proporcionar durante o processo segurança, tranquilidade e confiança para que eu chegasse até aqui. Abraçou o meu projeto trazendo luz ao que estava oculto, arejando o meu saber como oxigênio da presença e paciência, respeitando os meus limites durante este desafio.

À minha mãe, que foi um dos meus maiores suportes para alcançar o fim deste ciclo.

Ao meu pai, pelas ligações de afeto, sempre me mostrando que eu não estava sozinha.

À minha amiga irmã, Alessandra Gonzalez que me fazia enxergar o possível.

Ao Dr. Cássio Meira, que me treinou para apresentações, ensinou a realizar alguns experimentos e me aconselhou, acolheu e sempre foi muito paciente comigo.

À Breno Cardim, por toda paciência e todo suporte acadêmico.

À Ivan Pimenta, meu irmão, pela ajuda em experimentos, na bancada, coleta de sangue, parceria e trocas.

À Larissa Silva que sempre esteve disposta a me ajudar, realizava a coleta de sangue em quase todos os meus experimentos, e sempre muito carinhosa.

À Luiza Opretzka, Laís Perez, Luciano Pacheco, Helenita Quadros, Caroline Sousa, Valdenizia Rodrigues, Suellen Rocha, Rafaela Alves, Maiara Oliveira, Dahara Carvalho, Scarlet Mota, Paula Dantas, Camila Santos, Carine Azevedo, Rute Ribeiro, Dr. Diogo Rodrigo e todos os outros membros do LETI por fazer dos meus dias mais leves no laboratório. Além de todos os conselhos de cada um, apoio, ensinamentos e trocas de conhecimentos.

Às minhas amigas do LEITV Thaline e Isabele, por todo apoio psicológico e trocas.

À Dra. Natalia Tavares, do LAIPHE, e o seus alunos Icaro Bonyek e Sara Nunes, por todo o compartilhamento de conhecimentos, disponibilidade e atenção.

À Arlene Lessa, Jacqueline Silva, Márcio Santos, Adriana Rangel e Cláudio Figueira, responsáveis pela Plataforma de Microscopia Eletrônica da FIOCRUZ-BA, por me auxiliarem

com os experimentos, por toda paciência e dedicação que sempre tiveram comigo.

À Dona Vanda e Sr. Chico, funcionários da FIOCRUZ, por tentarem me fazer sorrir sempre.

Às minhas primas/irmãs Sabrina e Sofia, meu padrasto Augusto, tia Ana, minha irmã Maria Eduarda e toda a minha família pelo carinho, compreensão e auxílio reconfortante nos momentos que mais precisei.

À Gabriel Silva, por me ensinar que podemos estar na vida como estamos nas ondas: uma onda após a outra, para respirar e desfrutar do aqui e agora.

À Patrícia Jerônimo e sua família maravilhosa, por me acolher nos momentos mais difíceis com carinho e afeto.

Ao meu amigo irmão, Gabriel Marinho que não largou minha mão, que me acolhia e me apoiava. E aos meus amigos da vida que sempre estiveram ao meu lado acreditando no meu potencial.

À minha psicóloga Ana Maria Rodrigues, pela inspiração e força durante o meu processo.

À minha professora de inglês Sara Bonsucesso, por me mostrar a minha potência de ser guerreira para lutar.

Ao Dr. Vinicius Rocha, pelas aprendizagens durante um período.

Ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) e ao Instituto Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz, pela infraestrutura para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos órgãos de fomento FAPESB, CAPES, CNPQ, FINEP, FIOCRUZ.

“Que os vossos esforços desafiem as  
impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes  
coisas do homem foram conquistadas do que parecia  
impossível.”

**(Charles Chaplin)**



GRIMALDI, Gabriela Bittencourt. **Estudo do papel imunomodulador e antileishmania da fisalina F em macrófagos humanos**. 2021. 79 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Os macrófagos são importantes células em processos inflamatórios e a sua desregulação pode afetar diversas doenças, tais como doenças autoimunes e doenças parasitárias. As leishmanioses, um conjunto de doenças tropicais negligenciadas, estão incluídas nesta categoria de enfermidades. A leishmaniose cutânea é caracterizada por úlceras em área de tegumento e a sua gravidade está relacionada com a imunopatogênese. O tratamento disponível é citotóxico, está associado à falha terapêutica, resistência parasitária, alto custo e tempo de administração prolongado. A fisalina F possui propriedades farmacológicas promissoras com potente atividade antileishmania e imunomoduladora em camundongos. **OBJETIVO:** Este trabalho teve como objetivo avaliar o papel imunomodulador em macrófagos humanos e a atividade anti-*Leishmania braziliensis* da fisalina F, *in vitro*. **MATERIAL E MÉTODOS:** Macrófagos humanos foram obtidos de PBMC de doadores saudáveis. A dosagem de citocinas inflamatórias foi realizada pelo método de ELISA no sobrenadante de macrófagos humanos estimulados com LPS e com adição ou não de fisalina F ou dexametasona. A citotoxicidade da fisalina F em macrófagos humanos e a viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* foram mensuradas utilizando o Alamar Blue®. A atividade antiparasitária da fisalina F em macrófagos humanos foi determinada após 24 horas de infecção com *L. braziliensis*. Ensaios de citometria de fluxo e de microscopia eletrônica foram realizados para avaliação dos possíveis mecanismos de ação da fisalina F em promastigotas de *L. braziliensis*. **RESULTADOS:** A fisalina F reduziu a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  por macrófagos ativados. Nos ensaios de citotoxicidade, apresentou o valor de CC<sub>50</sub> de 6,07  $\pm$  1,17  $\mu$ M. Este composto também inibiu a proliferação de formas promastigotas de *L. braziliensis*, com valor de IC<sub>50</sub> de 10,85  $\pm$  0,99  $\mu$ M e reduziu o número de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófago, quando comparado com os controles. Em promastigotas, o surgimento de inclusões lipídicas, encurtamento do corpo celular, a destruição e o afrouxamento de membrana foram observados na análise ultraestrutural por MEV e MET após o tratamento com fisalina F. Análises de citometria de fluxo indicam que a fisalina F induz um mecanismo de morte similar a apoptose em *L. braziliensis*. **CONCLUSÕES:** A fisalina F inibiu a ativação de macrófagos humanos e promoveu uma atividade anti- *L. braziliensis* eficaz em promastigotas e em amastigotas.

**Palavras-chave:** Macrófago humano. Fisalina F. Imunomodulação. Leishmaniose cutânea.

GRIMALDI, Gabriela Bittencourt. **Study of the immunomodulatory and antileishmania role of physalin F in human macrophages**. 2021. 79 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Macrophages are important cells in inflammatory processes, and their deregulation can affect several diseases, such as autoimmune diseases and parasitic diseases. Leishmaniasis, a group of neglected tropical diseases, is included in this category of diseases. Cutaneous leishmaniasis is characterized by ulcers in the tegument area and its severity is related to immunopathogenesis. The available treatment is cytotoxic, associated with therapeutic failure, parasite resistance, high cost and prolonged administration time. Physalin F has promising pharmacological properties with potent antileishmanial and immunomodulatory activity in mice. **OBJECTIVE:** This study aimed to evaluate the immunomodulatory role in human macrophages and the anti-*Leishmania braziliensis* activity of physalin F in vitro. **MATERIAL AND METHODS:** Human macrophages were obtained from PBMC from healthy donors. The dosage of inflammatory cytokines was performed by the ELISA method in the supernatant of human macrophages stimulated with LPS and with or without the addition of physalin F or dexamethasone. The cytotoxicity of physalin F on human macrophages and the viability of *L. braziliensis* promastigotes were measured using Alamar Blue®. The antiparasitic activity of physalin F on human macrophages was determined after 24 hours of infection with *L. braziliensis*. Flow cytometry and electron microscopy assays were performed to evaluate the possible mechanisms of action of physalin F in *L. braziliensis* promastigotes. **RESULTS:** Physalin F reduced the production of the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  by activated macrophages. In the cytotoxicity assays, it presented a CC<sub>50</sub> value of  $6.07 \pm 1.17 \mu\text{M}$ . This compound also inhibited the proliferation of promastigote forms of *L. braziliensis*, with an IC<sub>50</sub> value of  $10.85 \pm 0.99 \mu\text{M}$ , and reduced the number of infected human macrophages and the number of amastigotes per macrophage, when compared to controls. In promastigotes, the appearance of lipid inclusions, rounding of the cell body, destruction and loosening of the cell membrane were observed in the ultrastructural analysis by MEV and MET after treatment with physalin F. Flow cytometry analyzes indicate that physalin F induces apoptosis in *L. braziliensis*. **CONCLUSIONS:** Physalin F inhibited the activation of human macrophages and promoted an effective anti-*L. braziliensis* activity, in both promastigotes and amastigotes.

**Keywords:** Human macrophage. Physalin F. Immunomodulation. Cutaneous leishmaniasis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura molecular das fisalinas	32
<b>Figura 2</b>	Dosagem de citocinas pró-inflamatórias	44
<b>Figura 3</b>	Atividade da fisalina F em macrófagos humanos infectados com <i>L. braziliensis</i>	46
<b>Figura 4</b>	Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET) de promastigotas de <i>L. braziliensis</i> tratadas com fisalina F	47
<b>Figura 5</b>	Padrão de morte celular por citometria de fluxo	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Espécies de leishmania, manifestações clínicas, distribuição geográfica e vetores. Adaptado de Dubie & Mohammed, 2020	20
<b>Tabela 2</b>	Tratamentos utilizados para leishmaniose cutânea	30
<b>Tabela 3</b>	Citotoxicidade da fisalina F sob macrófagos humanos, atividade antileishmania frente às formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B (do inglês <i>Amphotericin B</i> )
APC	Células apresentadoras de antígenos (do inglês <i>Antigen-presenting cells</i> )
ARG	Arginase
CC <sub>50</sub>	Concentração letal para 50% da população de macrófagos
CD	Nomenclatura sistematizada de moléculas (do inglês <i>Cluster of Differentiation</i> )
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CTRL	Controle negativo
DEXA	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
FDA	(do inglês <i>Food and Drug Administration</i> )
FIS F	Fisalina F
GP63	Glicoproteína 63
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória para 50% da população de parasitos
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida (do inglês <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i> )
IS	Índice de seletividade
LPG	Lipofosfoglicano (do inglês <i>Lipophosphoglycan</i> )
LPS	Lipopolissacarídeo
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos (do inglês <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> )
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
ND	Não determinado
NK	Células “natural killer” (do inglês <i>Natural Killer cells</i> )
NO	Óxido nítrico (do inglês <i>Nitric oxide</i> )
NS	Não significativo
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> )

PPG	Proteofosfoglicano
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i> )
Sb <sup>5+</sup>	Antimoniais pentavalentes
SBF	Soro bovino fetal
TDR	Redutase dependente de tiol
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta (do inglês <i>Transforming Growth Factor B</i> )
Th1	Linfócitos T auxiliares do tipo 1 (do inglês <i>T helper-1</i> )
Th2	Linfócitos T auxiliares do tipo 2 (do inglês <i>T helper-2</i> )
Th17	Linfócitos T auxiliares do tipo 17 (do inglês <i>T helper-17</i> )
TNF-α	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>Tumoral Necrosis Factor</i> )
Treg	Linfócitos T regulatórios (do inglês <i>Regulatory T cell</i> )

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	17
1.1 IMUNOMODULAÇÃO	17
1.2 LEISHMANIOSES	19
1.2.1 Aspectos gerais das leishmanioses	19
1.2.2 Imunopatogênese da leishmaniose cutânea	24
1.2.3 Tratamento	26
1.3 PRODUTOS NATURAIS	30
1.3.1 Fisalinas	31
<b>2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b>	35
<b>3 OBJETIVOS</b>	36
3.1 GERAL	36
3.2 ESPECÍFICOS	36
<b>4 METODOLOGIA</b>	37
4.1 OBTENÇÃO DA FISALINA F	37
4.2 CULTIVO DE PROMASTIGOTAS	37
4.3 ISOLAMENTO DE PBMC	37
4.4 SEPARAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS	38
4.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	38
4.6 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS	38
4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DA FISALINA F EM MACRÓFAGOS HUMANOS	39
4.8 ENSAIO DE VIABILIDADE DE PROMASTIGOTAS	40
4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DA FISALINA F EM MACRÓFAGOS HUMANOS	40
4.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E VARREDURA	40
4.11 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MORTE CELULAR EM <i>L. braziliensis</i>	41
4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
<b>5 RESULTADOS</b>	43
5.1 EFEITO IMUNOMODULADOR DA FISALINA F	43
5.2 CITOTOXICIDADE DA FISALINA F	44

5.3 ATIVIDADE DA FISALINA F EM PROMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i>	45
5.4 ATIVIDADE DA FISALINA F EM MACRÓFAGOS HUMANOS INFECTADOS POR <i>L. braziliensis</i>	46
5.5 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DE PROMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i> TRATADOS COM FISALINA F	46
5.6 PADRÃO DE MORTE CELULAR EM PROMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i> APÓS O TRATAMENTO COM FISALINA F	48
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>53</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>64</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 IMUNOMODULAÇÃO

O sistema imunológico (SI) configura-se em uma rede de defesa composta por órgãos, células e moléculas responsáveis pela manutenção da homeostase do corpo e pela proteção contra agentes invasores (CRUVINEL et al., 2010). Mecanismos que permitem o reconhecimento de estruturas microbianas, tóxicas ou alergênicas dividem este sistema em duas categorias gerais: a imunidade inata e a imunidade adaptativa. A imunidade inata consiste na linha de defesa primária do organismo e caracteriza-se por uma resposta rápida, através do reconhecimento de padrões moleculares compartilhados por muitos patógenos, ou associados ao dano celular. Consequentemente ativam vias que promovem as funções antimicrobianas e pró-inflamatórias das células nas quais expressam estes padrões moleculares (ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S., 2015). A imunidade adaptativa, por sua vez, consiste em uma linha de resposta específica, codificada por elementos gênicos que se rearranjam para montar moléculas de ligação a antígenos particulares na superfície das células efectoras. A resposta adaptativa também gera a memória imunológica, permitindo uma resposta mais eficaz do hospedeiro após o encontro inicial de sensibilização. Temporalmente, a resposta adaptativa se expressa após a resposta inata na defesa do hospedeiro, mas ambas podem atuar em conjunto no organismo (CHAPLIN, 2010; CRUVINEL et al., 2010; MARSHALL et al., 2010; SUN et al., 2020).

A principal função do SI do organismo é proteger, eliminar e neutralizar toxinas, agentes invasores, células cancerosas e reparar tecidos (NICHOLSON, 2016). Para realizar tais funções, o SI desenvolve mecanismos pró e anti-inflamatórios, além de controlar a intensidade e o tempo de duração de resposta, uma vez que o excesso ou a falta da mesma pode culminar no estabelecimento de diversas doenças (SHER, 2002; UMETSU; DEKRUYFF, 2006; CRUVINEL et al., 2010; WU et al., 2014; WANG; WANG; GERSHWIN, 2015; GURCAY; AKINCI, 2017; CHEN et al., 2018). Nas doenças autoimunes, por exemplo, os anticorpos e as células T reagem a autoantígenos resultando em colapso na tolerância imunológica, inflamação crônica e destruição tecidual (MCGONAGLE; MCDERMOTT, 2006; WANG; WANG; GERSHWIN, 2015).

Algumas doenças parasitárias também podem ser resultado de distúrbios imunológicos. Dentre elas, a leishmaniose, a malária, a doença de Chagas e a esquistossomose se destacam (ARAÚJO; FERREIRA, 2014; HOTEZ, 2018; PISARK, 2019). Diante a estes

patógenos, o hospedeiro desenvolve respostas imunológicas direcionadas por uma diversidade de células e moléculas solúveis (CHAPLIN, 2010). Os leucócitos, mais popularmente conhecidos como glóbulos brancos, são as células centrais no combate ao parasito. Estas células são classificadas de acordo com as suas características, podendo ser polimorfonucleares e mononucleares. Os leucócitos mononucleares configuram-se de linfócitos e os monócitos sanguíneos (constituem 3% a 8 % dos leucócitos circulantes) (CRUVINEL et al., 2010).

Os monócitos são células que se desenvolvem na medula óssea, atingem a corrente sanguínea onde circulam por alguns dias e, por fim, deslocam-se para o tecido conjuntivo ou parênquima de órgãos onde se diferenciam em macrófagos (BARARDI et al., 2010). Os macrófagos, por sua vez, são células hematopoiéticas fagocíticas, multifuncionais do SI inato, que desempenham um papel extremamente relevante na manutenção da homeostase dos tecidos, atuam em processos inflamatórios associados às doenças, e na secreção de uma vasta quantidade de citocinas, a depender da resposta imunológica envolvida (YANG; MING, 2014). Estas células são ativadas por IFN- $\gamma$ , LPS, IL-4 e outros fatores. Além disso, os macrófagos fazem parte do grupo das células apresentadoras de antígenos profissionais (APC), as quais participam da resposta imune inata e condiciona a resposta adaptativa (ELOMAA et al., 1998; MURRAY et al., 2015).

Os monócitos e macrófagos podem ter as suas funções efetoras amplificadas pela presença de fatores de crescimento, tais como o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e o fator estimulador de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (HAMILTON, 2008; SOLINAS et al., 2009). O M-CSF, mais especificamente, é um fator de crescimento hematopoiético que regula a proliferação, a diferenciação e a ativação funcional de monócitos. Normalmente detectado no soro humano, o M-CSF é expresso em condições homeostáticas e produzido por diversos tipos de células, incluindo os fibroblastos, células endoteliais, células estromais, macrófagos, células do músculo liso e osteoblastos (HAMILTON, 2008).

Além das características acima, os macrófagos também possuem potencial de plasticidade, levando à polarização ou perfis distintos, os quais são influenciados por citocinas e por produtos microbianos (SOLINAS et al., 2009). Estas células podem ser ativadas por duas vias, a via clássica e a via alternativa, as quais resultam em macrófagos com funções distintas (GEISSMANN et al., 2010; NEVES, 2015). Um perfil pró-inflamatório M1 citotóxico (clássico) é estimulado por linfócitos T “auxiliares” do tipo 1 (Th1) e células NK, as quais secretam interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Este perfil clássico tem como objetivo a

eliminação de parasitos intracelulares e o combate do desenvolvimento tumoral (YANG; MING, 2014; DING et al., 2019). O perfil anti-inflamatório M2 (alternativo), por outro lado, é caracterizado por macrófagos responsáveis pela resolução de processos inflamatórios. Estas células são ativadas pelas citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-23 produzidas por linfócitos T “auxiliadores” do tipo 2 (Th2), as quais aumentam a expressão da enzima arginase 1 (ARG-1) e induzem a produção da IL-10 e do fator transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ). Este fenótipo também está associado à angiogênese, a alergia e a progressão tumoral (SICA; MANTOVANI, 2012; YANG; MING, 2014; DING et al., 2019).

## 1.2 LEISHMANIOSES

### 1.2.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, os quais são transmitidos pela picada de flebótomos fêmeas durante o seu repasto sanguíneo em mamíferos (DUBIE; MOHAMMED, 2020; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). As manifestações clínicas desta doença dependem da espécie do parasito, da resposta imunológica do hospedeiro e do tipo leishmaniose, o qual pode ser cutânea ou visceral (Tabela 1) (MURRAY et al., 2005; DUBIE; MOHAMMED, 2020; SANTOS; DE OLIVEIRA, 2020). Além disso, diversas espécies do inseto vetor do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo) são responsáveis por transmitir a leishmaniose (ABDELADHIM; KAMHAWI; VALENZUELA, 2014).

**Tabela 1** - Espécies de *Leishmania* spp., manifestações clínicas, distribuição geográfica e vetores.

<b>Espécies</b>	<b>Manifestações clínicas</b>	<b>Distribuição geográfica</b>	<b>Vetores</b>
<i>Leishmania aethiopica</i>	Leishmaniose cutânea localizada; Leishmaniose cutânea difusa.	Etiópia, Quênia.	<i>Phlebotomus pedifer</i>
<i>Leishmania major</i>	Leishmaniose cutânea localizada.	África do Norte, Oriente Médio, África Subsaariana, e Cinturão do Sahel, Sudão, Paquistão.	<i>Phlebotomus papatasi</i> ; <i>Phlebotomus duboscqi</i>
<i>Leishmania mexicana</i>	Leishmaniose cutânea localizada.	América Central.	<i>Lutzomyia olmeca</i>
<i>Leishmania amazonensis</i>	Leishmaniose cutânea localizada; Leishmaniose cutânea disseminada (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).	América do Sul, norte da Amazônia.	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>
<i>Leishmania braziliensis</i>	Leishmaniose cutânea localizada; Leishmaniose cutânea disseminada (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017); Leishmaniose mucocutânea.	América do Sul, América Central e México.	<i>Lutzomyia</i> spp.
<i>Leishmania peruviana</i>	Leishmaniose cutânea localizada.	Andes ocidentais do Peru, planaltos argentinos.	<i>Lutzomyia verrucarun</i> ; <i>Lutzomyia pymeni</i>
<i>Leishmania infantum</i>	Leishmaniose visceral; Leishmaniose cutânea localizada.	Oriente Médio e Ásia Central ao Paquistão, China, América Central e do Sul, Sul da Europa, noroeste da África.	<i>P. perniciosufi</i> ; <i>P. arius</i>
<i>Leishmania donovani</i>	Leishmaniose visceral.	Etiópia, Sudão, Quênia, Índia, China, Bangladesh.	<i>Phlebotomus argentipes</i> ; <i>Phlebotomus orientalis</i>

**Fonte:** Adaptado de Dubie e Mohammed (2020).

As leishmanioses atingem regiões tropicais e subtropicais, e em populações com baixo nível socioeconômico. Estima-se que 350 milhões de pessoas estão em risco de contrair a infecção, sendo endêmica em 98 países de cinco continentes. Dos 98 países, 71 são endêmicos tanto para leishmaniose visceral quanto cutânea, 8 países são endêmicos apenas para leishmaniose visceral e 19 países são endêmicos para a forma cutânea da doença (WHO, 2020). Deste modo, as leishmanioses estão em segundo lugar em mortalidade e quarto em morbidade entre todas as doenças tropicais negligenciadas do mundo (MATHERS; EZZATI; LOPEZ, 2007).

A maioria dos casos de leishmaniose visceral ocorrem na Índia, Bangladesh, Sudão, Sul do Sudão, Brasil e Etiópia (ALVAR et al., 2012). O aumento dos números de casos da doença, no Brasil, se dá pelo aumento e desestruturação na urbanização, ocupações de terras desordenadas e condições de vida precárias. Na década dos anos 90, por exemplo, aproximadamente 90% dos casos da forma visceral da doença foram notificados no nordeste do Brasil. Assim, com a disseminação da doença para outros estados, os números de casos aumentaram em mais regiões e revelou uma diminuição na região do nordeste (DOS REIS et al., 2017).

As espécies responsáveis pela leishmaniose visceral são *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (SALAM; AL-SHAQHA; AZZI, 2014). A forma visceral é a manifestação mais grave da doença, podendo apresentar um período de incubação de 2 a 6 meses, a depender do comprometimento do SI do paciente (WHO, 2020; SCORZA et al., 2017). Este tipo de leishmaniose ocorre quando o parasito se desloca do sítio de infecção na pele para órgãos internos como o fígado, baço e medula óssea. Apesar desta dinâmica, a leishmaniose visceral pode ser assintomática, ou também apresentar sinais e sintomas como febre, perda de peso, anemia, trombocitopenia, neutropenia, hiperglobulinemia, hepatoesplenomegalia e palidez das membranas mucosas (REITHINGER et al., 2007; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

Em 2020 foi reportado mais de 5 mil casos de leishmaniose cutânea em sete países: Afeganistão, Algeria, Brasil, Colombia, Iraque, Paquistão e República Árabe da Síria. Estes países respondem por 80% da incidência global de leishmaniose cutânea (WHO, 2020). Essa média crescente de casos está atribuída a mudanças ambientais, desmatamento, migração massiva da população de áreas rurais para urbanas, surgimento de atividades econômicas no campo, favorecendo a disseminação do vetor (BRASIL, 2019).

O número de casos reportados de leishmaniose cutânea no Brasil em 2020 é maior ou igual a cinco mil, o que representa 80% dos casos globais (RUIZ-POSTIGO et al., 2021). Na

região nordeste do Brasil, há uma alta incidência e expansão do alcance geográfico de leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis*. Este parasito causa um aumento anual da doença no país sendo endêmica em algumas regiões. Existem 39% de casos reportados nos estados do Maranhão, Bahia e Ceará (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; LACERDA, 1994; OLIVEIRA et al., 2004; LEWNARD et al., 2014).

A leishmaniose cutânea pode ser classificada como cutânea localizada, mucocutânea, difusa e disseminada. Diversas espécies como a *L. major*, *L. mexicana*, *L. aethiopica*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. peruviana* e *L. amazonensis* podem causar a leishmaniose cutânea (SALAM; AL-SHAQHA; AZZI, 2014).

Dentre os aspectos clínicos, a leishmaniose cutânea localizada é caracterizada por apresentar úlceras indolores com bordas bem delimitadas e elevadas, podendo medir de 5 a 10 cm de diâmetro. Em biópsias da borda da úlcera, é observada baixa carga parasitária (BAILEY; LOCKWOOD, 2007; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017; FATA et al., 2019). Na leishmaniose mucocutânea, há uma inflamação destrutiva nas membranas das mucosas como boca, nariz e faringe. Nos exames histopatológicos, são raros parasitos na forma amastigota encontrados nas biópsias (BAILEY; LOCKWOOD, 2007; REITHINGER et al., 2007; WHO, 2010; DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). A forma cutânea difusa da doença é caracterizada por múltiplos nódulos não ulcerativos e indolores, em toda superfície cutânea preferencialmente no rosto, orelha, cotovelos e joelhos (CONVIT, 1957; HANDLER et al., 2015). Trinta por cento dos casos eventualmente também desenvolvem invasão dos parasitos na região da nasofaringe e mucosa oral (ORDAZ-FARIAS et al., 2013). Nos aspectos histopatológicos, não há formação de granuloma e apresenta numerosos parasitos na forma amastigota (DA ROCHA; CAMPOS, 2006). A forma disseminada da doença é caracterizada por lesões pleomórficas como papulares, actineiformes, nodular e tipos ulcerados, mais comumente encontrado em membranas mucosas. Podem ser observados poucos parasitos nas lesões, moderada hiperqueratose e granuloma formado por células com largos vacúolos nas biópsias (CONVIT, 1957; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). As diferentes manifestações clínicas da leishmaniose cutânea, permite que o período de incubação da doença varie entre 2 semanas a 6 meses (WHO, 2020).

O ciclo biológico da leishmania é digenético, alternando entre hospedeiros mamíferos e o inseto vetor (KILLICK-KENDRICK, 1999). As promastigotas procíclicas, a forma não infectiva do parasito, é encontrada no intestino médio dos flebótomos. Esta forma apresenta uma motilidade debilitada devido ao flagelo curto, porém possui uma alta capacidade de se

replicar através da divisão binária. Ao migrar para a faringe do hospedeiro invertebrado, os parasitos passam por um processo de metaciclologênese e são transformados em promastigotas metacíclicas, sua forma infectiva. Essas promastigotas não se replicam, apresentam uma forma mais alongada, e alta motilidade (MATLASHEWSKI, 2001; BATES, 2007; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

O inseto vetor infectado inocula as formas promastigotas metacíclicas através do repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados (HANDMAN; BULLEN, 2002). Esses parasitos são reconhecidos por macrófagos através de moléculas de superfície como o lipofosfoglicano (LPG), glicoproteína 63 (GP63) e proteofosfoglicano (PPG) (KANE; MOSSER, 2000; FOTH et al., 2002; AOKI et al., 2019). Após o reconhecimento, os parasitos são fagocitados e internalizados em fagolisossomos dos macrófagos que, após esse evento, é denominado de vacúolo parasitóforo. Em seguida, as formas promastigotas metacíclicas diferenciam em amastigotas que é a forma do parasito que não apresenta flagelo (KANE; MOSSER, 2000).

A fusão das formas amastigotas nos compartimentos endocíticos permite que os parasitos adquiram propriedades fagolisossomais como glicoproteínas lisossomais e endossomais na sua membrana e a presença de hidrolases ácidas. Deste modo, as amastigotas são resistentes à desnaturação mediada por lisossomos e enzimas. Os vacúolos parasitóforos podem realizar uma fusão de moléculas internalizadas pela célula hospedeira com compartimentos endocíticos tardios em longo tempo, fornecendo um meio de nutrição aos parasitos (ALEXANDER; VICKERMANT, 1975; COURRET et al., 2002). As formas amastigotas possuem uma alta capacidade de se replicar em meio ácido do fagolisossomo, promovendo alise do macrófago e, conseqüente, a liberação de parasitos para a infecção de células adjacentes, sendo responsável pela manutenção da infecção em mamíferos (KANE; MOSSER, 2000; LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVAEZ, 2020). Nesse contexto, essa forma do parasito possui uma relevância clínica significativa relacionado à gravidade da doença, por gerar manifestações clínicas diferentes que varia entre infecções cutâneas, mucocutâneas, desfiguração grave e a doença visceral letal. Diante disso, as amastigotas são alvos terapêuticos para estudos de fármacos com atividade antileishmania (MCCONVILLE et al., 2007).

### 1.2.2 Imunopatogênese da leishmaniose cutânea

As manifestações clínicas causadas pela leishmania dependem da espécie e da resposta imune do hospedeiro, de fundamental importância na evolução da doença (GABRIEL et al., 2019). A primeira resposta às formas promastigotas metacíclicas da leishmania no hospedeiro é a produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação das três vias do sistema complemento: clássica, alternativa e da lectina, dando início à resposta imune inata. Porém, o parasito utiliza mecanismos para driblar o sistema complemento, inativando essas vias (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016; GABRIEL et al., 2019). O progresso para a resposta imune adaptativa começa com o reconhecimento de moléculas de superfície presentes no parasito por células apresentadoras de antígeno profissionais como macrófagos e células dendríticas (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016).

As células hospedeiras infectadas produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), mecanismos fundamentais para o controle da infecção. Além disso, produzem a IL-12 que ativa células NK, as quais produzem TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , induzindo a resposta Th1 em linfócitos TCD4<sup>+</sup>. A produção excessiva dessas citocinas pró-inflamatórias pode levar à forma grave da doença (POLARI et al., 2019; DUBIE; MOHAMMED, 2020). Em pacientes com leishmaniose cutânea e mucocutânea infectados por *Leishmania braziliensis* com níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , há uma resposta imune exacerbada que se expressa em úlceras no sítio de infecção. Há uma relação diretamente proporcional entre o tamanho da lesão com os níveis destas citocinas. Por outro lado, a intensidade do perfil inflamatório dirige à uma resposta contra uma alta carga parasitária, contribuindo para o equilíbrio na homeostase imunológica (ANTONELLI et al., 2005; GIUDICE et al., 2012).

No decorrer do seu processo de ativação, as células T CD4<sup>+</sup> sofrem polarização, gerando diferentes padrões de células T helper (Th), as quais possuem funções efetoras distintas que norteiam o perfil das respostas imunológicas. De um modo geral, Th1 é um padrão importante na resposta imunológica frente à vírus, bactérias e parasitos através da produção de interleucinas, tais como IL-2 e IFN- $\gamma$ . Na leishmaniose cutânea e mucocutânea, no entanto, a produção de citocinas pró-inflamatórias não é suficiente para a redução de parasitos no organismo e, conseqüentemente, associa-se ao aumento da lesão tecidual e gravidade da doença (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998; BACELLAR et al., 2002). A diminuição da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 e o aumento de IL-17, que inclui no arsenal de citocinas que induzem a inflamação, também estão relacionados à patogênese da doença e às lesões mucocutâneas (BOAVENTURA et al., 2010). Neste contexto de resposta



inflamatória exacerbada e diminuição da atividade regulatória, ocorre um estímulo à destruição dos tecidos, evidenciando a importância da imunoregulação na leishmaniose mucocutânea (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

A resposta Th2, por sua vez, atua especialmente contra parasitos extracelulares em função da produção de IL-4, IL-5 e IL-6 e de altos níveis de anticorpos (DEGASPERI et al., 2018). A persistência e replicação do parasito nos macrófagos estão envolvidas com a ativação da resposta Th2, levando à produção de citocinas anti-inflamatórias (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). A citocina IL-4, por exemplo, foi indicado por alguns estudos como um fator determinante das respostas do Th2 e suscetibilidade à doença (GUIMARÃES et al., 2006). A citocina IL-10 é secretada também por macrófagos e atua na resposta Th2 como um potente inibidor da resposta Th1, regulando a imunopatologia e lesão tecidual causada pela resposta Th1 em excesso (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016; MIRAMIN-MOHAMMADI et al., 2020).

Em contrapartida, a IL-10 pode facilitar a disseminação e persistência da leishmania, limitando a capacidade dos macrófagos de eliminar parasitos e/ou organismos intracelulares (SCHWARZ et al., 2013). Mesmo que a característica da resposta da forma mucocutânea da doença seja a redução da IL-10, o TGF- $\beta$ , que também é uma citocina de perfil anti-inflamatório, atua frente a este tipo de leishmaniose. Desse modo, a expressão de TGF- $\beta$  regula a resposta da leishmaniose mucocutânea, logo, em sua falta, pode-se acarretar uma alta prejudicial nos níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Todo este processo representa um mecanismo importante para a resposta imunológica desregulada, levando a forma grave da doença, a qual consiste na desfiguração do indivíduo infectado acompanhado de uma extensa destruição tecidual (BACELLAR et al., 2002).

Já a resposta Th17 está envolvida na produção de citocinas pró-inflamatórias e células T regulatórias (Treg), que produzem citocinas imunossupressoras regulatórias como IL-10 e TGF- $\beta$ , e contribuem para a progressão da doença (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). Os mediadores pró-inflamatórios IL-1 $\beta$ , IL-6 e TGF- $\beta$  são também produzidas por macrófagos e estimulam a diferenciação das células Th17, podendo gerar uma resposta Th17 autoimune (CHUNG et al., 2009). Células Th17 produzem IL-17 que induzem o recrutamento de neutrófilos, contribuindo para a lesão tecidual. Um estudo desenvolvido por Boaventura e colaboradores (2010), mostrou que a expressão de IL-17 e TGF- $\beta$  é maior em pacientes infectados por *Leishmania braziliensis* com lesões na mucosa em comparação à pacientes infectados sem apresentar lesão. Além disso, as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 e TGF- $\beta$  foram encontradas no infiltrado inflamatório, contribuindo na patogênese.

### 1.2.3 Tratamento

As terapias contra as leishmanioses variam de acordo com o tipo da doença, e, em alguns cenários onde a identificação da espécie não é disponível, o tratamento é feito de acordo com a experiência local (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). Os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{5+}$ ), incluindo o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam®), são utilizados desde a década de 1920 como a primeira linha de tratamento contra as leishmanioses (KARAMIAN et al., 2015; PONTE-SUCRE et al., 2017). No Brasil, só existe comercialização da formulação do antimoniato de meglumina (BRASIL, 2017). Em pacientes com a doença, são administradas 20 mg  $Sb^{5+}$ /kg por cerca de 20-30 dias, por via endovenosa ou intramuscular. Em alguns casos de leishmaniose cutânea, o medicamento pode ser injetado diretamente na lesão (BAILEY; LOCKWOOD, 2007; KARAMIAN et al., 2015). Os  $Sb^{5+}$  apresentam maior atividade contra as formas amastigotas da leishmania, por expressarem uma enzima denominada TDR1, a qual ativa a molécula reduzindo-a em  $Sb^{3+}$ . Apesar do efeito leishmanicida, os  $Sb^{5+}$  são potencialmente arritmogênicos, além de apresentar altas taxas de toxicidade cardíaca, renal, hepática e pancreática (DA ROCHA; CAMPOS, 2006). São contraindicados para gestantes, por atravessar a barreira transplacentária e por apresentar teratogenicidade em estudos experimentais com ratos. Além disso, os  $Sb^{5+}$  não são recomendados como tratamento de primeira escolha para pessoas acima de 50 anos com cardiopatias, nefropatias, hepatopatias, e hipersensibilidade ao medicamento (BRASIL, 2017). A falha terapêutica dos antimoniais estão relacionados a fatores ligados ao hospedeiro como desnutrição, imunossupressão causada por HIV por exemplo, qualidade da droga, tratamentos incompletos, e também a fatores relacionados à espécie de leishmania, podendo resultar em resistência parasitária (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; LLANOS-CUENTAS et al., 2008).

A anfotericina B (AMB) é o fármaco de segunda escolha no tratamento das leishmanioses. A AMB foi descoberta em meados de 1960 em cultura de bactéria *Streptomyces nodosus* e é um potente antibiótico da classe dos polienos contra fungos e bactérias (CEREGHETTI; CARREIRA, 2006; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). A AMB pode se apresentar nas formas de desoxicolato ou lipossomal encapsulada. As doses são ministradas a depender do tipo de manifestação clínica da doença, variando de 1-4 mg/kg/dia (AMB lipossomal) e 1mg/kg/dia (desoxicolato de AMB), ambos por via endovenosa (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; MOSIMANN et al., 2018; BRASIL, 2019; MATOS et al.,

2020). O pós-tratamento também deve ser monitorado para evitar possíveis recidivas (BRASIL, 2015). Seu mecanismo de ação está relacionado à alteração da permeabilidade celular, se ligando no ergosterol da membrana plasmática do parasito, formando poros e permitindo a liberação de íons de potássio, o que pode ocasionar a morte de promastigotas e amastigotas *in vitro* (BOLARD; JOLY; YENI, 1993; BERN et al., 2006; BRASIL, 2017). A AMB é uma droga com um custo elevado e possui efeitos adversos como insuficiência renal, anormalidades eletrolíticas como hipocalcemia, febre, anemia, tremores, taquicardia, náusea, hipotensão e alteração no comportamento (SUNDAR et al., 2004; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; BRASIL, 2017). A forma lipossomal da droga apresenta efeitos similares com a forma de desoxicolato, mas possui menos efeitos tóxicos e o tempo de tratamento pode ser reduzido (AMATO et al., 2011). A formulação lipídica da AMB possui eficácia nos tratamentos contra a leishmaniose visceral no Brasil, em alguns países da Ásia e Europa (BERN et al., 2006). O uso da droga para leishmaniose cutânea é baseado no tratamento já utilizado em leishmaniose visceral. A AMB é indicada como primeira escolha em pacientes com leishmaniose cutânea com idade acima de 50 anos ou gestantes, insuficiência renal, cardíaca, hepática, transplantados renais e com quadro grave com um número de 20 lesões ou mais. Em pacientes imunossuprimidos ou coinfectados com o vírus HIV, é recomendado a formulação de desoxicolato como primeira escolha (BRASIL, 2017).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é uma droga de formulação oral utilizada como terceira escolha para o tratamento das leishmanioses. Foi sintetizada por um grupo do Reino Unido que buscava análogos de agregação de plaquetas para atividade anti-inflamatória, e da Alemanha que pesquisava moléculas antitumorais. A molécula é um fosfolípido sintético pertencente à classe das aquilfosfocolinas, e, por sua similaridade a lecitina, pode interferir na funcionalidade da membrana plasmática das células (VERWEIJ et al., 1993; PACHIONI et al., 2013). Em 2002, a miltefosina foi aprovada para aplicação oral em alguns países para o tratamento de leishmaniose cutânea e visceral. Na Índia e Etiópia, as doses utilizadas para leishmaniose visceral variam de 2,5 a 150 mg/kg/dia, a depender do peso e idade, por 28 dias. O tratamento para leishmaniose cutânea é realizado pelo mesmo período de tempo, com 2mg/kg/dia, apresentando 70-90% de eficácia contra *L. panamensis*, mas para *L. braziliensis* e *L. mexicana*, há uma limitação na eficácia da droga. Na Bolívia, para o tratamento de leishmaniose mucocutânea causada por *L. braziliensis*, o tratamento é de 2,5- 3,3 mg/kg/dia por 4 semanas (WHO, 2010). A miltefosina, por ser de aplicação oral, está associada a toxicidade gastrointestinal severa, resultando em náusea, anorexia, vômito e diarreia (VERWEIJ et al., 1993; CRUL et al., 2002). Além disso, é uma droga contraindicada para

gestantes pelo seu potencial teratogênico (WHO, 2010). Dentre suas limitações está o alto custo e longa duração do tratamento, podendo levar ao surgimento de cepas resistentes (VÉLEZ et al., 2010).

A pentamidina também faz parte do arsenal de drogas utilizadas no tratamento da leishmaniose cutânea em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano. Pertence à classe das diamidinas aromáticas, que também possui atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* (LOURIE; YORKE, 1939). O mecanismo de ação preciso ainda é desconhecido, mas sabe-se que pentamidina interfere no potencial de membrana da mitocôndria da leishmania e na biossíntese de macromoléculas como DNA, RNA, fosfolipídios e proteínas (BRAY et al., 2003; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; MATOS et al., 2020). O tratamento deve ser monitorado, sendo aplicado por doses endovenosas ou intramuscular em dias alternados, durante 3-5 dias, com 4 mg/kg da droga (HELLIER et al., 2000). Os efeitos adversos com o uso da pentamidina são hipoglicemia, distúrbios nas enzimas do fígado, leucopenia, anemia, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). É contraindicado para gestantes, crianças menores de 1 ano e em casos de intolerância à glicose, insuficiência hepática, hipersensibilidade ao medicamento, pacientes com diabetes *mellitus*, nefropatias e cardiopatias (BRASIL, 2015, 2017).

A pentoxifilina é uma droga que possui efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores. Não é uma droga utilizada como monoterapia para os casos de leishmanioses, comumente é aplicado em associação com os antimoniais pentavalentes, principalmente no tratamento da leishmaniose mucocutânea, atuando como um adjuvante e reduzindo a toxicidade no tratamento com os antimoniais (MOURA et al., 2008; INA, 2021). A atividade imunomoduladora da pentoxifilina auxilia na redução da resposta imune exacerbada contra o parasito, inibindo TNF- $\alpha$  e diminuindo a inflamação tecidual (SANTAREM et al., 2014). É uma droga aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA), utilizada como um vasodilatador, e, para o tratamento coadjuvante contra a leishmaniose cutânea é administrado de forma oral na concentração de 400 mg a cada 8 horas por 30 dias (LESSA et al., 2001; WHO, 2010). Os estudos com a pentoxifilina são escassos e limitados pelos números reduzidos de pacientes tratados com este medicamento, além de apresentar efeitos adversos como distúrbios gastrointestinais, náusea, vômito, diarreia e rubor facial (BRASIL, 2017).

A paromomicina é um antibiótico que pertence à classe dos aminoglicosídeos, com atividade contra bactérias e protozoários. Esta droga inibe a síntese de proteínas e o potencial de membrana da mitocôndria, interferindo na respiração celular. Na década de 1960 foi descrita a sua atividade antileishmania, sendo mais efetivo nos casos contra leishmaniose

cutânea (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2008; GOTO, 2012). O mecanismo de ação da paromomicina envolve a inibição da produção protéica do protozoário ligando-se à subunidade ribossômica 30S. Esse evento, desencadeia o acúmulo de complexos ribossômicos anormais 30S-50S e causa a morte celular. Além disso, alguns estudos relatam a alteração no potencial da membrana mitocondrial com a morte parasitária (CHAWALA, et al., 2011; KIP et al., 2018). A paromomicina é utilizada em tratamentos tópicos para forma cutânea da doença, ou por via intramuscular contra a forma visceral, apresentando baixa toxicidade em células de mamíferos (FERNÁNDEZ; MALCHIODI; ALGRANATI, 2011). Os efeitos adversos desse medicamento incluem a ototoxicidade como lesões nas funções auditivas, irritações na pele, nefrotoxicidade, diarreia, náusea, vômito, dores abdominais, e outros (DAVIDSON; DEN BOER; RITMEIJER, 2009; GOTO, 2012).

Embora a leishmaniose se configure como um problema de saúde pública, os atuais tratamentos utilizados contra esta doença apresentam ainda muitas limitações, tais como alto custo, toxicidade e, em alguns casos, falha terapêutica (ALVAR et al., 2008; PONTE-SUCRE et al., 2017). A falha terapêutica pode estar associada a persistência dos sintomas até o final do tratamento e também recidiva da doença em pacientes que já foram curados anteriormente (RIJAL et al., 2013). Além disso, a depender da concentração utilizada, alguns tratamentos apresentam sérios efeitos adversos, permitindo até o surgimento de algumas doenças (AMATO et al., 2008). Diante dessa problemática, uma necessidade muito evidente de alternativas terapêuticas que ofereçam mais segurança e eficácia e que, para além disso, apresentem vias de administração mais adequadas, a fim de facilitar o nível de adesão ao tratamento e, por consequência, o sucesso. O presente trabalho, portanto, reforça a necessidade de busca por novas opções terapêuticas, as quais podem ser reveladas de uma ou mais classes químicas diferentes das utilizadas atualmente, tornando notável que os estudos de novos protótipos devam ser fortemente apoiados como ferramentas de controle de riscos e agravos à população e à saúde pública.

**Tabela 2** - Tratamentos utilizados para leishmaniose cutânea.

	ANTIMONIAIS PENTAVALENTES	ANFOTERICINA B	MILTEFOSINA	PENTAMIDINA
DOSAGEM E/ OU TEMPO DE TRATAMENTO	20 mg Sb <sup>5+</sup> /kg por 20-30 dias	1-4 mg/kg/dia (lipossomal)  ou 1 mg/kg/dia (desoxicolato de AMB)	2 mg/kg/dia por 4 semanas	4 mg/kg da droga por 3-5 dias
VIA DE ADMINISTRAÇÃO	Endovenosa ou intramuscular	Endovenosa	Oral	Endovenosa ou intramuscular
EFEITOS ADVERSOS	Toxicidade cardíaca, renal, hepática e pancreática	Insuficiência renal, hipocalemia, febre, anemia, tremores, taquicardia, náusea, hipotensão e alteração no comportamento	Toxicidade gastrointestinal grave, resultando em náusea, anorexia, vômito e diarreia	Hipoglicemia, distúrbios nas enzimas do fígado, leucopenia, anemia, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade

**Fonte:** Elaboração da autora

### 1.3. PRODUTOS NATURAIS

As plantas medicinais e os seus metabólitos secundários desempenham um papel importante no tratamento de enfermidades desde 2600 a.C., com as primeiras descrições na Mesopotâmia, Egito (CRAGG; NEWMAN, 2013). Nesses primeiros registros, óleos derivados de cedro e *Cupressus sempervirens* (cipreste), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), espécies de *Commiphora* (mirra) e *Papaver somniferum* (suco de papoula), que ainda são utilizados para tratamento de tosses, resfriados, infecções parasitárias e inflamação, foram documentadas. Dentre as grandes civilizações que utilizam produtos naturais, a medicina tradicional chinesa também se destaca na realização dessas práticas desde 1100 a.C. (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Ao longo das últimas décadas, o uso de plantas medicinais tornou-se mais sofisticado à medida que estudiosos utilizaram compostos isolados de vegetais para o desenvolvimento de compostos menos tóxicos e com grande potencial no combate a doenças resistentes a medicamentos convencionais (BIAPA et al., 2007; ZULKIPLI et al., 2015). Essa

potencialidade está associada à diversidade estrutural única e característica das plantas medicinais, com a presença de flavonoides, terpenos, alcaloides, cumarinas etc. (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; VALLI; BOLZANI, 2019).

As substâncias produzidas naturalmente pelas plantas promovem diversas funções que oferecem à população inúmeras alternativas de tratamentos e pesquisas para o avanço da medicina, tais como atividade antibiótica, fungicida, antiparasitária, antitumoral, antipirética, anti-agentes virais, anti-hipertensivo, permitindo também o auxílio no controle de diabetes do tipo 2, e outros (CRAGG; NEWMAN, 2005, 2013). Em 1820, farmacêuticos franceses isolaram um composto com atividade antimalárica, denominado quinina, o qual foi muito utilizado nos grupos indígenas na Amazônia para o tratamento de febre (CRAGG; NEWMAN, 2013). Além destes, alguns outros compostos, como a reserpina (um anti-hipertensivo utilizado para o tratamento de picadas de cobra) e a efedrina (derivada da planta *Ephedrasinica* é muito utilizada como um agente anti-asma), foram desenvolvidos (DEV, 1999; CRAGG; NEWMAN, 2013). Mais tarde, em 1955, a missão do Instituto de Câncer Nacional dos Estados Unidos (NCI) revelou o forte potencial das plantas para o tratamento do câncer, através de agentes quimioterápicos (CRAGG et al., 1994). Por fim, o custo desses compostos é mais acessível em relação à terapia medicinal moderna, tornando-os, portanto, ainda mais atrativos (BIAPA et al., 2007; SHARMA et al., 2015).

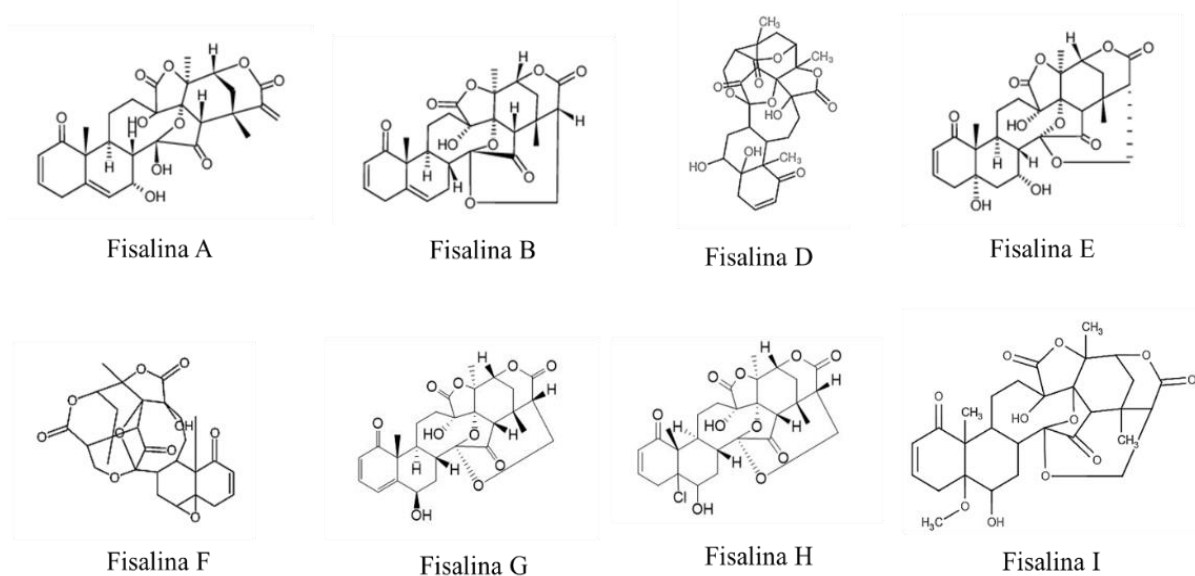
O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo. A extensa área do bioma é distribuída em seis territórios: floresta amazônica, caatinga, cerrado (savana), floresta Atlântica, pantanal e pampas, além de uma longa costa litorânea com variados ecossistemas marinhos. Diante dessa vasta biodiversidade, o Brasil tem potencial para explorar quimicamente e biologicamente os produtos naturais e desenvolver novos compostos, podendo contribuir para uma fonte de economia ativa, sustentável, e para preservação ambiental (VALLI; BOLZANI, 2019). A utilização adequada desses recursos e ferramentas na bioprospecção certamente ajudará na descoberta de novas moléculas provenientes de plantas, empregando técnicas modernas de descoberta de drogas e os esforços coordenados de várias áreas.

### 1.3.1 Fisalinas

As plantas herbáceas anuais do gênero *Physalis spp.* são angiospermas pertencentes à família Solanaceae, a qual compreende 120 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Pertencem à classe dos vitalinóides, são esteroides do tipo

ergostano com modificações tipo 16-24-ciclo-13-14-seco, que apresentam propriedades profiláticas e terapêuticas. Na medicina popular, são utilizadas como analgésicos, no tratamento de reumatismo, em dores abdominais e em casos de desconfortos na garganta (DA SILVA LIMA et al., 2014; SHARMA et al., 2015). As fisalinas são extraídas da folha ou da casca do caule da planta (TOMASSINI; SOARES; FERNANDEZ-FERREIRA., 2002; SUN et al., 2017). A primeira a ser isolada foi a fisalina A, em 1969, a partir da *Physalis alkekengi* var. *franchetii*, introduzindo as pesquisas na composição estrutural das fisalinas e na sua atividade biológica (MATSUURA et al., 1969; SUN et al., 2017).

A *Physalis angulata* L. é uma erva encontrada em algumas regiões da África, Ásia e nas Américas (VIECELI et al., 2021). É popularmente conhecida como “camapu”, muito utilizada pelo povo indígena na Amazônia, por suas frutas comestíveis e propriedades terapêuticas (BALBANI; SILVA; MONTOVANI, 2009). Os extratos e infusões desta planta têm sido tradicionalmente utilizado em diversos países para o tratamento de algumas doenças como malária, asma, dermatites, antidiurético, analgésico, antirreumático e problemas estomacais (DOS SANTOS et al., 2008; SHARMA et al., 2015). Diversas investigações fitoquímicas desta planta também já foram realizadas e vitanolídeos e fisalinas tais como a fisalina A, B, D, E, F, G, H e I foram isoladas (Figura 1).



**Figura 1** - Estrutura molecular das fialinas.  
**Fonte:** elaboração da autora

As fialinas são moléculas capazes de atuar em diversos alvos celulares e mecanismos



de ação. Apresentam atividades antitumoral, antinociceptiva, imunomoduladora, antibiótica e antiparasitária (TOMASSINI; SOARES; FERNANDEZ-FERREIRA., 2002; SUN et al., 2017). As fisalinas também podem interagir na resolução da inflamação, desempenhando uma potente atividade imunossupressora e anti-inflamatória (PINTO et al., 2010; YU et al., 2010; DING et al., 2019). A fisalina D, por exemplo, mostra-se promissora em seu papel imunomodulador. Esta fisalina aumenta a expressão de ARGINASE-1 e promove a polarização de macrófagos M2 imunossupressores. A fisalina D também estimula a diminuição de níveis de iNOS, um dos principais marcadores de macrófagos M1, inibindo a polarização destes macrófagos pró-inflamatórios (DING et al., 2019).

Em 2003, Soares e cols. demonstraram que as fisalinas B, F e G possuem uma potente atividade imunossupressora em macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c. Os autores demonstraram uma redução da produção de óxido nítrico (NO) e das citocinas IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  sob estímulo de LPS e IFN- $\gamma$ . Além disso, no modelo murino de choque endotóxico, as fisalinas inibiram a produção TNF- $\alpha$  induzido por LPS, protegendo contra a sepse induzida (SOARES et al., 2003). Além disso, estudo mostra que as fisalinas B e F reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, através da inibição da ativação do fator de transcrição nuclear, o NF $\kappa$ B, o qual está envolvido na regulação de genes pró-inflamatórios (JACOBO-HERRERA et al., 2006).

No modelo murino de transplante alogênico, camundongos tratados com fisalinas B, F e G reduziram a inflamação e a fibrose, inibindo a rejeição do enxerto (SOARES et al., 2006). Em outro modelo murino, o de artrite induzida por colágeno, a fisalina F reduziu o edema da pata e a inflamação nas articulações quando comparado com o controle negativo tratado com salina (BRUSTOLIM et al., 2010). Além disso, a fisalina F aumenta a porcentagem de células apoptóticas de indivíduos HAM/TSP, inibindo a linfoproliferação de PBMC desses pacientes (PINTO et al., 2016). Estes dados corroboram com a importância da ação anti-inflamatória destes compostos.

Além de seu potente efeito imunomodulador, a atividade antiparasitária da fisalina F mostra-se bastante promissora. Estudo antimalárico *in vitro* mostra que a fisalina F apresentou a menor concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) contra o *Plasmodium falciparum* (SÁ et al., 2011). A fisalina F também é efetiva contra todas as formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. Ensaios *in vitro* de infecção de macrófagos da linhagem J774 por *L. major* e tratamento com as fisalinas B e F apontam uma redução significativa no número de amastigotas, assim como no grupo tratado com a Anfotericina B®. Neste mesmo estudo, o tratamento tópico com fisalina F reduziu o tamanho da lesão e a carga parasitária em modelo

murino leishmaniose cutânea causada por *L. amazonensis* (GUIMARÃES et al., 2009).

A atividade da fisalina B, D, F e G contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. major* também foi investigada em cultura axênica. Dentre as fisalinas testadas, a fisalina F apresentou a melhor atividade contra promastigotas de *L. amazonensis* e *L. major*, inibindo 100% dos parasitos mesmo na menor concentração utilizada no ensaio (GUIMARÃES et al., 2010). Em suma, estes resultados demonstram a atividade promissora da fisalina F contra leishmania, tanto em ensaios de infecção de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos ou em macrófagos de linhagem, como em modelo murino de leishmaniose cutânea. Não há descrição na literatura da atividade desta molécula em macrófagos humanos infectados por *L. braziliensis*.

## 2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O conjunto de doenças de cunho imunológico são caracterizadas pela disfunção de componentes do sistema imune, incluindo os macrófagos, que são células importantes na resposta imune durante a inflamação, além de serem responsáveis pela manutenção da homeostase dos tecidos. Estas células possuem uma baixa resposta aos fármacos imunossupressores e anti-inflamatórios disponíveis, além de apresentarem toxicidade a longo prazo.

A leishmaniose cutânea é uma doença que apresenta um componente imune e inflamatório local importante. Possui alta incidência global, endêmica em regiões tropicais e subtropicais, incluindo a região nordeste do Brasil. Os tratamentos disponíveis para o tratamento desta doença apresentam alta toxicidade, com alto custo, efeitos adversos graves que podem evoluir para a morte do paciente e falha terapêutica associada a resistência parasitária, podendo levar à recidiva da doença. Diante este cenário, é necessário a busca e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos seguros e eficazes contra a doença.

As fisalinas purificadas de *Physalis angulata* são seco-esteroides que apresentam atividade imunomoduladora. O nosso grupo de pesquisa demonstrou uma potente atividade inibidora da ativação de macrófagos e linfócitos dessas moléculas, além da atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo*. Dentre o arsenal das fisalinas, a fisalina F apresentou maior eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental e também como um potente imunomodulador, diminuindo a inflamação local e promovendo uma melhor cicatrização.

Neste projeto, foi avaliado, pela primeira vez, o potencial imunomodulador da fisalina F em macrófagos humanos, além de explorar a atividade e mecanismos de ação deste composto contra *L. braziliensis*. A hipótese desse trabalho é que a fisalina F possui atividade imunomoduladora e antileishmania em macrófagos humanos ativados ou infectados por *L. braziliensis*, respectivamente.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar o papel imunomodulador e a atividade anti-*Leishmania braziliensis* da fisalina F em macrófagos humanos.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* da fisalina F em macrófagos humanos;
- Avaliar a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  por macrófagos humanos após o tratamento com a fisalina F;
- Avaliar a viabilidade de promastigotas em *L. braziliensis* após o tratamento com a fisalina F;
- Avaliar a atividade anti- *L. braziliensis* da fisalina F em macrófagos humanos infectados;
- Avaliar os mecanismos de morte celular em promastigotas de *L. braziliensis* após o tratamento com a fisalina F;
- Avaliar as alterações ultraestruturais da molécula frente às formas promastigotas de *L. braziliensis*.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 OBTENÇÃO DA FISALINA F

A fisalina F foi obtida do caule da *Physalis angulata*, coletada no Belém do Pará. O processo de identificação, extração e isolamento da molécula foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais – Farmanguinhos (FIOCRU/RJ) pela equipe da Dr<sup>a</sup> Therezinha Tomassini, conforme descrito por Soares e cols. (2003) e gentilmente cedida ao nosso grupo de pesquisa. Após o recebimento da molécula, a fisalina F foi diluída em DMSO (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) e armazenada na concentração de 10 mg/mL à uma temperatura de -20°C até a sua utilização.

### 4.2 CULTIVO DE PROMASTIGOTAS

As formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR88/BA-3456) foram cultivadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) contendo 20% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA) e 50 µg/ mL de gentamicina (Hipolabor, Belo Horizonte – Minas Gerais, Brasil), pH 7,2 e incubadas a 27°C. As leishmanias foram contadas diariamente em câmara de Neubauer, durante sete dias. Ao atingirem a fase estacionária de crescimento, novas passagens *in vitro* dos parasitos foram realizadas.

### 4.3 ISOLAMENTO DE PBMC

Sangue periférico (30 mL) foi coletado de voluntários sadios para o isolamento de células mononucleares (PBMC). O sangue coletado foi diluído em salina estéril na razão de 1:1 à temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi submetida à centrifugação em gradiente de densidade utilizando Ficoll (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), a 400 g por 30 minutos, a 24°C. O anel interfacial de PBMC foi coletado e submetido a lavagens com salina estéril, através de três centrifugações de 300, 250 e 200 g, por 10 minutos cada. O sobrenadante foi descartado na última centrifugação e o *pellet* foi ressuspenso com meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA) pH 7,2 a 4°C. As células foram contadas ao microscópio óptico utilizando câmara de Neubauer, após

coloração com azul de Trypan (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (BONYEK-SILVA et al., 2021).

#### 44 SEPARAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS

As células mononucleares separadas por gradiente de Ficoll foram plaqueadas ( $2 \times 10^6$ /poço) em placas de 24 poços contendo ou não lamínulas de vidro de 13 mm (Perfecta, São Paulo, Brasil) e meio RPMI (Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA). As células foram incubadas na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 30 minutos para aderência celular. Após o tempo, o sobrenadante foi descartado e lavagens sucessivas foram realizadas utilizando salina estéril à temperatura ambiente para remover células não aderentes. Foi adicionado então meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA), 2 mM de L-glutamina, 50 µg/mL de gentamicina (Hipolabor, Belo Horizonte – Minas Gerais, Brasil) e 50 ng/mL de *macrophage colony-stimulating fator* (M-CSF) (Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA) por 7 dias, para diferenciação de monócitos em macrófagos (BONYEK-SILVA et al., 2021).

#### 4.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz - IGM/ FIOCRUZ/ BA (número do protocolo: CAAE 33419420.6.0000.0040).

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Macrófagos humanos foram estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) de *Escherichia coli* na concentração de 500 ng/mL e tratados com fisalina F nas concentrações de 5 - 0,625 µM, durante 24 horas em placas de 24 poços, na densidade de  $2 \times 10^5$  por poço. A droga imunossupressora de referência, dexametasona (DEXA) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foi utilizada na concentração de 1 µM. Em seguida, o sobrenadante foi coletado em 4 e 24 horas para a avaliação dos níveis de citocinas e mediadores químicos produzidos durante o tratamento. As dosagens de IL-6, IL-1β e TNF-α foram determinadas através da técnica de ELISA *sandwich*,

utilizando kits Duoset ELISA Developmet System (R&D Systems, Minneapolis, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

As placas de 96 poços de ELISA (NUNC – IMMUNO PLATE Maxisorp Surface) foram sensibilizadas com 50 µL/poço do anticorpo de captura, na concentração de 2 µg/mL, diluído em PBS 1x e incubadas *overnight* a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS 1x a 0,05% de tween e bloqueadas com 100 µL/poço de PBS 1x contendo 0,05% de nitrito de sódio, 1% de albumina bovina e 5% de sacarose por 2 horas. Após o tempo, foram adicionados 50 µL/poço das amostras, do branco e da curva padrão dos recombinantes diluídos no tampão Tris-salina (20 mM Tris na base e 150 mM de NaCl) contendo 0,1% de albumina bovina e 0,05% de tween 20, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Foi realizada uma diluição seriada (1:2) para o padrão, seguido com 11 diluições em duplicata, de acordo com as recomendações do fabricante. A placa foi lavada três vezes com PBS 1x/ tween 0,05% e incubada com 50 µL do anticorpo de detecção (biotinilado) na concentração de 400 ng/ mL por um período de 2 horas. Por fim, a placa foi lavada cinco vezes com PBS 1x/ tween 0,05% e incubada durante 20 minutos com avidina-peroxidase diluída 1:200. A revelação foi realizada adicionando o substrato cromogênico 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) (Kinkergaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD), dissolvido em 10 mL do tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 e 2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi interrompida com ácido fosfórico a 0,05 M. A leitura foi determinada utilizando o espectrofotômetro (Spectramax), no comprimento de onda de 450 nm. As análises foram realizadas utilizando o Software Softmax 4.3.1.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO* DA FIALINA F EM MACRÓFAGOS HUMANOS

Macrófagos humanos, obtidos após o processo de diferenciação, foram plaqueados em placas de 96 poços na densidade de  $5 \times 10^4$  células por poços e tratados por 72 horas com diferentes concentrações de fialina F (50 - 1,56 µM) diluída em DMSO, AMB (2 - 0,0625 µM) e dexametasona (1 - 0,03125 µM). A droga citotóxica de referência utilizada foi a violeta de genciana (VG) nas concentrações de 5 - 0,156 µM. A viabilidade celular foi medida através do metabolismo do Alamar Blue® a 10% (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. A concentração citotóxica para 50% da população celular (CC<sub>50</sub>) foi determinada com base na porcentagem de inibição do metabolismo celular, em relação ao controle não tratado. O CC<sub>50</sub>

foi calculado por regressão não linear utilizando o GraphPadPrism versão 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

#### 4.8 ENSAIO DE VIABILIDADE DE PROMASTIGOTAS

Promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR88/BA-3456) em fase estacionária de crescimento foram cultivadas a uma densidade de  $10^6$ / poço, em placas de 96 poços contendo meio Schneider (Sigma) suplementado a 20% de SBF (Gibco) e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina (Hipolabor, Belo Horizonte – Minas Gerais, Brasil). As promastigotas foram submetidas a seis diferentes concentrações de fisalina F, diluídas 1:2, partindo da concentração de 50  $\mu\text{M}$ . A anfotericina B foi utilizada como a droga antileishmania de referência nas concentrações de 2 – 0,0625  $\mu\text{M}$ . Os parasitos foram incubados por 72 horas a 27°C. Em seguida, a viabilidade das promastigotas foram avaliadas através do Alamar Blue® (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), após 2 horas. A leitura foi realizada no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. A concentração inibitória de 50% das promastigotas ( $\text{IC}_{50}$ ) foi determinada com base na porcentagem de inibição do metabolismo celular, em relação ao controle não tratado. O  $\text{IC}_{50}$  foi calculado por regressão não linear utilizando o GraphPadPrism versão 8.0.2.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DA FISALINA F EM MACRÓFAGOS HUMANOS

Macrófagos humanos diferenciados foram plaqueados em placas de 24 poços, contendo lamínulas de vidro redondas (13mm), na densidade de  $2 \times 10^5$  por poço. Em seguida, as células foram infectadas por *L. braziliensis* (MHOM/BR88/BA-3456) na proporção de 10:1 (parasito-macrófago) durante 4 horas, a 35°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . O tratamento com fisalina F foi realizado em concentrações não tóxicas (5 - 0,15625  $\mu\text{M}$ ), durante 24 horas. As células foram fixadas com metanol a -20°C por 10 minutos e coradas com Giemsa na diluição de 1:10, para contagem utilizando um microscópio óptico (Olympus, Tokyo, Japan).

#### 4.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E VARREDURA

Promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR88/BA-3456) na fase estacionária de crescimento, foram plaqueadas na densidade de  $4 \times 10^6$ / poço, em placas de 24 poços. A



fisalina F em concentração não citotóxica foi adicionada e incubada por 72 horas a 27°C. Posteriormente, as células foram fixadas em uma solução de 2% de formaldeído, 2,5% de glutaraldeído e 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub> em 0,1M de cacodilato de sódio buffer pH 7,2. Seguida de uma pós fixação com 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferricianeto de potássio no mesmo tampão. Depois das lavagens sucessivas, as amostras foram desidratadas em gradiente crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) para a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Por fim, as amostras foram incubadas em resina PolyBed. Os cortes foram marcados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Em seguida, foram observadas pelo microscópio eletrônico de transmissão, JEOL JEM 1320 (Peabody, Massachusetts, EUA).

Para as análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), após a fixação com a solução preparada com tetróxido de ósmio, as amostras foram colocadas em lamínulas de vidro com poly-L-lysina 0,01%. A desidratação foi realizada com etanol (30 a 100%) e submetidos ao ponto crítico (substituição do etanol por CO<sub>2</sub>) no LEICA CPD 030. Por fim, as amostras foram metalizadas com ouro e observadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV.

#### 4.11 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MORTE CELULAR EM *L. braziliensis*

Além de ensaios antiparasitários, a fisalina F foi submetida à experimentos para avaliar o mecanismo de morte celular em promastigotas de *L. braziliensis*, a fim de avaliar mecanismo de ação. A citometria de fluxo foi utilizada para analisar o potencial da droga em induzir apoptose ou necrose. Promastigotas de *L. braziliensis* (1x10<sup>6</sup>/poço) foram adicionadas a placas de 24 poços contendo meio Schneider (Sigma), na presença ou não da fisalina F a 5 µM. Foram incubadas por 24 horas a 26°C. Em seguida, os parasitos foram transferidos para tubos de citometria, lavados duas vezes com 1mL de PBS 1x, centrifugados a 3.000 RPM por 5 minutos e ressuspendidos em 100 µL do tampão de ligação da anexina-V (HEPES/NaOH a 10 mM, pH 7,4; NaCl a 140 mM; e CaCl<sub>2</sub> a 2,5 mM). Posteriormente foram marcadas com 5 µL de anexina-V (BioSource, Camarillo, CA, EUA) por 15 minutos, na ausência de luz. Após o tempo de incubação, foram adicionados 400 µL do tampão de ligação da anexina-V e 10 µL de iodeto de propídio (BioSource). A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) e analisados no programa FlowJo\_v10.6.1 (Becton, Dickinson and Company, Ashland, OR, EUA).

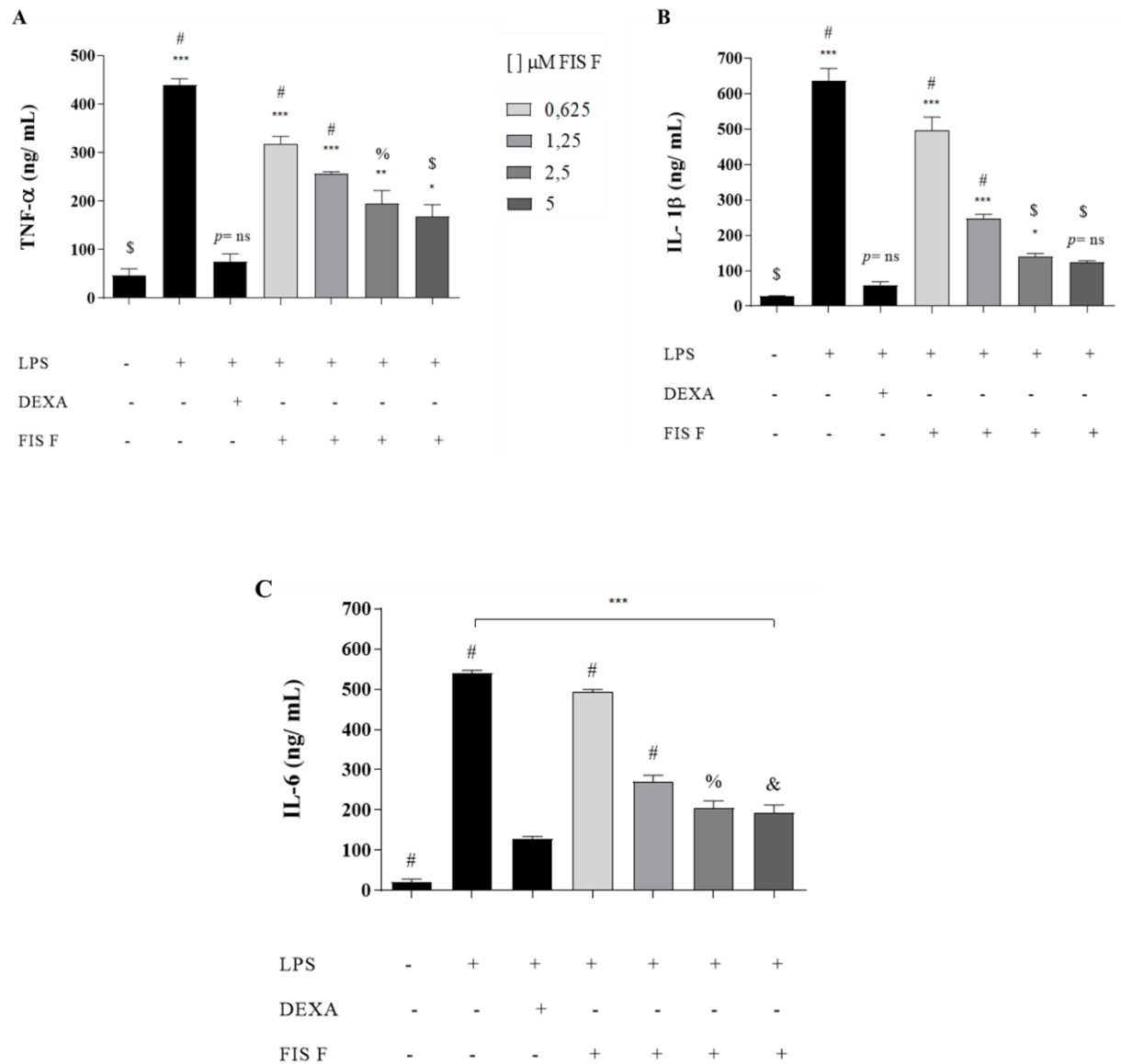
#### 4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). Os valores de IC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> foram calculados por regressão não linear a partir da porcentagem de resposta biológica (atividade antileishmania) ou redução no número de células (citotoxicidade). A significância das diferenças entre os grupos foi avaliada utilizando o teste oneway ANOVA e o pós-teste de comparação múltipla Tukey para o grupo de amostras ou análise de variância. As análises foram realizadas no programa GraphPadPrism versão 8.02.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITO IMUNOMODULADOR DA FISALINA F

Macrófagos humanos foram incubados com LPS e a dosagem de citocinas foi realizada nos sobrenadantes de macrófagos tratados com a fisalina F ou dexametasona (**Figura 2**). O estímulo dos macrófagos com LPS induziu o aumento da produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. O tratamento com fisalina F nas concentrações de 5 – 1,25  $\mu$ M reduziu de forma significativa ( $p < 0,001$ ), a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 em comparação com o controle estimulado (somente LPS). A droga padrão ouro, a dexametasona, também reduziu a produção das três citocinas, na concentração de 1  $\mu$ M.



**Figura 2 - Dosagem de citocinas pró-inflamatórias.** Quantificação da produção de TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) e IL-6 (C) em sobrenadante de culturas de macrófagos humanos tratados *in vitro* com fisalina F em diferentes concentrações (5 - 0,625  $\mu$ M) e estimulados com LPS (500 ng/mL). O controle positivo utilizado foi a dexametasona (DEXA 1  $\mu$ M) na presença de LPS (500 ng/mL). O controle negativo (CTRL) não foi submetido à estímulos e tratamentos. E o grupo LPS foi estimulado em igual concentração. Valores representam a média  $\pm$  DP de quatro determinações obtidas em três experimentos realizados. Assumindo que todos os grupos foram comparados com o grupo LPS, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 e ns = não significativo. A comparação entre a DEXA e os outros grupos foi considerado como \$ p = ns; & p < 0,05; % p < 0,01 e # p < 0,001.

**Fonte:** Elaboração da autora

## 5.2 CITOTOXICIDADE DA FISALINA F

A determinação da concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>) da fisalina F foi avaliada em macrófagos humanos isolados e diferenciados após a coleta de PBMC. A fisalina F, a violeta de genciana, a dexametasona e a anfotericina B foram testadas em seis diferentes concentrações (diluídas 1:2). A fisalina F apresentou o valor de CC<sub>50</sub> de 6,07  $\pm$  1,17  $\mu$ M

(**Tabela 2**). Como esperado, a violeta de genciana apresentou um valor de  $CC_{50}$  de  $1,43 \pm 1,23 \mu\text{M}$ . A anfotericina B obteve um valor próximo ao da violeta de genciana, com  $CC_{50}$  de  $2,02 \pm 0,54 \mu\text{M}$  nas concentrações testadas. A dexametasona não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas.

### 5.3 ATIVIDADE DA FISALINA F EM PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis*

A atividade da fisalina F foi avaliada em ensaio de viabilidade de formas promastigotas de *L. braziliensis* e a concentração inibitória de 50% ( $IC_{50}$ ) foi calculada. As concentrações testadas da fisalina F para este ensaio foi de 50 – 1,56  $\mu\text{M}$ . O valor de  $IC_{50}$  deste composto contra promastigotas de *L. braziliensis* foi de  $10,85 \pm 0,99 \mu\text{M}$ . O controle positivo, a anfotericina B, foi testada de 2 – 0,0625  $\mu\text{M}$ , e apresentou um valor de  $IC_{50}$  de  $0,108 \pm 0,001 \mu\text{M}$ . (**Tabela 2**).

**Tabela 3** - Citotoxicidade da fisalina F sob macrófagos humanos, atividade antileishmania frente às formas promastigotas de *L. braziliensis*.

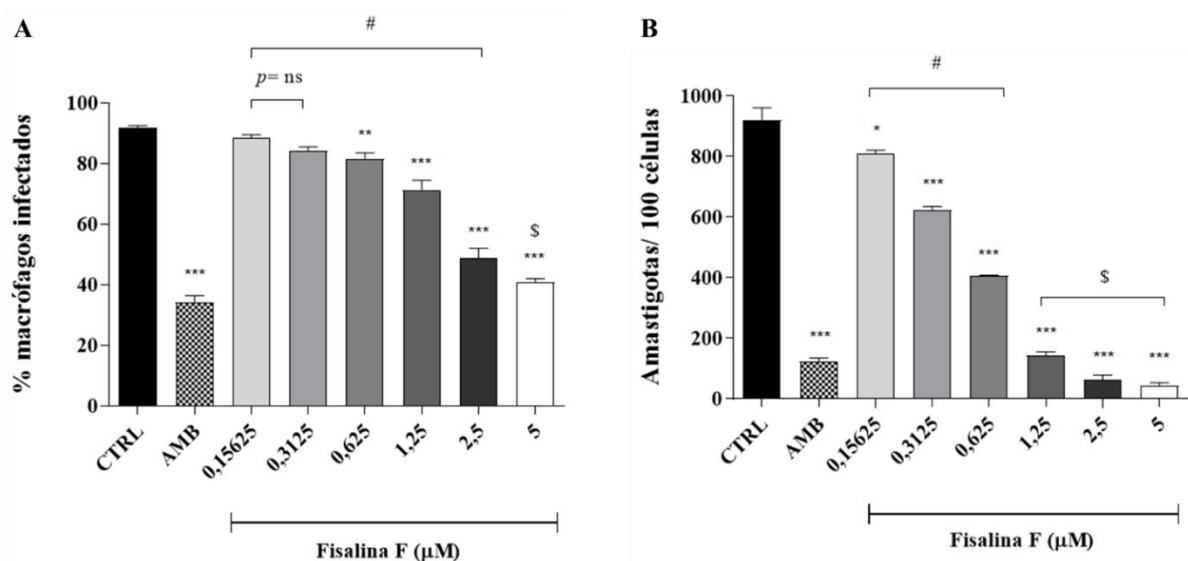
Compostos	Macrófagos humanos $CC_{50} \pm DP (\mu\text{M})$	<i>L. braziliensis</i>
		Promastigotas $IC_{50} \pm DP (\mu\text{M})$
Fisalina F	$6,07 \pm 1,17$	$10,85 \pm 0,99$
Anfotericina B	$2,02 \pm 0,54$	$0,10 \pm 0,00$
Violeta de Genciana	$1,43 \pm 1,23$	N.D.

$CC_{50}$ = concentração citotóxica de 50%;  $IC_{50}$ = concentração inibitória de 50%; DP= Desvio padrão; N.D. = não determinado.

Fonte: Elaboração da autora

#### 5.4 ATIVIDADE DA FISALINA F EM MACRÓFAGOS HUMANOS INFECTADOS POR *L. braziliensis*

O modelo de infecção em cultura de macrófagos humanos foi realizado para avaliar o potencial da fisalina F em inibir a taxa de infecção e o número de amastigotas/ 100 células contadas aleatoriamente, para obtenção de resultados (Figura 3). A fisalina F reduziu a infecção e o número de amastigotas, especialmente nas concentrações de 5 e 2,5  $\mu\text{M}$ . Este padrão de redução foi semelhante ao observado em culturas tratadas com a anfotericina B, a droga de referência na clínica médica.



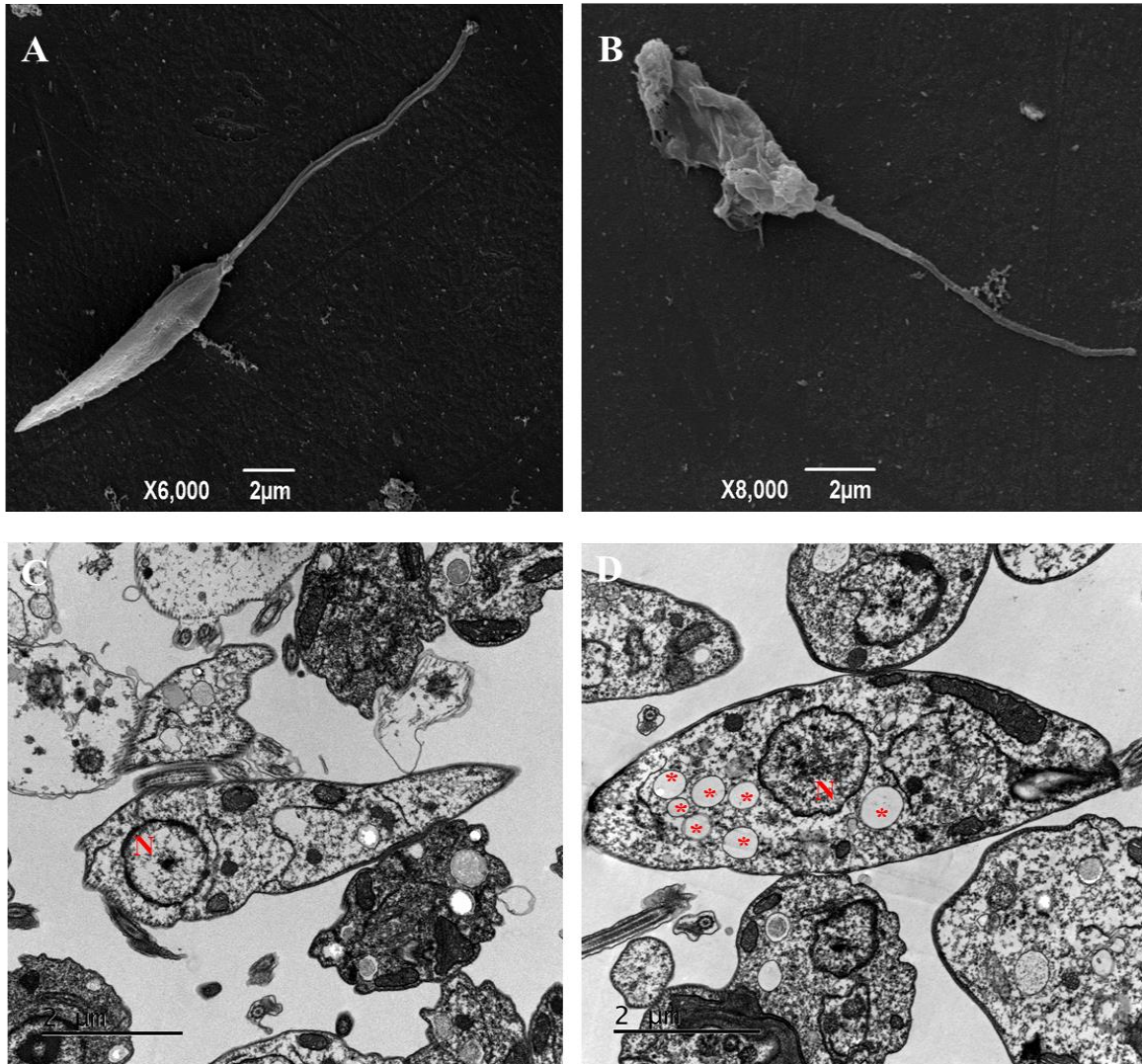
**Figura 3 - Atividade da fisalina F em macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis*.** Macrófagos humanos foram infectados durante 4 horas com *L. braziliensis* e tratados durante 24 horas com diferentes concentrações de fisalina F (5 - 0,15625  $\mu\text{M}$ ). O controle (CTRL) inclui macrófagos infectados e sem tratamento. A anfotericina B (AMB) foi utilizada como controle positivo na concentração de 2  $\mu\text{M}$ . (A) Porcentagem de macrófagos infectados com *L. braziliensis*. (B) Número de amastigotas por macrófago. Valores representam a média  $\pm$  DP de três determinações obtidas em três experimentos realizados. Assumindo que todos os grupos foram comparados com o controle (CTRL), \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e ns = não significativo. A comparação entre a AMB e os outros grupos foi considerado como \$  $p = \text{ns}$ ; &  $p < 0,05$ ; %  $p < 0,01$  e #  $p < 0,001$ .

Fonte: Elaboração da autora

#### 5.5 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DE PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* TRATADOS COM FISALINA F

Os parasitos não tratados mantiveram suas características morfológicas normais, compatíveis com corpo liso alongado, fusiforme, flagelo na porção anterior, proporcional ao tamanho do corpo e superfície celular intacta com estruturas bem preservadas (**Figura 4A**). Após 24 horas de tratamento com a fisalina F a 5  $\mu\text{M}$ , as formas promastigotas exibiram por microscopia eletrônica de varredura, alterações significantes em sua estrutura. Por exemplo,

alise na membrana plasmática com extravasamento de conteúdo, apresentando rugosidade e encurtamento do corpo celular (**Figura 4B**). Na análise da microscopia eletrônica de transmissão, os parasitos do grupo controle não apresentaram nenhuma alteração, com o núcleo, material genético e citoplasma organizado (**Figura 4C**). Já no grupo tratado, nota-se afrouxamento da membrana nuclear, material genético desorganizado e acúmulo de inclusões lipídicas (**Figura 4D**).

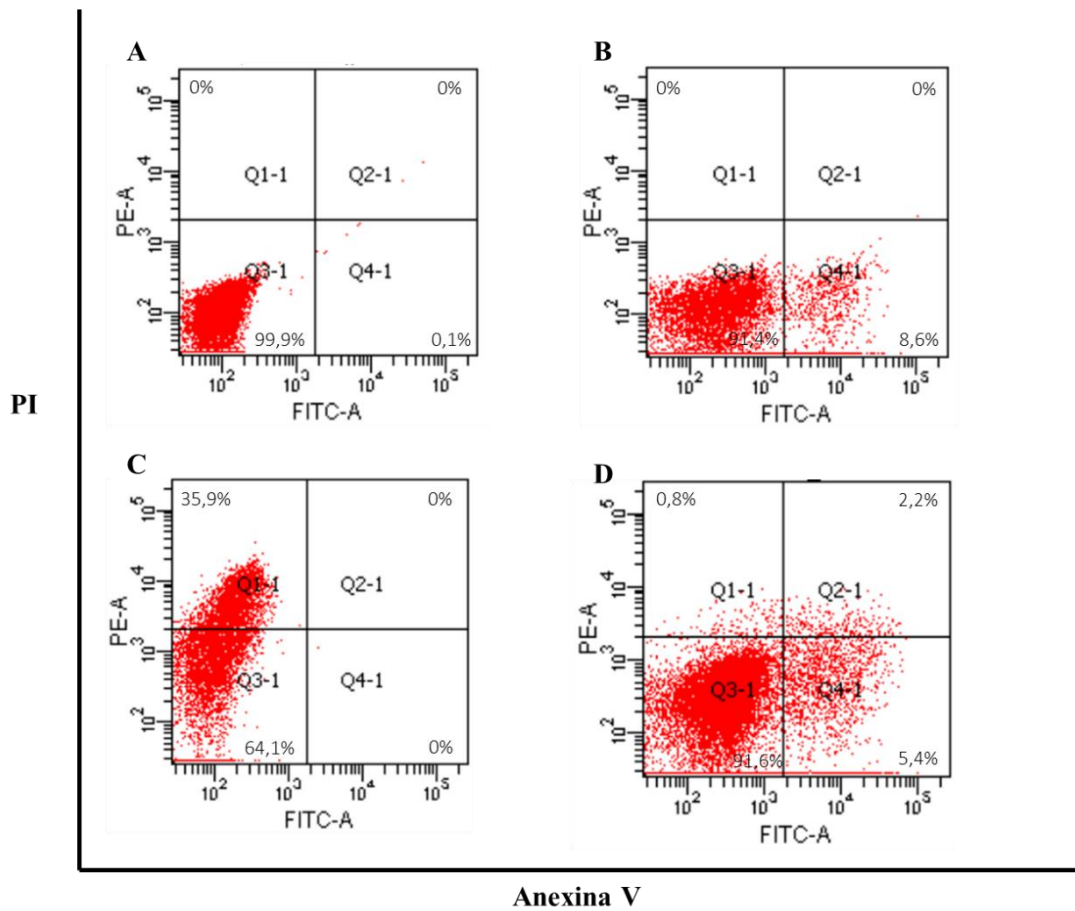


**Figura 4 - Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET) de promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com fisalina F.** (A) Controle não tratado com características morfológicas normais, parasito alongado e fusiforme, analisado por MEV. (B) Parasitos tratados com fisalina F na concentração de 5  $\mu\text{M}$  por 24 horas, mostram o efeito dessa droga sobre os parasitos, como lise de membrana plasmática, com extravasamento de fluidos e encurtamento do corpo celular, avaliados por MEV. (C) Controle não tratado apresenta núcleo e material genético intactos, através de análises por MET. (D) Promastigotas analisados por MET, tratadas com fisalina F nas mesmas condições citadas, apresentam afrouxamento da membrana nuclear, desorganização de material genético, e o aparecimento de inclusões lipídicas. N: núcleo; \*: inclusões lipídicas.

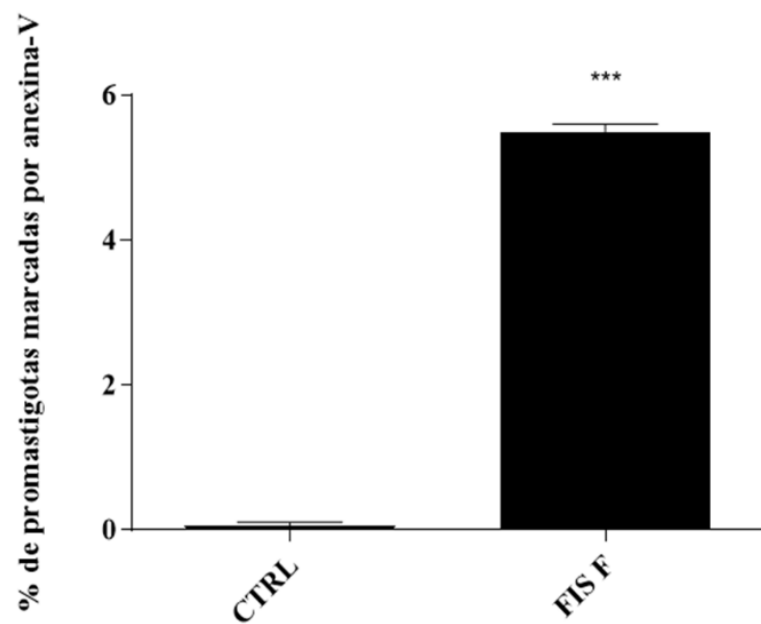
**Fonte:** Elaboração da autora

## 5.6 PADRÃO DE MORTE CELULAR EM PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* APÓS O TRATAMENTO COM FISALINA F

De acordo com as análises ultraestruturais que indicaram características apoptóticas em promastigotas de *L. braziliensis*, tratados com IC<sub>50</sub>/2 de fisalina F (5 µM), foi avaliado o efeito do composto sobre a morte celular por citometria de fluxo através de marcações com anexina V e iodeto de propídio (PI). Após o tratamento com fisalina F, o percentual de parasitos marcados com anexina V foi de 5,4%, próximo ao valor do controle não tratado e marcado com anexina V que apresentou um valor de 8,6% de marcação (**Figura 5B e D**), sugerindo possível morte celular induzida por apoptose.





**E**

**Figura 5 - Padrão de morte celular por citometria de fluxo.** Promastigotas de *L. braziliensis* foram tratadas com fisalina F (5  $\mu$ M) e incubadas com iodeto de propídio (PI) e anexina V após 24 h de incubação. (A) Promastigotas não tratadas e não marcadas; (B) Promastigotas marcadas por anexina V e não tratadas; (C) Promastigotas marcadas com PI e não tratadas; (D) Parasitos tratados com 5  $\mu$ M de fisalina F e marcadas com anexina V e PI; (E) Percentual de parasitos marcados por anexina V após 24 h de tratamento com fisalina F a 5  $\mu$ M. CTRL representa o controle não tratado e não marcado. Valores representativos de médias  $\pm$  DP de três determinações obtidas em dois experimentos, \*\*\*p < 0,001, comparado ao controle não tratado e não marcado.

**Fonte:** Elaboração da autora

## 6 DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças negligenciadas tropicais que estão distribuídas por todo o mundo. Dentre elas, a mais comum é a leishmaniose cutânea, atingindo milhões de pessoas. Os tratamentos disponibilizados no mercado para tratar este grupo de doenças apresentam efeitos adversos e alto custo (DUBIE; MOHAMMED, 2020). Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa indicam que a fisalina F possui atividade antileishmania e imunomoduladora promissora em células murinas (GUIMARÃES et al., 2009, 2010; NOGUEIRA et al., 2013; SOARES et al., 2003), no entanto, não há estudos que demonstram a influência da fisalina F na produção de citocinas por macrófagos humanos, bem como o efeito da molécula durante a infecção destas células por *L. braziliensis*.

No presente trabalho, uma potente inibição de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos humanos ativados foi observada após o tratamento com a fisalina F em concentrações não tóxicas. Resultados similares foram observados por Soares e cols. (2003), os quais demonstraram que a fisalina F reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c *in vitro* e em modelo de choque endotóxico *in vivo*. Outro trabalho do grupo evidenciou que a fisalina F inibe a linfoproliferação de esplenócitos e previne a rejeição de transplante alogênico (SOARES et al., 2006). Além disso, Brustolim e cols. (2010) observaram que a fisalina F reduz o edema em modelo *in vivo* de artrite induzida por colágeno. Em nossos ensaios, a produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e o IL-1 $\beta$  foi significativamente diminuída pelo tratamento de macrófagos humanos com a fisalina F, de forma concentração-dependente. Este dado reforça a utilização da fisalina F para o tratamento de doenças de cunho imunológico, onde a modulação de citocinas exerce um importante papel na evolução de enfermidades.

As citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e o IL-1 $\beta$ , são importantes na defesa imunológica do hospedeiro contra parasitos do gênero *Leishmania* (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). Por outro lado, a resposta inflamatória na leishmaniose cutânea também acarreta na destruição de tecidos e necrose nas lesões (MIRAMIN-MOHAMMADI et al., 2020). Nós observamos que a fisalina F, apesar de reduzir os níveis destas importantes citocinas pró-inflamatórias, inibe o número de macrófagos humanos infectados e o número de amastigotas por 100 células, sugerindo uma possível ação direta da molécula contra os parasitos. As alterações morfológicas observadas na microscopia eletrônica de varredura e de transmissão corroboram com estes dados. Outro trabalho do nosso grupo de pesquisa também descreve a ação direta da fisalina F contra formas promastigotas e amastigotas de leishmania *in vitro* e

em modelo murino de leishmaniose cutânea, com redução da carga parasitária e do tamanho da lesão na orelha de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* (GUIMARÃES et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2010).

Estudos com outras moléculas isoladas de *Physalis angulata* também demonstram a redução do crescimento de formas promastigotas em cultura axênica. As fisalinas B e G, por exemplo, são potentes contra promastigotas de diferentes espécies (GUIMARÃES et al., 2010). Nogueira e cols. (2013) demonstraram que o extrato etanólico de *P. angulata* inibe formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e promastigotas de *L. braziliensis*. Outro estudo sugere que a biotransformação da fisalina H exerça uma potente atividade anti-*L. major*. Além disso, a fisalina F inibe a proliferação de outras espécies de protozoários, como o *Plasmodium spp.* e o *Trypanosoma cruzi* (MEIRA et al., 2013; SÁ et al., 2011). Todos estes dados reforçam a importância destes seco-esteróides contra protozoários parasitos (CHOUDHARY et al., 2006).

As características morfológicas de um evento apoptótico são a redução do volume celular, a formação de bolhas na membrana e a fragmentação do núcleo e do seu DNA (BASMACIYAN; CASANOVA et al., 2019; STROPPA et al., 2017; SHAHA et al., 2006; MARINHO et al., 2014). Estas características também foram observadas em nossas análises de microscopia eletrônica. Além disso, formas promastigotas tratadas com a fisalina F foram positivas para a anexina V, um marcador da externalização da fosfatidilserina. Estes resultados, em conjunto, direcionam a um padrão de morte celular similar à apoptose em promastigotas de *L. braziliensis* tratados com a fisalina F.

A investigação da atividade antiparasitária deste seco-esteróide contra outras espécies de leishmania poderá ser realizada no futuro, a fim de ampliar o estudo do efeito da molécula em diferentes manifestações das leishmanioses, sendo um passo para ensaios clínicos. Além disso, este trabalho será aperfeiçoado utilizando ensaios *high content* para a otimização de tempo e redução de vieses do observador nas contagens dos ensaios de infecção. O tempo de duração da diferenciação dos monócitos em macrófagos no protocolo é muito longo, portanto, foi uma limitação para o andamento desta pesquisa.

## 7 CONCLUSÃO

Este é um estudo inédito que demonstra a atividade da fisalina F em macrófagos humanos, um composto promissor na imunomodulação e na atividade anti- *L. braziliensis*. A molécula reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos humanos ativados, além de inibir promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*, agindo diretamente no parasito e apontando uma possível morte celular similar à apoptose.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 8ª edição. Editora Elsevier. Rio de Janeiro, 2015.
- ABDELADHIM, M.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, n. August, p. 691–703, 2014.
- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The Cell Biology of Macrophage Activation. **Annual Review of Immunology**, v. 2, n. 1, p. 283–318, abr. 1984.
- ALEXANDER, J.; VICKERMANT, K. Fusion of Host Cell Secondary Lysosomes. v. 22, n. 4, p. 502–508, 1975.
- ALONSO, L. et al. Membrane dynamics in *Leishmania amazonensis* and antileishmanial activities of  $\beta$ -carboline derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1863, n. 1, p. 183473, 2021.
- ALVAR, J. et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 334–359, 2008.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, v. 105, n. 1, p. 1–9, 2008.
- AMATO, V. S. et al. Short report: Can we use a lower dose of liposomal amphotericin B for the treatment of mucosal American leishmaniasis? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 5, p. 818–819, 2011.
- ANTONELLI, L. R. V. et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 101, n. 2, p. 226–230, 2005.
- AOKI, J. I. et al. The impact of arginase activity on virulence factors of *Leishmania amazonensis*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 110–115, 2019.
- ARAÚJO, D.; FERREIRA, L.F. Parasitism. Part I - Parasites, Human Hosts, and the Environment. In: FERREIRA, L.F.; REINHARD, K.J.; an ARAÚJO, A., ed. *Foundations of Paleoparasitology* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, pp. 111-119. ISBN: 978-85-7541-598-6. Availablefrom: doi:10.7476/9788575415986.0008.
- AZZOUZ, S. et al. Study of the stress proteins secreted by *Leishmania Donovanii* after treatment with edelfosine, mitelfosine and ilmofosine, and morphological alterations analyzed by electronic microscopy. **Parasite**, v. 16, n. 3, p. 215–221, 2009.
- BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002.

- BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203–211, 2007.
- BALBANI, A. P. S.; SILVA, D. H. S.; MONTOVANI, J. C. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, n. 4, p. 461–473, 8 abr. 2009.
- BARARDI, C. R. M.; CAROBREZ, S. G.; PINTO, A. R. 2010. *Imunologia*. UFSC, CCB.
- BASMACIYAN, L.; AZAS, N.; CASANOVA, M. Calcein+/PI- as an early apoptotic feature in *Leishmania*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–10, 2017.
- BASMACIYAN, L.; CASANOVA, M. Cell death in *Leishmania*. **Parasite (Paris, France)**, v. 26, p. 71, 2019.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.
- BERN, C. et al. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 7, p. 917–924, 2006.
- BIAPA, P. C. N. et al. Phytochemical studies and antioxidant properties of four medicinal plants used in Cameroon. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, n. 4, p. 495–500, 2007.
- BOAVENTURA, V. S. et al. Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 10, p. 2830–2836, 2010.
- BOLARD, J.; JOLY, V.; YENI, P. Mechanism of action of amphotericin b at the cellular level. Its modulation by delivery systems. **Journal of Liposome Research**, v. 3, n. 3, p. 409–427, 1993.
- BONYEK-SILVA, I. et al. Obtainment of Macrophages from Human Monocytes to Assess *Leishmania braziliensis* Infection Rate and Innate Host Immune Response. **Journal of Visualized Experiments**, n. 174, p. 1–12, 2021.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 488–494, 1999.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a co-infecção Leishmania-HIV**. [s.l: s.n.].
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l: s.n.].
- BRASIL. **Guide to Health Surveillance**. [s.l: s.n.].
- BRAY, P. G. et al. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: Past, present

and future. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 232–239, 2003.

BRUSTOLIM, D. et al. Activity of physalin F in a collagen-induced arthritis model. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 8, p. 1323–1326, 2010.

CEREGHETTI, D. M.; CARREIRA, E. M. Amphotericin B: 50 Years of chemistry and biochemistry. **Synthesis**, n. 6, p. 914–942, 2006.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of allergy and clinical immunology**, 125(2), S3-S23, 2010.

CHAWLA, B. et al. Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin susceptible resistant *Leishmania donovani*. **PLoS One**. 6(10), 2011.

CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, 9(6), 7204, 2018.

CHOUDHARY, M. I. et al. Biotransformation of physalin H and leishmanicidal activity of its transformed products. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 7, p. 927–930, 2006.

CHUNG, Y. et al. Critical Regulation of early Th17 differentiation by IL-1 signaling. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 576–587, 2009.

CONVIT, J. Disseminated Anergic American Leishmaniasis. **A.M.A. Archives of Dermatology**, v. 76, n. 2, p. 213, 1957.

COURRET, N. et al. Biogenesis of Leishmania-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 11, p. 2303–2316, 2002.

CRAGG, G. M. et al. Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. **Ciba Foundation symposium**, v. 185, p. 178–196, 1994.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 7–24, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, jun. 2013.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–26, jan. 2006.

CRUL, M. et al. Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours. **European Journal of Cancer**, v. 38, n. 12, p. 1615–1621, 2002.

CRUVINEL, W. D. et al. Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista**

**Brasileira de Reumatologia**, 50, 434-447, 2010.

DA ROCHA, F. F.; CAMPOS, M. G. **Leishmaniose tegumentar americana**. [s.l: s.n.]. v. 52

DA SILVA LIMA, M. et al. Antinociceptive properties of physalins from *Physalisangulata*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 11, p. 2397–2403, 2014.

DAI, X. M. et al. Incomplete restoration of colony-stimulating factor 1 (CSF-1) function in CSF-1-deficient *Csf1op/Csf1op* mice by transgenic expression of cell surface CSF-1. **Blood**, v. 103, n. 3, p. 1114–1123, 2004.

DAVIDSON, R. N.; DEN BOER, M.; RITMEIJER, K. Paromomycin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 7, p. 653–660, 2009.

DEGASPERI, G. R et al. Polarização de linfócitos: Relevância fisiopatológica de Th9 e Th17. **Saúde (Santa Maria)**, 44(2), 2018.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015.

DEV, S. Ancient-modern concordance in Ayurvedic plants: some examples. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 10, p. 783–789, out. 1999.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303–336, 16 abr. 2012.

DING, N. et al. Physalin D regulates macrophage M1/M2 polarization via the STAT1/6 pathway. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 6, p. 8788–8796, 2019.

DOS REIS, L. L. et al. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 638–645, 2017.

DOS SANTOS, R. A. et al. Genotoxic effect of *Physalisangulata*L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated in vitro. **Biocell**, v. 32, n. 2, p. 195–200, 2008.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2012.

DUBIE, T.; MOHAMMED, Y. Review on the Role of Host Immune Response in Protection and Immunopathogenesis during Cutaneous Leishmaniasis Infection. **Journal of Immunology Research**, v. 2020, 2020.

ELENKOV, I. J. et al. Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. **NeuroImmunoModulation**, v. 12, n. 5, p. 255–269, 2005.

ELOMAA, O. et al. Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 8, p. 4530–4538, 1998.



FATA, A. et al. Fish tank granuloma: An emerging skin disease in Iran mimicking Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, p. 1–14, 2019.

FERNÁNDEZ, M. M.; MALCHIODI, E. L.; ALGRANATI, I. D. Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania Mexicana* and mammalian cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 86–93, 2011.

FOTH, B. et al. *Leishmania major* proteophosphoglycans exist as membrane-bound and soluble forms and localise to the cell membrane, the flagellar pocket and the lysosome. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 14, p. 1701–1708, 2002.

GABRIEL, Á. et al. Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, p. 1–16, 1 dez. 2019.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327(5966), 656-661, 2010.

GIUDICE, A. et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 75, 2012.

GOTO, H. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, p. 69, 2012.

GUIMARÃES, E. T. et al. Activity of physalins purified from *Physalisangulata* in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. 84–87, 2009.

GUIMARÃES, E. T. et al. Effects of seco-steroids purified from *Physalisangulata* L., Solanaceae, on the viability of *Leishmania* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 945–949, 2010.

GUIMARÃES, E. T. et al. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes and infection*, 8(5), 1219-1226, 2006.

GURCAY, E.; AKINCI, A. Autoinflammatory Diseases and Physical Therapy. **Mediterranean Journal of Rheumatology**, v. 28, n. 4, p. 183–191, 1 out. 2017.

HAMILTON, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 7, p. 533–544, 2008.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 897–908, 2015.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, 2002.

HELLIER, I. et al. Treatment of Old World cutaneous leishmaniasis by pentamidine

isethionate. An open study of 11 patients. **Dermatology**, v. 200, n. 2, p. 120–123, 2000.

HOTEZ, P. J. Human parasitology and parasitic diseases: heading towards 2050. In *Advances in Parasitology*, Academic Press. 2018. Vol. 100, pp. 29-38.

IDRISS, H. T.; NAISMITH, J. H. TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). **Microscopy Research and Technique**, v. 50, n. 3, p. 184–195, 2000.

INA, L. A Pilot Randomized Clinical Trial: Oral Miltefosine and Pentavalent Antimonials Associated With Pentoxifylline for the Treatment of American Tegumentary Leishmaniasis. v. 11, n. July, p. 1–9, 2021.

JACOBO-HERRERA, N. J. et al. Physalins from *Witheringiasolanacea* as modulators of the NF- $\kappa$ B cascade. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 328–331, 2006.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Current Opinion in Hematology**, v. 7, n. 1, p. 26–31, 2000.

KARAMIAN, M. et al. Effectiveness of meglumine antimoniate against *L. tropica* in a recently emerged focus of cutaneous leishmaniasis in Birjand, eastern Islamic Republic of Iran. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 21, n. 4, p. 280–286, 2015.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279–289, 1999.

KIP, A. E. et al. Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. **Clin Pharmacokinet.** v.57, p.151–176, 2018.

LACERDA, M. M. **The Brazilian Leishmaniasis Control Program. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1994.

LESSA, H. A. et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 2, p. 87–89, 2001.

LEWNARD, J. A. et al. Forecasting Temporal Dynamics of Cutaneous Leishmaniasis in Northeast Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.

LLANOS-CUENTAS, A. et al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 223–231, 2008.

LOPES, M. V. et al. Mitochondria superoxide anion production contributes to geranylgeraniol-induced death in *Leishmania amazonensis*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVAEZ, F. The role of monocytes/macrophages in Leishmania infection: A glance at the human response. **Acta Tropica**, v. 207, n. March, p. 105456, 2020.

LOURIE, E. M.; YORKE, W. Studies in chemotherapy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 33, n. 3–4, p. 289–304, 1939.

MARSHALL et al. An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, 14(2), 1-10, 2018.

MARINHO FA, GONÇALVES KCS, OLIVEIRA SSC et al. The Calpain Inhibitor MDL28170 472. Induces the Expression of Apoptotic Markers in *Leishmania amazonensis* Promastigotes. **473 PLoS ONE**, 9: 87659.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247–260, 2016.

MATHERS, C. D.; EZZATI, M.; LOPEZ, A. D. Measuring the burden of neglected tropical diseases: The global burden of disease framework. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 2, 2007.

MATLASHEWSKI, G. Leishmania infection and virulence. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 190, n. 1–2, p. 37–42, 2001.

MATSUURA, T. et al. Bitter Principles of *PhysalisAlkekengivarFrancheti*: Structure of Physalin A. **Tetrahedron Letters**, v. 10, n. 20, p. ii, 1969.

MATOS, A. P. S. et al. A review of current treatments strategies based on paromomycin for leishmaniasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 57, 101664, 2020.

MCCONVILLE, M. J. et al. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 8, p. 368–375, 2007.

MCGONAGLE, D.; MCDERMOTT, M. F. A proposed classification of the immunological diseases. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 8, p. 1242–1248, 2006.

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

MEIRA, C. S. et al. Physalins B and F, seco-steroids isolated from *Physalisangulata* L., strongly inhibit proliferation, ultrastructure and infectivity of *Trypanosomacruzi*. **Parasitology**, v. 140, n. 14, p. 1811–1821, 2013.

MIRAMIN-MOHAMMADI, A. et al. Immune response in cutaneous leishmaniasis patients with healing vs. Non-healing lesions. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 249–255, 2020.

MOSIMANN, V. et al. Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: A literature review. **Acta Tropica**, v. 182, n. March, p. 246–250, 2018.

MOURA, F. J. D. et al. Pentoxifylline prevents the meglumineantimonate-induced renal, but not that induced by the inorganic antimony pentachloride. **Toxicology**, v. 243, n. 1–2, p. 66–

74, 2008.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. [Review] [199 refs]. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2015.

NEVES, E.M. **Macrófago: Biologia, Diversidade e Função**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015.

NICHOLSON, L. B. The immune system. **Essays in biochemistry**, 60 (3), 275-301, 2016.

NOGUEIRA, R. C. et al. Genotoxicity and antileishmanial activity evaluation of *Physalisangulata* concentrated ethanolic extract. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 1304–1311, 2013.

OLIVEIRA, C. C. G. et al. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: A disease of the urban-rural interface. **Acta Tropica**, v. 90, n. 2, p. 155–162, 2004.

ORDAZ-FARIAS, A. et al. Case report: Transient success using prolonged treatment with miltefosine for a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis infected with *Leishmania mexicana mexicana*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 1, p. 153–156, 2013.

PACHIONI, J. DE A. et al. Alkylphospholipids - A promising class of chemotherapeutic agents with a broad pharmacological spectrum. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 5, p. 742–759, 2013.

PINTO, L. A. et al. Physalin F, a seco-steroid from *Physalisangulata* L., has immunosuppressive activity in peripheral blood mononuclear cells from patients with HTLV1-associated myelopathy. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 79, p. 129–134, 2016.

PINTO, N. B. et al. Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalisangulata* on experimental dermatitis in mice. **Phytomedicine**, v. 17, n. 10, p. 740–743, 2010.

PISARKI, K. The global burden of disease of zoonotic parasitic diseases: top 5 contenders for priority consideration. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, 4(1), 44, 2019.

POLARI, L. P. et al. *Leishmania braziliensis* infection enhances toll-like receptors 2 and 4 expression and triggers TNF- $\alpha$  and IL-10 production in human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. MAY, 2019.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2017.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

- RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 143–148, 1998.
- RIJAL, S. et al. Increasing failure of miltefosine in the treatment of kala-azar in nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 11, p. 1530–1538, 2013.
- RUIZ-POSTIGO, J. A. et al. Global leishmaniasis a baseline for the 2030 roadmap Surveillance mondiale de la leishmaniose: 2019-2020, unepériode de référence pour la feuille de route à l' horizon 2030. p. 2019–2020, 2021.
- SÁ, M. S. et al. Antimalarial Activity of Physalins B, D, F, and G. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 10, p. 2269–2272, 28 out. 2011.
- SALAM, N.; AL-SHAQHA, W. M.; AZZI, A. Leishmaniasis in the Middle East: Incidence and Epidemiology. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. 1–8, 2014.
- SANTAREM, A. A. A. et al. Effectiveness of miltefosine-pentoxifylline compared to miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in C57Bl/6 mice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 4, p. 517–520, 2014.
- SANTOS, R. L.; DE OLIVEIRA, A. R. Leishmaniasis in non-human primates: Clinical and pathological manifestations and potential as reservoirs. **Journal of Medical Primatology**, v. 49, n. 1, p. 34–39, 2020.
- SCHWARZ, T. et al. T Cell-Derived IL-10 Determines Leishmaniasis Disease Outcome and Is Suppressed by a Dendritic Cell Based Vaccine. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, 2013.
- SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.
- SHAHA, C. Apoptosis in Leishmania species & its relevance to disease pathogenesis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 233, 2006.
- SHARMA, N. et al. Perspectives and possibilities of indian species of genus *Physalis* (L.). **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 2, n. 2, p. 326–353, 2015.
- SHER, D. S. & A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, p. 1041–1047, 11 mar. 2002.
- SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 3, p. 787–95, 1 mar. 2012.
- SILVA, D. K. C. et al. In Vitro, In Vivo and InSilico Effectiveness of LASSBio-1386, an N-Acyl Hydrazone Derivative Phosphodiesterase-4 Inhibitor, Against *Leishmania amazonensis*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. December, p. 1–14, 2020.
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in

Amazonian Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

SOARES, M. B. P. et al. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalisangulata* L. **European Journal of Pharmacology**, v. 459, n. 1, p. 107–112, 2003.

SOARES, M. B. P. et al. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalisangulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 408–414, 2006.

SOLINAS, G.; GERMANO, G.; MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, 86(5), 1065-1073, 2009.

STROPPIA, P.H.F.; ANTINARELLI, L.M.R.; CARMO, A.M.L.; GAMEIRO, J.; COIMBRA, E.S.; DA SILVA, A.D. Effect of 1,2,3-Triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 30096-2, 2017.

SUN, C. et al. Physalins V-IX, 16,24-cyclo-13,14-seco withanolides from *Physalisangulata* and their antiproliferative and anti-inflammatory activities. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4057, 22 dez. 2017.

SUN, L. et al. Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. **Redox Biology**, v. 37, p. 101759, 2020.

SUNDAR, S. et al. Amphotericin B Treatment for Indian Visceral Leishmaniasis: Conventional versus Lipid Formulations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 3, p. 377–383, 2004.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 17, n. 5, p. 787–794, 2008.

SYPEK, J. P. et al. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 6, p. 1797–1802, 1 jun. 1993.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6, p. 1–16, 2014.

TOMASSINI, T. R. R. D. S. M. B. S. D. C. D. X. N. S. B.; SOARES, I. M. R. R. O. D. A.; FERNANDEZ-FERREIRA., E. **Patent Application Publication (10) Pub. No.: US 2002 / 0103386 A1**, 2002. Disponível em:  
<<https://patentimages.storage.googleapis.com/a4/8a/75/75335f8cbb033f/US20020103386A1.pdf>>

UMETSU, D. T.; DEKRUYFF, R. H. The regulation of allergy and asthma. **Immunological Reviews**, v. 212, p. 238–255, 2006.

USHACH, I.; ZLOTNIK, A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating

factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 3, p. 481–489, 2016.

VALLI, M.; BOLZANI, V. S. Natural products: Perspectives and challenges for use of brazilian plant species in the bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 91, p. 1–7, 2019.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309–322, 2012. VÉLEZ, I. et al. Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 351–356, 2010.

VERWEIJ, J. et al. Phase II study of oral miltefosine in patients with squamous cell head and neck cancer. **European Journal of Cancer**, v. 29, n. 5, p. 778–779, 1993.

VIECELI, P. S. et al. *Physalisangulata* reduces the progression of chronic experimental periodontitis by immunomodulatory mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 273, n. July 2020, 2021.

WANG, L.; WANG, F.-S.; GERSHWIN, M. E. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. **Journal of Internal Medicine**, v. 278, n. 4, p. 369–395, out. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. **World Health Organization technical report series**, n. 949, p. 22–26, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected Tropical Diseases [Internet]. World Health Organization; 2020. Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/gho-ntd-leishmaniasis>.

WU, X. et al. T Cells Immunology in the Immunological Diseases. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1–2, 2014.

YANG, Z.; MING, X. F. Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: Impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–10, 2014.

YU, Y. et al. Investigation of the immunosuppressive activity of Physalin H on T lymphocytes. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 3, p. 290–297, 2010.

ZHANG, J. et al. NLRP3 inflammasome mediates M1 macrophage polarization and IL-1 $\beta$  production in inflammatory root resorption. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 47, n. 4, p. 451–460, 2020.

ZULKIPLI, I. N. et al. Medicinal plants: a potential source of compounds for targeting cell division. **Drug Target Insights**, 9, DTI-S24946, 2015.

**Apêndice A** - Produção científica durante o período de mestrado que não fez parte da dissertação.



## Obtainment of Macrophages from Human Monocytes to Assess *Leishmania braziliensis* Infection Rate and Innate Host Immune Response

Icaro Bonyek-Silva<sup>1,2</sup>, Sara Nunes<sup>1,2</sup>, Rana Bastos<sup>1</sup>, Reinan Lima<sup>1,2</sup>, Lellane Barbosa<sup>1,2</sup>, Gabriela Grimaldi<sup>1</sup>, Vinicius Rocha<sup>4</sup>, Milena B. P. Soares<sup>1,4</sup>, Patrícia S T Veras<sup>1,3</sup>, Juliana de Menezes<sup>1,2</sup>, Cláudia Brodskyn<sup>1,2,3</sup>, Natalia Tavares<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Oswaldo Cruz Foundation, Gonçalo Moniz Institute <sup>2</sup>Federal University of Bahia <sup>3</sup>National Institute of Science and Technology (INCT), Research Institute in Immunology <sup>4</sup>Senai Institute for Innovation in Advanced Health Systems, National Service for Industrial Learning, Integrated Manufacturing and Technology Campus, SENAI - CIMATEC Salvador

### Corresponding Author

Natalia Tavares  
natalia.tavares@focruz.br

### Citation

Bonyek-Silva, I., Nunes, S., Bastos, R., Lima, R., Barbosa, L., Grimaldi, G., Rocha, V., Soares, M.B.P., Veras, P.S.T., de Menezes, J., Brodskyn, C., Tavares, N. Obtainment of Macrophages from Human Monocytes to Assess *Leishmania braziliensis* Infection Rate and Innate Host Immune Response. *J. Vis. Exp.* (174), e62555, doi:10.3791/62555 (2021).

### Date Published

August 7, 2021

### DOI

10.3791/62555

### URL

jove.com/video/62555

### Abstract

Macrophages are multifunctional cells essential to the immune system function, and the primary host cell in *Leishmania braziliensis* (Lb) infection. These cells are specialized in microorganism recognition and phagocytosis, but also activate other immune cells and present antigens, as well as promote inflammation and tissue repair. Here, we describe a protocol to obtain mononuclear cells from peripheral blood (PBMC) of healthy donors to separate monocytes that then differentiate into macrophages. These cells can then be infected *in vitro* at different Lb concentrations to evaluate the ability to control infection, as well as evaluate host cell immune response, which can be measured by several methods. PBMCs were first isolated by centrifuging with Ficoll-Hypaque gradient and then plated to allow monocytes to adhere to culture plates; non-adherent cells were removed by washing. Next, adherent cells were cultured with macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) for 7 days to induce macrophage differentiation. We suggest plating  $2 \times 10^6$  cells per well on 24-well plates in order to obtain  $2 \times 10^5$  macrophages. Fully differentiated macrophages can then be infected with Lb for 4 or 24 hours. This protocol results in a significant percentage of infected cells, which can be assessed by optical or fluorescence microscopy. In addition to infection index, parasite load can be measured by counting the numbers of parasites inside each cell. Further molecular and functional assays can also be performed in culture supernatants or within the macrophages themselves, which allows this protocol to be applied in a variety of contexts and also adapted to other intracellular parasite species.

### Introduction



The intracellular protozoan parasite of the genus *Leishmania* is the causative agent of a neglected disease complex known as leishmaniasis<sup>1</sup>. These tropical diseases have a wide range of clinical manifestations that can range from skin lesions to complications arising from the visceral form of the disease, which can be fatal if not treated. Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most frequent form of leishmaniasis and is characterized by a single or few ulcerated skin lesions with exacerbated chronic inflammation<sup>2</sup>. The development of disease is dependent on the *Leishmania* species, in addition to a combination of factors associated with host immune response, which both define clinical outcomes<sup>3,4</sup>. *Leishmania braziliensis* is the main species that causes CL in Brazil, with cases reported throughout all states of the country<sup>5</sup>. The immune response against *L. braziliensis* is considered protective, since it restricts the parasite to the inoculation site, and involves several immune cell types, such as macrophages, neutrophils e lymphocytes<sup>4,6,7</sup>.

Macrophages are multifunctional cells essential for the immune system, since they are specialized in the detection and phagocytosis of microorganisms, and can present antigens and activate other cell types. Macrophages are able to regulate processes from inflammation to tissue repair and the maintenance of homeostasis<sup>8,9</sup>. These cells play an essential role in the early immune response against intracellular parasites, such as *Leishmania*, being important for their elimination<sup>10,11,12</sup>.

During *L. braziliensis* infection, macrophages can respond through different mechanisms to eliminate the parasite, such as the production of reactive oxygen species (ROS) and inflammatory mediators<sup>13,14</sup>. Immune responses can be guided by the production of proinflammatory or anti-inflammatory cytokines, which contribute to an exacerbated

inflammatory state or tissue repair processes<sup>6,15,16</sup>. The plasticity of macrophages is fundamental to the immunopathogenesis of CL, as well as to parasite-host interaction, and these cells are considered crucial to the elucidation of disease mechanisms and to the development of new therapeutic approaches.

As CL is a complex disease, investigations require researchers to explore cell types that mimic those found in humans. The immune responses observed in different experimental models can vary and produce results that do not reflect the immune response observed in naturally infected humans. Thus, the protocol presented herein was designed to enable the study of human macrophages and their immune responses during CL caused by *L. braziliensis*.

## Protocol

The Institutional Review Board for Ethics in Human Research at the Gonçalo Moniz Institute (Oswaldo Cruz Foundation-IGM-FIOCRUZ, Salvador, Bahia-Brazil), approved this study (protocol number: CAAE 95996618.8.0000.0040).

### 1. Isolation of human PBMCs

1. Ensure that the blood samples, 1.077 g/mL density gradient (e.g., Ficoll-Histopaque), and saline solution are at room temperature.
2. Dilute blood samples with saline solution at 1:1 ratio.
3. Transfer 10-12 mL of density gradient to 50 mL tubes.
4. Carefully overlay up to 40 mL of the diluted blood sample on top of density gradient. Separate the blood and density gradient layers.
5. First centrifugation: centrifuge tubes containing blood and density gradient layers at 400 x g for 30 min at 24 °C.

- NOTE:** Switch-off the brake before starting the centrifuge.
6. Remove the plasma above the PBMC ring with a pipette (the buffy coat layer is located between the plasma and density gradient layers; below that are red blood cells/granulocytes pellet).
  7. Transfer the cloud-like PBMC layer (buffy coat layer) with a pipette to a 15 mL tube and fill with cold saline (kept on ice or at 4 °C).
  8. Second centrifugation: centrifuge tubes at 300 x g for 10 min at 4 °C with the brake switched-on.
  9. Discard the supernatant and resuspend the pellet by filling the tube with cold saline.
  10. Third centrifugation: centrifuge tubes at 250 x g for 10 min at 4 °C with the brake switched-on.
  11. Discard the supernatant and resuspend the pellet, filling the tube with cold saline.
  12. Fourth centrifugation: centrifuge the tube at 200 x g for 10 min at 4 °C with the brake switched-on.
  13. Discard the supernatant and resuspend the pellet with 1 mL of cold RPMI medium.
  14. Count cells to determine the number of cells obtained.

## 2. Differentiation into human macrophages

**NOTE:** For a 24-well plate, calculate the amount of total cells needed to plate  $2 \times 10^6$  cells per well, which will yield  $2 \times 10^5$  macrophages. This yield is based on an average of 10% monocytes in human blood. Alternatively, monocytes can also be released by non-enzymatic methods and then counted for plating.

1. On a 24-well plate, place 13 mm round glass coverslips at the bottom of each well. Plate the equivalent of  $2 \times 10^6$  cells in 1 mL of RPMI incomplete per well.

**NOTE:** Limit the number of cells in each well, since overestimated amounts can hinder cell adhesion and compromise culturing. In addition, all coverslips must be clean and sterile.

2. Incubate plates for 30 min at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> for cell adhesion.
3. Remove the supernatants and wash once with 0.9% saline at room temperature to remove any non-adherent cells.
4. After washing, remove the saline and add 250 µL of supplemented RPMI medium at room temperature (10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 50 ng/mL M-CSF) to each well.
5. Incubate the cells for 7 days at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>.
  1. Add 125 µL of supplemented RPMI medium to each well every two days. At the end of cell differentiation, the final volume will be 500 µL per well.
  2. To analyze cell viability, perform another culture in parallel on a 96-well plate ( $2 \times 10^5$  per well).
  3. After differentiation into macrophages (7 days), add 20 µL of AlamarBlue reagent.
  4. After 7 hours of incubation, read plates on a spectrophotometer at wavelengths of 570 nm and 600 nm.

### 3. *Leishmania* culture and infection

**NOTE:** *L. braziliensis* promastigotes from two different strains (MHOM/BR/01/BA788 and MHOM/BR88/BA-3456) were used in this assay.

1. Count *Lb* parasites and calculate the volume to obtain  $5 \times 10^5$ /mL parasites.
  2. Prepare supplemented Schneider's Insect medium (10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin).
  3. Incubate parasites in a total volume of 5 mL in a 24 °C incubator until the stationary phase is reached (4 to 6 days).
- NOTE:** Count parasites every day to assess growth.
4. After reaching the stationary phase, centrifuge *Leishmania* cultures at 100 x *g* for 10 min at 4 °C to remove any dead parasites (precipitated at the bottom of the tube).
  5. Transfer the supernatant to a new tube and centrifuge at 1,800 x *g* for 10 min at 4 °C to recover viable parasites. Discard the supernatant.
  6. Resuspend the pellet with 1 mL of supplemented RPMI medium to count parasites.
  7. Calculate the volume of parasites to obtain a 10:1 parasite:cell ratio. Transfer parasites to culture plates containing macrophages previously cultured in supplemented RPMI medium (~300 µL/well) at room temperature.
  8. Remove the supernatant from each well containing differentiated macrophages.

**NOTE:** As soon as possible, replace the medium in each well to avoid cells spending extended periods without

medium. We suggest removing and replacing medium in three wells at a time.

9. Transfer the calculated amount of *Lb* to each well containing differentiated macrophages.
10. Infect cells for 4 or 24 hours at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>.
  1. After 4 hours, wash macrophages 3 times with saline at room temperature to remove any non-internalized parasites.
  2. For the 24-hour infection period, add 300 µL of supplemented RPMI medium to each well after washing, and then reincubate for another 20 hours at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>.
11. Remove the supernatant to measure inflammatory mediators using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) following the manufacturer's instructions.
  1. Centrifuge the collected supernatant at 1,800 x *g* for 10 min at room temperature. Transfer the supernatant to a new tube. This procedure is performed to remove any non-internalized parasites. Supernatants can be frozen and kept at -80°C until the time of future analysis.

**NOTE:** Cells may be used to assess infection rate, parasite viability or ROS production.

### 4. Evaluation of infection

1. Quantification of infection rate
  1. Add 300 µL of methanol to each well after removing the supernatant. Allow 15 min to fix cells adhered to coverslips.
  2. Remove the coverslips from the wells and place on a support to soak in the cell staining solution (e.g., Quick Panoptic 2) for 1 min.

3. Submerge coverslips twice in cell staining solution (e.g., Quick Panoptic 3) and wait until dried.
  4. Place 15  $\mu$ L of mounting medium (e.g., Entellan) on slides, and then place coverslips over the medium.  
**NOTE:** All macrophages attached to coverslips should be in contact with the mounting medium.
  5. Count 100 cells at random under an optical microscope using an 100x objective to quantify infection rate and number of internalized amastigotes.
2. Parasite viability
1. After 4 hours of infection, wash cells with saline at room temperature 3 times.
  2. Add 300  $\mu$ L of supplemented Schneider's Insect medium.
  3. Incubate in a 24 °C incubator.
  4. Quantify parasite growth after 48, 72, 96 and 120 hours.

### 5. Evaluation of ROS production by fluorescence microscopy

1. After the infection period, remove the supernatant and wash cells with 500  $\mu$ L of saline.
2. Add 300  $\mu$ L of the fluorogenic probe reagent (e.g., CellROX Green Reagent at 5  $\mu$ M) to each well.
3. Incubate cells for 30 min at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.
4. Wash cells 3x with 500  $\mu$ L of phosphate buffered saline (PBS).
5. Fix cells with 300  $\mu$ L of 3.7% formaldehyde and let sit for 15 min.

**NOTE:** Measure the fluorescence signal within 24 hours.

6. Add 5  $\mu$ L of DAPI staining agent (e.g., DAPI ProLong Gold antifade) for cell staining. Place the coverslip with the surface containing macrophages in direct contact with the DAPI staining agent.
7. Analyze the fluorescence signal by fluorescence microscopy at an excitation wavelength of 485/520 nm.
8. Calculate the Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF) from 30 cells for each coverslip using ImageJ.  
CTCF = Integrated Density (Area of a selected cell x Mean fluorescence of background readings)

### 6. Statistical analysis

1. Use the Mann-Whitney test to compare two groups with unpaired samples. Perform the statistical analyses using GraphPad Prism 7.0. Consider differences statistically significant when  $p < 0.05$ .

### Representative Results

The comprehension of parasites and host cells interaction is crucial to elucidate mechanisms involved in the pathogenesis of several diseases. Although cultured human cells are less used due to limitations of cell culture compared to cell lineages, the protocol presented herein shows a robust and reproducible differentiation of human macrophages. This protocol enables the analysis of several aspects of the immune response and cell biology, from the production of inflammatory mediators up to the susceptibility of an infectious agent in human macrophages.

The first evidence that cellular differentiation is taking place is macrophage morphology (**Figure 1A**). On the plating day, cells are rounded and small when compared to the morphology after seven days of culture. The cellular spreading is observed when cultures are treated

with macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). In the absence of M-CSF, cell differentiation takes more time and results in a heterogeneous population of macrophage-like cells (data not shown). After 7 days of differentiation, macrophages were incubated with the Alamarblue reagent for 24 hours until reading. This method allows the quantification of the cellular capacity to reduce resazurin to resorufin, thus differentiating viable from dead cells. The "ctrl" group refers to macrophages cultured for 7 days in supplemented medium, while the "dead" group refers to macrophages submitted to osmotic lysis during differentiation, which serves as a control for the technique. Once the differentiation is complete (for seven days), the macrophages derived from human monocytes remain viable and prompt for further assays that can last up to 24 hours after differentiation (**Figure 1B**) or few days (data not shown).

The first moments of interaction between *Leishmania* and a phagocyte is marked by close contact that will culminate in phagocytosis and internalization of the parasite. To understand the process of infection will help to explain the mechanisms involved in parasite killing or susceptibility to a certain pathogen. Based on the results, the first four hours of infection present the highest infection rate of *L. braziliensis* (both BA788 and BA3456 tested strains). After 24 hours of infection, there is a reduction in the infection rate of both strains, but we found statistical significance only for BA788 (**Figure 2A, D**). Considering longer periods of infection, no internalized parasites were found inside the cells after 72 hours (data not shown), suggesting that human macrophages are able to control *L. braziliensis* infection *in vitro*. The infection rate is measured by the count of 100 cells and, among those, the infected ones. This estimates the percentage of infection, which can vary due to the immune response of the cell donor, the amount of *Leishmania*

parasites in the stationary phase and also due to the experimenter bias. **Figure 2H** shows representative images of a low infection rate (left) and a higher rate (right) by optical microscope.

Another data that can be assessed in cultured human macrophages is the parasite load, which is important to indicate the ability of macrophages to control the infection. It is measured by the average of internalized parasites in each cell and, after different time points, it is possible to determine whether the number of parasites has increased or reduced (**Figure 2B, E**). Finally, results of parasite viability further assemble information about the infection control. It is measured by the count of viable parasites in the culture after replacing RPMI to Schneider medium. Regarding *L. braziliensis* infection, we have already tested different time points, such as 48 h, 72 h, 96 h and 120 h to quantify viable parasites. The results indicate that 72 hours is recommended to evaluate parasite viability in these conditions (**Figure 2G**).

Based on our protocol, it is also possible to measure the inflammatory response against *L. braziliensis* infection in culture supernatant as soon as 4 hours after the infection. We were able to detect IL-6, TNF- $\alpha$  and LTB<sub>4</sub> (**Figure 3A-C**), but IL-10 and IL-1 $\beta$  production was below the detection level (data not shown).

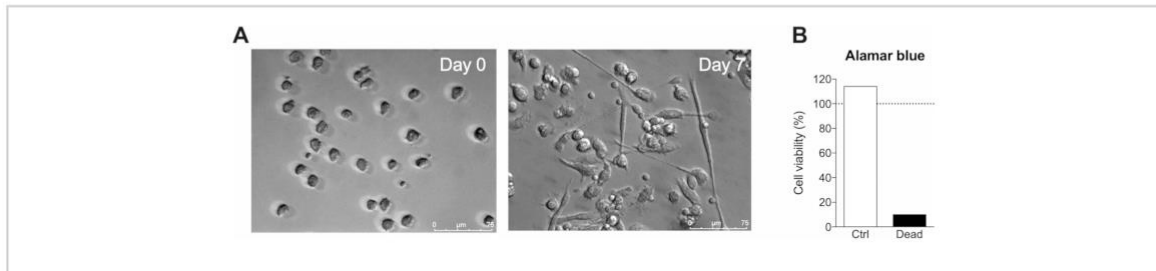
Another important aspect of the immune response against *L. braziliensis* is the production of reactive oxygen-derived species (ROS) by macrophages. This is one of the main mechanisms for parasite killing. The protocol presented herein shows that ROS production from macrophages is significantly increased after 4 hours of infection (**Figure 4A**). The quantification of ROS based on corrected total cell fluorescence (CTCF) allowed the detection of almost

twice the ROS production between infected and uninfected macrophages (**Figure 4B**).

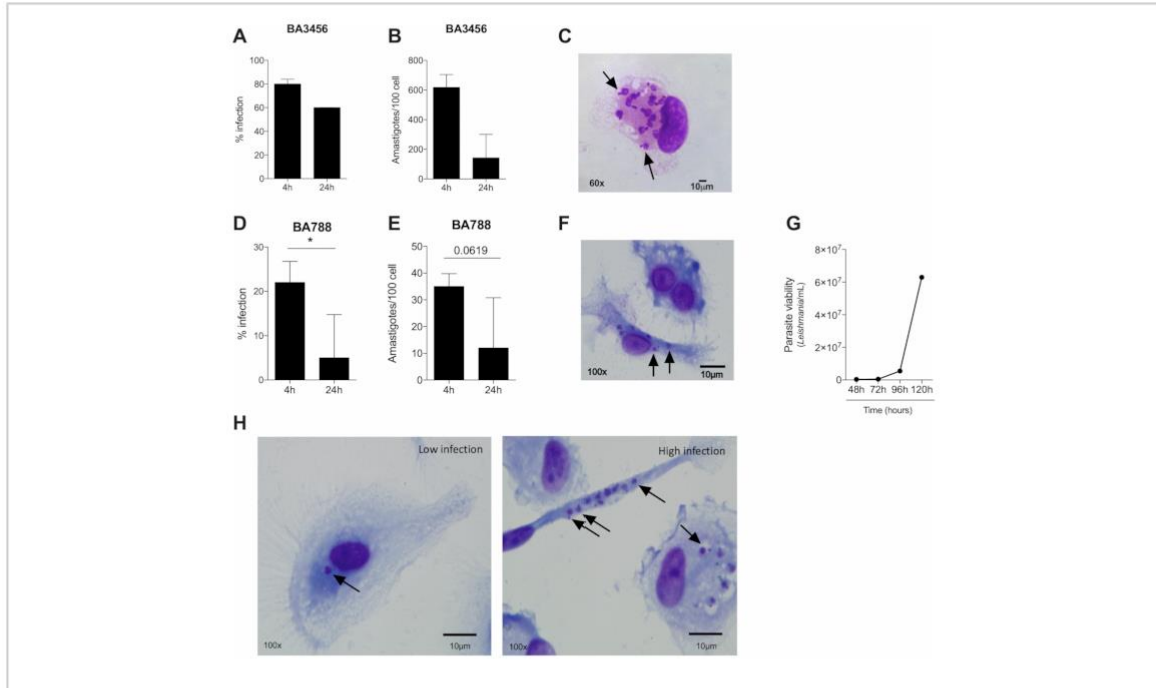
Together, the results show that macrophage derived from human monocytes allows the study of several aspects of the

immune response against *L. braziliensis* infection *in vitro*.

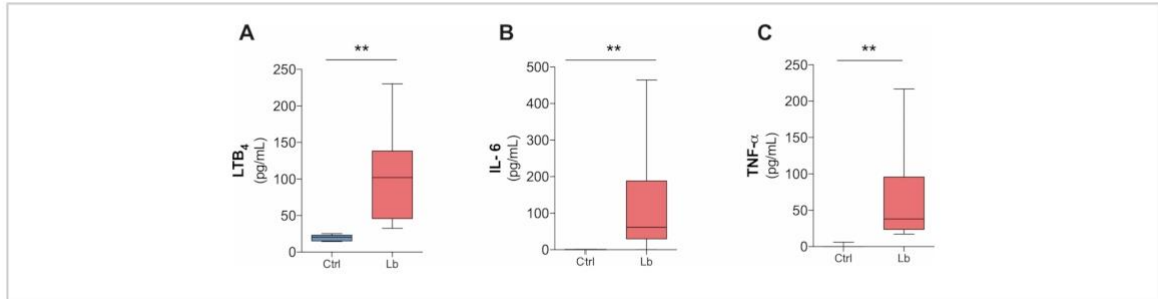
Thus, this protocol enables research groups to further explore the role of human macrophages in leishmaniasis, minimizing the bias of lineage or murine cell models.



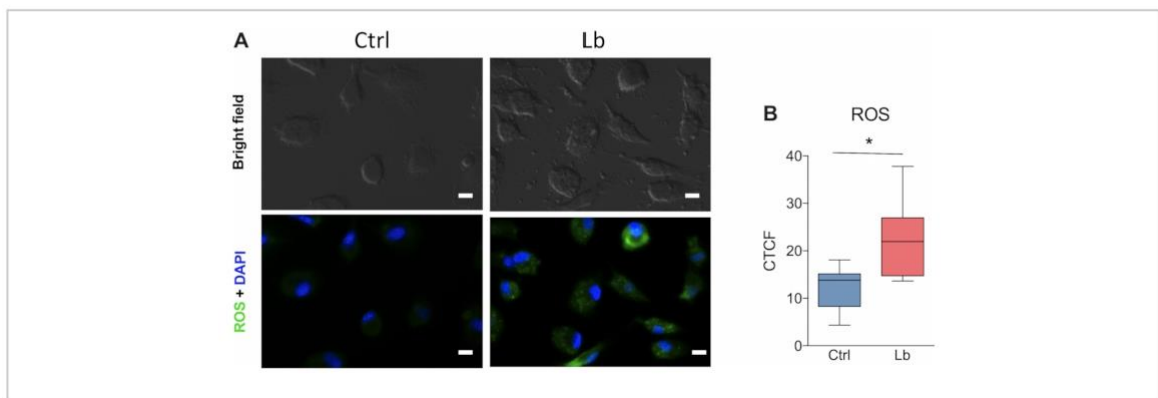
**Figure 1. Cell morphology during human macrophage differentiation *in vitro*.** (A) Representative images of the morphology of adherent cells at first day of culture (left) and after seven days of differentiation. (B) Cell viability after culture for seven days for differentiation. Ctrl = macrophages in culture with supplemented medium; Dead = macrophages subjected to osmotic lysis; Objective 60x; n = 3. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 2.** Several parameters of infection caused by two strains of *Leishmania braziliensis* can be assessed by optical microscopy. (A, D) Infection rate (B, E), parasite load (four and 24 hours of infection) and (C, F) representative images of macrophages infected by *L. braziliensis* from BA5456 (A-C) or BA788 (D-E) strains (four hours of infection). (G) Macrophage-derived viable *L. braziliensis* after four hours of infection with BA788 strain. (H) Representative images of human macrophages infected by *L. braziliensis* (BA788 strain) showing low (left) and high infection rate (right). Arrows = intracellular amastigotes; Scale bar 10  $\mu\text{m}$ ; \* $p < 0.05$ ; (A,B)  $n = 3$ ; (D,E)  $n = 6$ ; (G)  $n = 6$ . [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 3.** *L. braziliensis*-induced production of inflammatory mediators by human macrophages in four hours after infection. (A) LTB<sub>4</sub>, (B) IL-6 and (C) TNF- $\alpha$  production in culture supernatant after four hours infection by *L. braziliensis* (BA788 strain) measured by ELISA. \*\* $p < 0.01$ ;  $n = 5$ . [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 4.** ROS production by human macrophages after *in vitro* infection with *L. braziliensis*. (A) Representative images of ROS fluorescent labelling in cultured human macrophages after four hours of infection by *L. braziliensis* (BA788 strain). (B) Quantification of ROS production based on the corrected total cell fluorescence (CTCF) using Image J. Green = ROS; Blue = nucleus; Scale bar 10  $\mu\text{m}$ ; \*  $p < 0.05$ ;  $n = 6$ . [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

## Discussion

The protocol presented herein for human monocytes differentiation into macrophages followed by the infection with two strains of *L. braziliensis* allows the evaluation of several aspects of parasite-cell interaction. These tools can be crucial to elucidate unanswered questions about

CL. With the establishment of this protocol, our group was able to uncover some aspects of the immune response of macrophages obtained from individuals with diabetes and CL<sup>14</sup>.



The differentiation process of monocytes into human macrophages is complex and requires attention from the first day of culture. The researcher must monitor the differentiation, checking the development of the culture by cellular morphology daily. Usually, the culture of monocytes for seven days with M-CSF containing medium is sufficient for complete differentiation. It is important to mention that cell morphology depends on the donor, thus several stages of cellular differentiation can be observed between donors. This can be overcome with an increase in the number of donors, which will allow the identification of outliers. Moreover, the use of M-CSF is crucial for fully differentiation into macrophages<sup>17</sup>; otherwise, it will result in a highly heterogeneous population of dendritic cells-like, macrophage-like cells and monocytes. Other growth factors or a combination of these has been used as tools to further polarize macrophages into M1 or M2 profile<sup>17,18</sup>. Several studies have shown that macrophages cultured with M-CSF develop an M2 profile, while cells treated with GM-CSF exhibit an M1 profile<sup>19</sup>. However, macrophages cultured with M-CSF can polarize to the M1 profile after stimulation<sup>20</sup>. Based on the results, we were unable to determine a macrophage profile prior to infection, but hypothesize that this probably trended toward an M2 profile. On the other hand, after 4 hours of infection, macrophages produced high levels of pro-inflammatory cytokines and ROS, which is characteristic of a classic macrophage profile. Another relevant aspect about the infection of macrophages with *Leishmania* is the dispersion observed in the percentage of infected cells (infection rate). This is a marked feature of assays with human macrophages, also due to the responsiveness of each donor. To minimize this effect, the stationary-phase of *Leishmania* cultures should be confirmed and methods to purify metacyclic promastigotes can be considered<sup>21,22,23</sup>. In addition, our findings show that increased infection periods

result in a decrease in the infection rate, since human macrophages seem to be able to control *L. braziliensis*.

The interaction of macrophages and *Leishmania* involves the production of mediators that are a combination of a protective response of the host cell to kill the parasite and escape mechanisms developed by each *Leishmania* species. Thus, to define the profile of mediators produced during the infection is essential to understand the pathogenesis of CL<sup>24</sup>. Based on our protocol, it is possible to measure pro-inflammatory mediators after 4 hours of infection with *L. braziliensis*. With this method, we were also able to show this inflammatory response of macrophages from individuals with diabetes after infection *in vitro* with *L. braziliensis*<sup>14</sup>. The possibility to evaluate different inflammatory mediators is crucial to better understand CL as a chronic inflammatory skin disease<sup>24,25,26</sup>.

The production of mediators involved in parasite killing also play a significant role in the disease development and outcome. It has already been described that ROS production is one of the most efficient mechanism to control *L. braziliensis* infection<sup>13,14</sup>. The protocol presented herein allow the evaluating of ROS production within the macrophages infected by *L. braziliensis* using fluorescence microscope. ROS production seems to be key to define susceptibility to the infection<sup>14,25</sup>. Unlike other methods, the quantification of ROS through fluorescence microscopy has the advantage of locally identifying production inside the cell. Other methods only allow the indirect quantification of ROS production from an entire cell population, without considering that cells can respond differently to the same stimulus<sup>13,25</sup>.

In summary, the results show that the protocol described herein enables studies that aim to explore the interaction between macrophages and *L. braziliensis*, assessing aspects

such as the infection rate, parasite killing and production of mediators. This allows to extrapolate the findings and to correlate it with naturally occurring mechanisms.

### Disclosures

The authors declare they have no competing financial interests.

### Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) under Grant number PET0009/2016 and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) under Finance Code 001.

### References

- Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. **27** (5), 305-318 (2004).
- Burza, S., Croft, S.L., Boelaert, M. Leishmaniasis. *The Lancet*. **392** (10151), 951-970 (2018).
- Arenas, R., Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M.R., Ruiz-Esmenjaud, J. Leishmaniasis: A review. *F1000Research*. **6** (May), 1-15 (2017).
- Scott, P., Novais, F.O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*. **16** (9), 581-592 (2016).
- Bittencourt, A.L., Barral, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **86** (1), 51-56 (1991).
- Scorza, B.M., Carvalho, E.M., Wilson, M.E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences*. **18** (6) (2017).
- Carvalho, L.P., Passos, S., Schriefer, A., Carvalho, E.M. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*. **3**(OCT), 1-9 (2012).
- Wood, W., Martin, P. Macrophage Functions in Tissue Patterning and Disease: New Insights from the Fly. *Developmental Cell*. **40** (3), 221-233 (2017).
- Okabe, Y., Medzhitov, R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nature Immunology*. **17** (1), 9-17 (2016).
- Ribeiro-Gomes, F.L. *et al.* Macrophage Interactions with Neutrophils Regulate Leishmania major Infection. *The Journal of Immunology*. **172** (7), 4454-4462 (2004).
- Liu, D., Uzonna, J.E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **2** (June), 1-8 (2012).
- Giudice, A. *et al.* Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with Leishmania braziliensis infection. *BMC Infectious Diseases*. **12** (2012).
- Morato, C.I. *et al.* Essential role of leukotriene B4 on Leishmania (Viannia) braziliensis killing by human macrophages. *Microbes and Infection*. (2014).
- Bonyek-Silva, I. *et al.* Unbalanced Production of LTB4/PGE2 Driven by Diabetes Increases Susceptibility to Cutaneous Leishmaniasis. *Emerging Microbes & Infections*. (2020).
- Tomiotto-Pellissier, F. *et al.* Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. *Frontiers in Immunology*. **9** (October), 2529 (2018).

16. Anderson, C.F., Mosser, D.M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *Journal of Leukocyte Biology*. **72** (1), 101-6 (2002).
17. Jin, X., Kruth, H.S. Culture of macrophage colony-stimulating factor differentiated human monocyte-derived macrophages. *Journal of Visualized Experiments*. **2016** (112), 6-11 (2016).
18. Rios, F.J., Touyz, R.M., Montezano, A.C. Isolation and differentiation of human macrophages. *Methods in Molecular Biology*. **1527**, 311-320 (2017).
19. Hamilton, T.A., Zhao, C., Pavicic, P.G., Datta, S. Myeloid colony-stimulating factors as regulators of macrophage polarization. *Frontiers in Immunology*. **5** (NOV), 1-6 (2014).
20. Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., Lecreur, V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cellular Immunology*. **281** (1), 51-61 (2013).
21. Wozencraft, A.O., Blackwell, J.M. Increased infectivity of stationary-phase promastigotes of *Leishmania donovani*: Correlation with enhanced C3 binding capacity and CR3-mediated attachment to host macrophages. *Immunology*. **60** (4), 559-563 (1987).
22. Sinha, R. *et al.* Genome plasticity in cultured *Leishmania donovani*: Comparison of early and late passages. *Frontiers in Microbiology*. **9** (JUL), 1-20 (2018).
23. Rebello, K.M. *et al.* *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: Influence of successive in vitro cultivation on the expression of promastigote proteinases. *Experimental Parasitology*. **126** (4), 570-576 (2010).
24. Maspi, N., Abdoli, A., Ghaffarifar, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathogens and Global Health*. **110** (6), 247-260 (2016).
25. Nunes, S. *et al.* Integrated analysis reveals that miR-193b, miR-671, and TREM-1 correlate with a good response to treatment of human Localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Frontiers in Immunology*. **9** (APR), 1-13 (2018).
26. De Moura, T.R. *et al.* Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity*. **73** (9), 5827-5834 (2005).
27. Lima, F.R., Ferreira, L.D.M., Bonyek-silva, I., Santos, R.L., Tavares, N.M. Metformin promotes susceptibility to experimental *Leishmania braziliensis* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **115** (November), 1-8 (2020).

**Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).**

1/4

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título: ESTUDO DO PAPEL IMUNOMODULADOR E ANTI-*LEISHMANIA* DA FIALINA F EM  
MACRÓFAGOS HUMANOS

**I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA**

Nome: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Responsável legal (se for o caso)

Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Pesquisador  
Versão 1.0 de 25 de janeiro de 2020

\_\_\_\_\_  
Participante



## II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

**Título da pesquisa:** ESTUDO DO PAPEL IMUNOMODULADOR E ANTI-*LEISHMANIA* DA FIALINA F EM MACRÓFAGOS HUMANOS

Local de realização: Instituto Gonçalo Moniz – IGM/FIOCRUZ

1. Pesquisadores envolvidos:
  - a. Dra. Milena Botelho Pereira Soares – IGM/FIOCRUZ
  - b. Dr. Vinícius Pinto Costa Rocha – IGM/FIOCRUZ
  - c. Dr. Cássio Santana Meira – IGM/FIOCRUZ
  - d. Msc. Patrícia Kauanna Fonseca Damasceno – IGM/FIOCRUZ
  - e. Gabriela Bittencourt Grimaldi – IGM/FIOCRUZ

### 2. Informações gerais

As células mononucleares do sangue periférico humano serão obtidas a partir de doadores saudáveis voluntários do Hemocentro do Estado da Bahia ou voluntários com idade igual ou superior 18 anos sadios, através da técnica de centrifugação por gradiente de densidade, utilizando o reagente Ficoll® para obtenção de monócitos. As células serão cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen, Califórnia), 2 mg/mL de L-glutamina (Invitrogen, Califórnia), 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Gibco), em câmara úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Os macrófagos serão obtidos através da purificação magnética dos monócitos obtidos como descrito anteriormente, utilizando beads magnéticas para seleção de células CD14<sup>+</sup>. As células recuperadas serão mantidas em presença de M-CSF por 7 dias a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> em meio RPMI suplementado como descrito anteriormente, até a completa diferenciação em macrófagos. Será avaliado os seguintes parâmetros: citotoxicidade, infecção, carga parasitária, dosagem de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos no sobrenadante das culturas e análise da expressão proteica no extrato de celular.

### 3. Descrição do estudo:

O objetivo do nosso estudo, para o qual **o (a) sr (a) está sendo convidado (a) a participar** é avaliar o efeito do tratamento com fialina F em macrófagos humanos. Neste estudo, pretendemos obter células



mononucleares de sangue periférico (PBMC) com o intuito de utilizar as mesmas para o isolamento e obtenção dos macrófagos. Posteriormente essas células serão tratadas com a fisalina F.

Caso aceite participar deste estudo, o(a) Sr(a) concordará em doar uma amostra sangue (50 mL), que será obtida por uma punção periférica, em veia do braço realizada por profissional capacitado. Este procedimento poderá gerar um desconforto mínimo no momento da punção da veia e em alguns casos pequeno acúmulo de sangue, formando hematoma local. Estas células serão levadas ao IGM/FIOCRUZ, onde serão utilizadas em estudos *in vitro*, isto é, pesquisas realizadas em laboratório, sempre preservando a sua identidade e confidencialidade dos dados.

Esta pesquisa tem por objetivo produzir conhecimentos avaliar o efeito do tratamento com fisalina F, para que seja possível desenvolver um novo remédio para o tratamento da leishmaniose cutânea. Participar dela não vai gerar para você nenhum benefício médico em curto prazo. Por este motivo, ao aceitar participar, o (a) sr (a) concordará que os pesquisadores utilizem o seu material (suas células) visando contribuir para o desenvolvimento da ciência.

Do mesmo modo, o (a) sr (a) também concordará com o descarte do material, que acontecerá ao final de cada experimento, sem necessidade de nova autorização.

**A sua participação é inteiramente voluntária, não acarretará em custos financeiros**, e, caso mude de ideia quanto à participação no estudo, o (a) sr (a) deve sentir-se livre para abandonar o estudo, sem qualquer prejuízo médico ou desconforto com a equipe do projeto.

Os resultados da pesquisa serão divulgados preservando o sigilo médico e, portanto, **a sua identidade não será revelada**.

Sinta-se à vontade para entrar em contato sempre que desejar tirar dúvidas ou solicitar maiores informações através dos telefones abaixo:

- Instituto Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz, Salvador pelo telefone (71) 3276-3272 ou 3276-3292 – Dra. Milena Botelho Pereira Soares
- Comitê de Ética em Pesquisa Instituto Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz, Salvador pelo telefone (71) 3176-2375, e email: cep@bahia.fiocruz.br.

**Diante do exposto nos parágrafos anteriores, eu, firmado abaixo, concordo em participar do estudo:**

Eu confirmo que li e compreendi a descrição do estudo de título “ESTUDO DO PAPEL IMUNOMODULADOR E ANTI-*LEISHMANIA* DA FISALINA F EM MACRÓFAGOS HUMANOS” e pude questionar o pesquisador sobre todos os aspectos do estudo até estar satisfeito (a). Compreendo que a participação no estudo é totalmente voluntária. Estou ciente do propósito, do procedimento, dos riscos e

---

Pesquisador  
Versão 1.0 de 25 de janeiro de 2020

---

Participante



dos benefícios do estudo, e isso me torna apto a participar. Estou ciente de que sou livre para sair do estudo a qualquer momento, se assim desejar. O sangue colhido e as células obtidas a partir dela serão utilizados para este projeto, descartadas ao final de cada experimento. Minha identidade jamais será publicada, e os dados colhidos permanecerão confidenciais. Declaro que recebi uma via, de igual teor, deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado e datado.

Data e assinatura procedem que este tenha sido “Lido e Aprovado”.

**1. Participante ou Representante legal**

- a. Data: \_\_\_\_\_
- b. Nome: \_\_\_\_\_
- c. Assinatura: \_\_\_\_\_

**2. Investigador:**

- a. Data: \_\_\_\_\_
- b. Nome: \_\_\_\_\_
- c. Assinatura: \_\_\_\_\_

**3. Testemunha Imparcial:**

- a. Data: \_\_\_\_\_
- b. Nome: \_\_\_\_\_
- c. Assinatura: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Pesquisador  
Versão 1.0 de 25 de janeiro de 2020

\_\_\_\_\_  
Participante