



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Amanda Vasconcelos do Nascimento

Estudo da capacidade imunomoduladora de derivados das Ftalimidas-Tiazóis em células mononucleares de portadores da Leishmaniose Tegumentar Americana

RECIFE

2021

AMANDA VASCONCELOS DO NASCIMENTO

Estudo da capacidade imunomoduladora de derivados das Ftalimidas-Tiazóis em células mononucleares de portadores da Leishmaniose Tegumentar Americana

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde como requisito para obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Luiz Carlos Alves

Co-orientadora: Virgínia Maria Barros de Lorena

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Nascimento, Amanda Vasconcelos do

Estudo da capacidade imunomoduladora de derivados das Fitalimidaz-Tiazóis em células mononucleares de portadores da Leishmaniose Tegumentar Americana / Amanda Vasconcelos do Nascimento - 2021.

90 f. : il.

Orientador: Luiz Carlos Alves

Coorientadora: Virgínia Maria Barros de Lorena

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Leishmaniose. 2. Farmacologia. 3. Tiazóis. I. Alves, Luiz Carlos (orientador). II. Lorena, Virgínia Maria Barros de (coorientadora). III. Título.

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-039-2022

AMANDA VASCONCELOS DO NASCIMENTO

Estudo da capacidade imunomoduladora de derivados das Ftalimidas-Tiazóis em células mononucleares de portadores da Leishmaniose Tegumentar Americana

Aprovado em 31/08 /2021

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde como requisito para obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Banca Examinadora

Dr. Fabrício Oliveira Souto
Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-graduação em Biologia aplicada à saúde

Dra. Ana Cristina Lima Leite
Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Dra Milena de Paiva Cavalcanti
Instituto Aggeu Magalhães
Programa de Pós-graduação em Biociencias e Biotecnologia

Dra. Amanda Silva dos Santos Aliança
Universidade CEUMA
Docente do Mestrado Profissional em Gestão de programas e serviços de saúde

Dr. Luiz Carlos Alves-Orientador
Instituto Aggeu Magalhães
Programa de Pós-graduação em Biologia aplicada à saúde

Recife
2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus. Sem a sua intervenção nada é possível.

Agradeço a minha mãe, por todo apoio, compreensão e paciência em tantos anos dedicados a academia, sempre me incentivando e mostrando o melhor caminho.

Ao meu pai e meu irmão Cleber, por estarem sempre presentes e por todo apoio.

Agradeço aos meus Avós Conceição e José por sempre me apoiarem em toda minha trajetória de estudos. Com apoio sentimental, financeiro e muitas vezes levando aquela comidinha cheia de amor ao meu trabalho.

Ao meu marido Gabriel que sempre esteve ao meu lado desde a Iniciação Científica até ao Doutorado. Apoiando-me tanto no trabalho, quando em casa, fazendo de tudo para facilitar a minha vida.

Agradeço também a luz da minha vida, minha filha Beatriz, mesmo sem saber ela é minha grande incedivadora. Por ela eu quero cada dia mais e todos os dias tento dar o meu melhor.

Aos meus tios, tias, sogros, cunhados e primos por toda a torcida para que tudo desse certo.

Ao meu orientador Luiz, primeiramente por acreditar em mim e vestir a camisa pelo projeto.

Pelos conselhos pessoais e todo carinho com minha família.

A minha Orientadora Virginia, por está comigo desde a Iniciação científica até o doutorado.

Por sempre me apoiar em tudo e por ser essa grande amiga que posso contar sempre.

A Fábio e Paulinha por todo apoio na construção do projeto e tese.

Aos meus amigos do LBCM, em especial a Nairom, Fernanda, Alberon e Rubens. Por dividir os perrengues, as conquistas, as tristezas e alegrias. Pelos cafezinhos e conversas aleatórias que me faziam um bem danado.

Aos meus amigos do LIMP, em especial a Mih, Leylla, Mineo, Debs e Joanna, pelo apoio, confiança e torcida para que tudo desse certo.

Aos meus amigos do Hemope, Michele, Priscila, Vanessa L., Vanúbia, Alyne e Diogo, por todo apoio, pelas conversas e os momentos memoráveis das nossas comilanças.

Aos meus amigos de vida, Pequeno e Rúbia, por todo carinho, confiança e força que vocês sempre me deram.

Aos pacientes e a a Secretaria de saúde do Município de Timbaúba, por todo apoio, em especial a Agente de saúde Fátima (Fatinha).

A FACEPE pela concenção da bolsa.

A CAPES e FACEPE pelo apoio financeiro ao projeto.

Meus sincereros agradecimentos a todos!

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), é um grave problema de saúde pública com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. Os atuais tratamentos da LTA apresentaram efeitos colaterais importantes e relatos de resistência. O estudo da resposta imunológica frente ao tratamento com fármacos pode ser a chave para um novo tratamento da LTA, pois a resposta imunológica do hospedeiro é decisiva para progressão da doença. Neste contexto os derivados das Ftalamidas e Tiázóis são moléculas imunomodulatórias e apresentam ação biológica contra *Leishmania infantum*. O estudo tem como objetivo avaliar a capacidade imunomoduladora desses compostos heterocíclicos da classe Ftalaminas e Tiázóis sobre as células do sistema imune de pacientes portadores da LTA expostas a antígenos de *Leishmania braziliensis*. Inicialmente foram testadas citotoxicidade dos compostos 2J e 2M sobre células mononucleares de sangue periférico (PBMC), assim como a atividade biológica dos compostos sobre a *L. braziliensis*. Após, foram selecionados 12 portadores da LTA e 08 controles negativos para obtenção das PBMC, que foram estimuladas com antígenos solúveis de *L. braziliensis* e tratadas 2J e 2M. Foi realizada a imunofenotipagem das PBMC para linfócitos TCD4⁺, com marcação para CD28 e CTLA-4 e os TCD8⁺ com marcação para CD28, CTLA-4, Granzima e IFN- γ . Os monócitos CD14⁺ foram analisados através da expressão das moléculas CD80, CD86 e HLA-DR. As PBMC foram submetidas ao processamento para as microscopias eletrônicas de Varredura e Transmissão e o sobrenadante de cultura foi coletado para dosagem das citocinas de perfil TH1/TH2. Nos resultados as moléculas 2J e 2M apresentaram taxas de concentrações inibitórias (IC₅₀) de 50,12 μ M e 64,88 μ M, respectivamente. Na citotoxicidade das moléculas em PBMC humanas, para 2J CC₅₀ de 662,49 μ M e 2M 885,28 μ M. O índice de seletividade (IS) foi aproximadamente de 13 vezes mais seletiva para a promastigota de *L. braziliensis* do que as PBMC humanas. Na expressão fenotípica em linfócitos, o tratamento com a 2M sobre células de pacientes levou a um aumento de Granzima B⁺ em TCD8⁺, na condição de cultivo C+2J. Para 2M, observamos aumento do CTLA-4 em TCD4⁺ nos controles negativos, na condição C+A+2M. Analisando as citocinas, foi visto que os antígenos aumentaram a resposta inflamatória, no grupo de pacientes. Na avaliação ultraestrutural com o tratamento da 2J e 2M, foi observado que as moléculas foram semelhantes aos controles sem tratamento. Os nossos resultados incentivam mais estudos com as moléculas no âmbito da terapêutica para LTA.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*; Ftalimidas, Tiazóis, Imunomodulação, Microscopia eletrônica.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a serious public health problem with an annual record of 1 to 1.5 million cases. Current ATL treatments have had important side effects and reports of resistance. The study of the immune response to drug treatment may be the key to a new treatment for ATL, as the host's immune response is decisive for the progression of the disease. In this context, phthalimides and thiazole derivatives are immunomodulatory molecules and have biological action against *Leishmania infantum*. The study aims to evaluate the immunomodulatory capacity of these heterocyclic compounds of the Phthalimides, and Thiazoles class on the immune system cells of patients with ATL exposed to *Leishmania braziliensis* antigens. Initially, cytotoxicity of 2J and 2M compounds on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were tested, as well as the biological activity of the compounds on *L. braziliensis*. Afterwards, 12 ATL patients and 08 negative controls were selected to obtain PBMC, which were stimulated with soluble *L. braziliensis* antigens and treated 2J and 2M. PBMC immunophenotyping was performed for TCD4⁺ lymphocytes, labeled for CD28⁺ and CTLA-4⁺, and TCD8⁺ labeled for CD28⁺, CTLA-4⁺, Granzyme B⁺ and IFN- γ ⁺. CD14⁺ monocytes were analyzed through the expression of CD80⁺, CD86⁺ and HLA-DR⁺ molecules. The PBMC were submitted to processing for Scanning and Transmission electron microscopy and the culture supernatant was collected to measure the TH1/TH2 profile cytokines. In the results, the 2J and 2M molecules presented inhibitory concentration rates (IC₅₀) of 50.12 μ M and 64.88 μ M, respectively. In the cytotoxicity of molecules in human PBMC, for 2J CC₅₀ of 662.49 μ M and 2M 885.28 μ M. The selectivity index (SI) was approximately 13 times more selective for *L. braziliensis* promastigote than human PBMC. In phenotypic expression in lymphocytes, treatment with 2M on patient cells led to an increase in Granzyme B⁺ in TCD8⁺ in the C+2J culture condition. For 2M, we observed an increase in CTLA-4 in TCD4⁺ in the negative controls, in the C+A+2M condition. Analyzing the cytokines, it was seen that the antigens increased the inflammatory response in the group of patients. In the ultrastructural evaluation with 2J and 2M treatment, it was observed that the molecules were like the untreated controls. Our results encourage further studies with the molecules in the context of ATL therapy.

Keywords: *Leishmania braziliensis*; Phthalimides,; Thiazoles; Immunomodulatory; Microscopy, Electron.

LISTA ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -Ciclo Biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	15
Figura 2 - Status de endemicidade da LTA no mundo.....	17
Tabela 1 - Formas Clínicas, possíveis agentes etiológicos e principais manifestações clínicas da LTA.....	17
Figura 3 - Recrutamento e diferenciação dos monócitos durante a infecção por <i>Leishmania</i> spp.....	21
Figura 4 - Figura esquemática da estrutura das Ftalimidas.....	30
Figura 5 - Figura esquemática da estrutura dos Tiazóis.....	31
Tabela 2 - Anticorpos utilizados nos ensaios de imunofenotipagem da cultura de PBMC de pacientes com LTA e os controles negativos.....	38
Figura 6 - Estratégia de aquisição e análise em gráfico do tipo dot plot para linfócitos e monócitos.....	39
Tabela 3 - Média e desvio padrão da IC ₅₀ , CC ₅₀ e determinação do índice de seletividade (IS) das moléculas 2M, 2J e Anfotericina B.....	37
Figura 7 - Viabilidade das Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis tratados com as moléculas 2J e 2M.....	43
Figura 8 - Viabilidade das Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis tratados com a Anfotericina B.....	44
Figura 9 - Gel de eletroforese SDS-PAGE corado por azul de Coomassie demonstrando o padrão de bandejamento da fração protéica solúvel purificada de cultura de promastigotas de <i>L. braziliensis</i> (AgST) em concentrações de 20 e 40 microgramas.....	45
Figura 10 - Dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e INF- γ no sobrenadante de PBMC estimuladas com antígenos solúveis de <i>L. braziliensis</i> e tratadas com a molécula 2J.....	47
Figura 11 - Dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e INF- γ no sobrenadante de PBMC estimuladas com antígenos solúveis de <i>L. braziliensis</i> e tratadas com a molécula 2M.....	48
Figura 12 - Expressão dos marcadores fenotípicos para linfócitos CD4+(moléculas CD28+ e CTLA-4) e T CD8+(e moléculas CD28, IFN e Granzima) em PBMC de pacientes com LTA, desafiadas ao antígeno solúvel de <i>L. braziliensis</i> e tratadas com a molécula 2J.....	50

Figura 13- Expressão dos marcadores fenotípicos para linfócitos CD4 ⁺ (moléculas CD28 ⁺ e CTLA-4) e T CD8 ⁺ (e moléculas CD28, CTLA-4, IFN e Granzima) em PBMC de pacientes com LTA, desafiadas ao antígeno solúvel de <i>L. braziliensis</i> e tratadas com a molécula 2M.....	51
Figura 14- Expressão dos marcadores fenotípicos para monócitos CD14 e as moléculas CD80 ⁺ , CD86 ⁺ e HLA-DR em PBMC de pacientes com LTA, desafiadas ao antígeno solúvel de <i>L. braziliensis</i> e tratadas com as moléculas 2J e 2M.....	53
Figura 15- Dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ no sobrenadante de PBMC de portadores da LTA e controles negativos, desafiadas <i>in vitro</i> com antígenos solúveis de <i>L. braziliensis</i> e tratadas com a molécula 2J e a Anfotericina.....	56
Figura 16- Dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ no sobrenadante de PBMC de portadores da LTA e controles negativos, desafiadas <i>in vitro</i> com antígenos solúveis de <i>L. braziliensis</i> e tratadas com a molécula 2M e a Anfotericina.....	57
Figura 17- Eletromicrografia de Linfócitos estimulados com antígenos de <i>L. braziliensis</i> e tratados a molécula 2J e anfotericina.....	59
Figura 18- Eletromicrografia de Linfócitos estimulados com antígenos de <i>L. braziliensis</i> e tratados com compostos 2M e anfotericina.....	60
Figura 19- Eletromicrografia de monócitos estimulados com antígenos de <i>L. braziliensis</i> e tratados com a molécula 2J e anfotericina.....	61
Figura 20- Eletromicrografia de monócitos estimulados com antígenos de <i>L. braziliensis</i> e tratados com a molécula 2M e anfotericina.....	62
Figura 21- Eletromicrografia de transmissão dos linfócitos estimulados com antígenos de <i>L. braziliensis</i> e tratados com a molécula 2J e anfotericina.....	65
Figura 22- Eletromicrografia de transmissão dos linfócitos estimulados com antígenos de <i>L. braziliensis</i> e tratados com a molécula 2M e anfotericina.....	66
Figura 23- Eletromicrografia de transmissão dos monócitos estimulados com antígenos de <i>L. braziliensis</i> e tratados com a molécula 2J e anfotericina.....	67
Figura 24- Eletromicrografia de transmissão dos monócitos estimulados com antígenos de <i>L. braziliensis</i> e tratados com a molécula 2M e anfotericina.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AgIT- Frações antigênicas insolúvel
- AgST- Frações antigênicas solúvel
- CBA- *Cytometric beads Array*
- DMSO- Dimetilsulfóxido
- ELISA-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- ERRO-Espécies reativas de oxigênio
- ERN- Espécies reativas do nitrogênio
- Fc- Fragmento cristalizável
- FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz
- Ftalil-Tiazóis- Ftalimidas e tiazóis
- IAM- Instituto Aggeu Magalhães
- IDRM- Intradermorreação de Montenegro
- IFI- Imunofluorescência indireta
- LCL- Leishmania Cutâneo Localizada
- LCDA- Leishmaniose Cutânea Difusa Anergica
- LD- Leishmaniose Disseminada
- LM- Leishmaniose Mucocutânea
- LPS- Lipopolissacarídeo
- LTA- Leishmaniose Tegumentar Americana
- LV- Leishmaniose Visceral
- MTT- [3(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo] -azul de tetrazólio)
- OMS- Organização Mundial da Saúde
- PBMC- Células mononucleares do sangue periférico
- PBS- *Phosphate-Buffered Saline*
- Pha- Fitohemaglutinina
- SBF- Soro bovino fetal
- TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Objetivos	13
1.1.1 Geral	13
1.1.2 Específicos	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Leishmanioses: Aspectos Gerais	14
2.2 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA): Aspectos Epidemiológicos e Clínicos	16
2.3 Aspectos Imunológicos da LTA	19
2.3.1 Resposta Imune Inata	19
2.3.1.1 Monócitos CD14 ⁺	20
2.3.2 Resposta Imune Adaptativa	23
2.3.2.1 Linfócitos T auxiliares (T CD4)	25
2.3.2.2 Linfócitos T CD8 citotóxicos e inflamatórios	26
2.4 Diagnóstico e Tratamento	28
2.5 Compostos Heterocíclicos: Novas Alternativas Terapêuticas para Leishmanioses	29
3 JUSTIFICATIVA	32
4 METODOLOGIA	33
4.1 Cultivo <i>in vitro</i> das formas promastigostas de <i>Leishmania braziliensis</i>	33
4.2 Obtenção de antígenos solúveis totais de <i>L. braziliensis</i>	33
4.3 Tratamento com os compostos Heterocíclicos	33
4.4 Atividade Biológica <i>in vitro</i> das promastigotas de <i>L. braziliensis</i> tratadas com os compostos 2J e 2M	34
4.5 Seleção de Pacientes	34
4.6 Coleta de sangue	35
4.7 Confirmação sorológica para LTA dos pacientes selecionados	35
4.8 Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)	35
4.9 Citotoxicidade das moléculas 2J, 2M e Anfotericina B em células mononucleares humanas	36
4.10 Cultura <i>in vitro</i> de PBMC, antígenos solúveis de <i>L. braziliensis</i> tratamento com as moléculas 2J e 2M	36

4.10.1 Cinética de tempo de cultivo versus resposta Imunológica.....	37
4.11 Imunofenotipagem de Linfócitos e Monócitos.....	37
4.12 Citometria de fluxo	38
<i>4.12.1 Aquisição e análise de linfócitos e monócitos.....</i>	<i>39</i>
4.13.1 A detecção de níveis de citocinas no sobrenadante de cultura de PBMC por Cytometric Bead Array (CBA).....	40
4.14 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	40
4.15 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	41
4.17 Análises estatísticas	41
4.18 Aspectos Éticos	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Atividade Biológica <i>in vitro</i> das promastigotas de <i>L. braziliensis</i> tratadas com as moléculas 2J, 2M e anfotericina B.....	42
5.2 Citotoxicidade das moléculas 2J, 2M e Anfotericina B em células mononucleares humanas.....	42
5.3 Obtenção dos antígenos solúveis.....	44
5.4 Cinética de tempo de cultivo versus resposta Imunológica	45
5.5 Expressão de moléculas de ativação/inibição em Linfócitos.....	49
5.6 Expressão de moléculas co-estimulatórias em Monócitos CD14⁺.....	52
5.7 Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura	54
5.8 Microscopia eletrônica de Varredura de PBMC estimuladas com antígenos de <i>L. braziliensis</i> e tratadas as moléculas 2J e 2M	58
5.9 Microscopia eletrônica de Transmissão de PBMC estimuladas com antígenos de <i>L. braziliensis</i> e tratadas as moléculas 2J e 2M	63
6 DISCUSSÃO.....	69
7 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE A- Termo de consentimento livre e esclarecido do portador da LTA.....	86
APÊNDICE B- Termo de consentimento livre e esclarecido do não portador da LTA.....	88
ANEXO A- Aprovação no Comitê de Ética de Pesquisa em humanos (CEP).....	90

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), é um grave problema de saúde pública e apresenta distribuição mundial, com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos e é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das seis mais importantes doenças infecciosas (BRASIL, 2017). Esta enfermidade pode levar a ulcerações simples de pele, as quais podem produzir metástases na região oronasal, causando destruição tecidual, em alguns casos extremamente mutilantes (BRITO et al., 2012).

É descrito na literatura que LTA em humanos induz a produção de citocinas do perfil Th1 como IFN- γ e TNF- α . Além disso, a ativação macrofágica e destruição do parasita, estariam associados a proteção contra a doença e os mecanismos de morbidade atrelados a maior produção de citocinas do perfil Th2, como IL-4, IL-10 e TGF- β (AMEEN, 2010). No entanto, a resposta imunológica favorável a cura clínica de pacientes com LTA seria um predomínio da resposta Th1 com o contrabalanço da Th2, evitando a exacerbação da resposta inflamatória e consequentemente os danos teciduais (BRELAZ et al, 2012; SCOOT; NOVAIS, 2016)

O estudo da resposta imunológica frente ao tratamento com fármacos é indispensável para a avaliação da eficácia de compostos promissores para o tratamento da LTA, visto que a resposta imunológica do hospedeiro frente a infecção é decisiva para progressão dos sintomas clínicos da doença (PASSERO et al., 2010; GATTO et al., 2015).

O tratamento da LTA no Brasil é realizado utilizando os antimoniais pentavalente N-metil glucamina (Glucantime), droga de primeira escolha (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Estes fármacos foram introduzidos ainda na década de 40, sendo utilizado até os dias atuais, apesar de relatos de efeitos colaterais e a crescente taxa de falha terapêutica. Além dessas limitações, o tratamento atual apresenta longos períodos e sua administração é principalmente por via venosa, favorecendo abandono da quimioterapia antes do seu término (TIUMAN et al., 2012).

Diante do que foi exposto, a descoberta de novos fármacos com ação leishmanicida se faz necessária. Neste contexto os compostos heterocíclicos da classe das Fitalaminas e Tiázóis vem se mostrando como importantes imunomoduladores e demonstrando formulações com grande perspectivas de atividade leishmanicida (ALIANÇA et al., 2017). O estudo proposto tem como objetivo principal avaliar a capacidade imunomoduladora desses compostos heterocíclicos da classe Fitalaminas e Tiázóis sobre as células do sistema imune de pacientes portadores da LTA expostas a antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Avaliar a capacidade imunomodulatória dos compostos heterocíclicos sintéticos da classe Ftalil-Tiazóis na resposta imunológica de portadores da LTA, estimuladas por antígenos de *L. braziliensis in vitro*.

1.1.2 Específicos

- a) Avaliar a ativação dos monócitos CD14⁺ através da frequência das moléculas CD80⁺ e CD86⁺ em células de pacientes positivos para LTA, expostas ou não aos antígenos de *L. braziliensis* e aos compostos heterocíclicos sintéticos da classe Ftalil-Tiazóis;
- b) Avaliar a presença de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e a frequência das moléculas CD28⁺ e CTLA-4 em pacientes positivos para LTA, expostas ou não aos antígenos de *L. braziliensis* e os compostos heterocíclicos sintéticos da classe Ftalil-Tiazóis;
- c) Caracterizar por microscopia eletrônica de transmissão e varredura a ação dos compostos heterocíclicos sintéticos da classe Ftalil-Tiazóis em PBMC de pacientes positivos para LTA estimuladas ou não com antígenos *L. braziliensis*;
- d) Dosar as citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2 no sobrenadante do co-cultivo de células mononucleares de pacientes positivos para LTA, estimuladas ou não com antígenos de *L. braziliensis* e os compostos heterocíclicos sintéticos da classe Ftalil-Tiazóis;

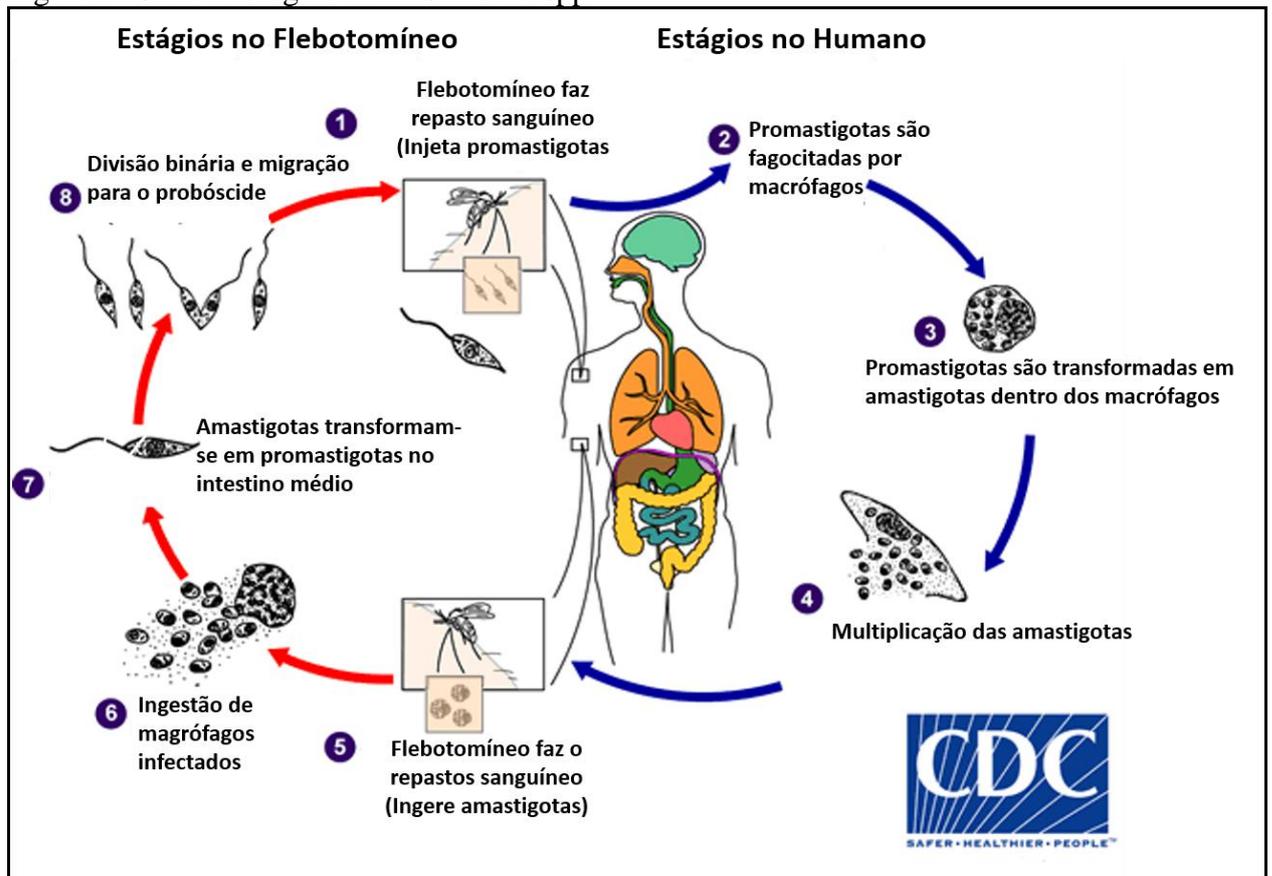
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmanioses: Aspectos Gerais

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias, causadas por protozoários da ordem Kinetoplasta, família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*, transmitidas ao homem através da picada de insetos vetores hematófagos, conhecidos como flebotomíneos (MARZOCHI; MARSDEN, 1991). Caracterizam-se por apresentar apenas duas formas evolutivas durante o seu ciclo biológico: as amastigotas, presentes no citoplasma de macrófagos do hospedeiro vertebrado e as promastigotas que se desenvolvem no intestino do inseto vetor.

O ciclo biológico dos parasitos do gênero *Leishmania* compreende uma fase no hospedeiro invertebrado onde os parasitos se multiplicam por divisão binária, e outra fase no hospedeiro vertebrado no qual formas amastigotas vivem e se multiplicam no interior dos vacúolos dos macrófagos. Os flebotomíneos fêmeas são infectados quando formas amastigotas são ingeridas durante o repasto sanguíneo. No trato digestivo do flebotomíneo, o parasito sofre modificações e se transforma em promastigota, tornando-se novamente infectante ao hospedeiro definitivo mamífero (NEVES, 2004) (Figura 1).

A infecção por *Leishmania* spp afeta as células do sistema mononuclear fagocitário apresentando uma variedade de síndromes, conforme o tropismo da espécie infectante. Embora a maioria dos protozoários são introduzidos através da pele, as manifestações clínicas podem ser generalizadas, caracterizando a Leishmaniose Visceral (LV) ou atingir a pele e /ou mucosas, como na leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). As diferenças clínicas desse protozoose é fortemente influenciada pelas diferentes espécies infectantes (PERSON et al., 1996; NEVES, 2004).

Figura 1 -Ciclo Biológico da *Leishmania* spp

Fonte: Centers for Disease Control, 2018 (Modificado pela autora).

As Leishmanioses representam uma das endemias parasitárias de maior importância em termos de saúde pública no mundo, devido a sua grande distribuição nas Américas, sobretudo na América Latina (PACE, 2014). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco em 98 países, com uma incidência anual mundial de 0,6-1,0 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea e 50.000-90.000 de leishmaniose visceral com a ocorrência de 20.000-30.000 mortes (DA SILVA *et al.*, 2019).

No cenário epidemiológico nacional, estas patologias encontram-se como doenças endêmicas, negligenciadas, com surtos epidêmicos relatados em diversos municípios, posicionando o Brasil como o principal responsável pelos casos registrados na América Latina com 26.008 casos/ano, número superior aos registrados na Colômbia (17.420 casos), Peru (6.405 casos), Bolívia (2.647 casos), Argentina (261 casos), entre outros países Latinos (ALVAR *et al.* 2012).

2.2 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA): Aspectos Epidemiológicos e Clínicos

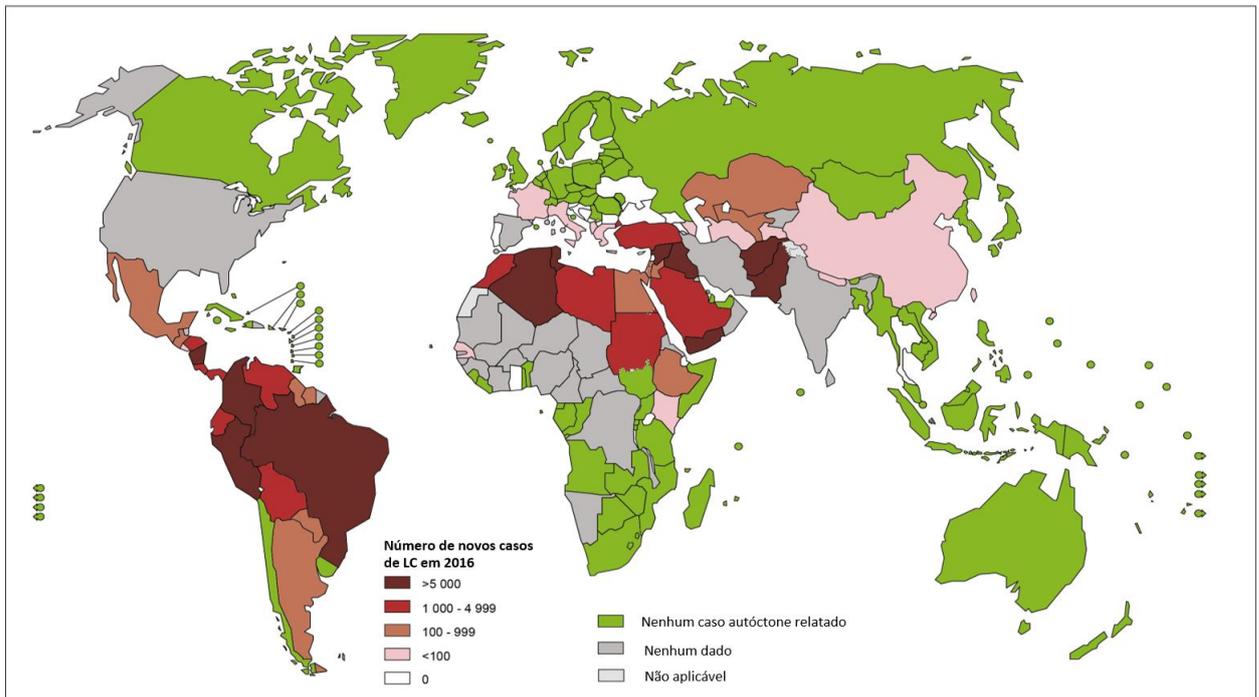
A LTA é uma neoinfecção tropical que constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das seis mais importantes doenças infecciosas (BRASIL, 2017).

No Brasil, a LTA é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional. Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras (CHAVES et al., 2008; BRASIL, 2012).

A distribuição da LTA no continente americano vai do Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina, excluindo-se o Chile e o Uruguai (Figura 2) (GONTIJO; CARVALHO, 2003) (Figura 2). No Brasil, há relato de casos da LTA em todos os Estados e acredita-se que picos de transmissão ocorram a cada cinco anos (ALVAR et al., 2012). Contudo os números de casos estimado provavelmente são subestimados, pois a incidência está sujeita a flutuações devido a fatores localizados, incluindo eventos de deslocamento populacional e turistas que viajam para áreas endêmicas correndo o risco de adquirir leishmaniose (MALAVIYA et al., 2011; AL-SALEM et al., 2016).

Em Pernambuco, observa-se uma incidência em todas as regiões do Estado, predominantemente na Zona da Mata, onde a doença é considerada endêmica e eventualmente se observam surtos. A taxa de ocorrência de casos de LTA em todo o estado é de 5,22 por 100.000 habitantes (BRITO et al., 2012). O município de Timbaúba, localizado na região norte da Zona da Mata de Pernambuco, é considerado uma área endêmica para LTA (BRASIL, 2010). Em Timbaúba, durante os anos de 2012 a 2014, houve 58 casos de LTA e a taxa de ocorrência foi de 54,7 casos por 100.000 habitantes, segundo o Sistema de Informações Brasileiras para Doenças Notificáveis (Sinan) (ARAÚJO et al., 2016).

Figura 2- Status de endemicidade da LTA no mundo



Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2016 (Modificado pela autora).

As Leishmanioses podem ser causadas por mais de 20 espécies diferentes de *Leishmania*, sendo transmitidas através de flebotomíneos hematófagos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (PAVLI et al., 2010). Uma variedade de manifestações cutâneas ocorre devido à infecção por espécies diferentes de *Leishmania*. A espécie do parasita, assim como suas diferenças genômicas parece ter uma grande importância no desfecho clínico, pois influenciam diretamente nas diferentes respostas imunológicas do hospedeiro vertebrado (SCORZA et al., 2017) (Tabela 1).

Tabela 1- Formas Clínicas, possíveis agentes etiológicos e principais manifestações clínicas da LTA

Forma Clínica	Agente Etiológico	Manifestações Clínicas
Leishmania Cutâneo Localizada (LCL)	<i>L. (L.) major</i> <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (L.) aethiopica</i> <i>L. (V.) panamanensis</i> <i>L. (L.) infantum</i> <i>L. (L.) donovani</i>	Única ou poucas lesões; úlceras com bordas elevadas e com parasitemia moderada na borda das lesões.
Leishmaniose Mucocutânea (LM)	<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) panamanensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (L.) amazonensi</i>	Lesões com exacerbação da inflamação envolvendo a membrana das mucosas; pode levar a deformações; rara presença de parasitas nas

		biópsias das lesões.
Leishmaniose Cutânea Difusa Anergica (LCDA)	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (V.) pifanoi</i> <i>L. (L.) aethiopica</i> <i>L. (L.) major</i>	Lesões multiplas, disseminadas e não ulcerativas; grande quantidade de parasitas nas lesões.
Leishmaniose Disseminada (LD)	<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) panamanensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (L.) amazonensis</i>	Numerosas lesões papulosas / acneiformes em ≥ 2 áreas não contínua do corpo; comumente envolvida nas mucosas; poucos parasitas nas lesões.

Fonte: Scorza et al., 2017 modificado pela autora.

A principal espécie, mais prevalente em seres humanos, encontrada em todas as zonas endêmicas do país é *Leishmania (Viannia) braziliensis*; transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos tais como, *Lutzomyia whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei*, entre outras (BRITO et al. 2012). A infecção causada por *L. braziliensis* pode apresentar diversas formas clínicas que vai da forma assintomática até cutâneas e mucocutâneas (CARVALHO et al., 2012).

A forma cutânea localizada (LCL) é a manifestação mais corriqueira na LTA, pode ser causada por diferentes tipos de *Leishmania spp* (Tabela1), contudo no Brasil a principal espécie causadora dessa forma da LTA é a *L. braziliensis*. Os primeiros sintomas da doença desenvolvem-se cerca de 2 a 8 semanas após a picada do flebotomíneo (SCHWARTZ et al., 2006). Após esse período incubação, ocorre o aparecimento de poucas ulcerações com bordas elevadas, variando em tamanho e geralmente em áreas expostas do corpo, como pernas e braços (MACEDO et al., 2012).

A Leishmaniose mucocutânea (LM), forma mais agressiva e mutilante, pode ocorrer como uma complicação da LCL causada por espécies de *Leishmania* pertencentes ao subgênero *Viannia*. Em regiões onde a *L. braziliensis* é endêmica, aproximadamente 1 a 10% dos pacientes com LCL evoluem para esta forma (AMATO et al., 2008). A LM pode ocorrer simultaneamente ou meses a anos após a resolução das lesões primárias, sugerindo persistência do parasita no hospedeiro humano neste intervalo (MACHADO et al., 2011). Nessa forma de leishmaniose tegumentar, o indivíduo pode apresentar lesões infiltrativas, com ulcerações e destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe e laringe (GOTO; LINDOSO, 2010).

As formas clínicas da doença que são consideradas mais incomuns são a Leishmaniose disseminada (LD) e Leishmaniose Cutâneo Difusa Anergica (LCDA) (BRASIL, 2017). A LD é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme

que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco, podendo chegar a centenas de lesões. Já as principais características clínicas da LCDA iniciam-se de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento; evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões cutâneas (HASHIGUCHI et al., 2016; SCHRIEFER, et al., 2008).

2.3 Aspectos Imunológicos da LTA

2.3.1 Resposta Imune Inata

A resposta imunológica do hospedeiro frente a infecções por *Leishmania* spp é mediada por uma rede celular e molecular (DUTHIE et al., 2012). Acredita-se que a resposta imune inicial desencadeada na LTA se caracteriza por uma reação de hipersensibilidade tardia, que se inicia com o reconhecimento do patógeno, gerando uma resposta imune inata e indução da produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimulatórias (CARRADA et al, 2007; SCHNORR et al, 2012). Assim, após a infecção por *Leishmania*, a ação coordenada de células de imunidade inata e adaptativa será determinante para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora (CASTELLUCCI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2011).

Diferentes tipos celulares da resposta imune inata interagem com moléculas do parasito (denominadas “PAMPs” – padrões moleculares associados a patógenos) através dos receptores do tipo Toll (TLRs). As interações do patógeno e esses receptores são responsáveis pela ativação da transcrição de genes nas células do sistema inato que produzem citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimulatórias (BARTON; MEDZHITOV, 2003; FLANDIN et al., 2006; VIANA et al., 2017).

Os neutrófilos possuem um papel importante nos momentos mais iniciais da infecção e são constantemente recrutados para o sítio de inoculação dos parasitos, em que tentam impedir a sobrevivência destes, através de mecanismos oxidantes e dependentes de proteases, e ao interagir com monócitos, células dendríticas e linfócitos T e B, direcionando as respostas inflamatórias envolvidas na defesa do hospedeiro e na reparação tecidual (MOURA et al, 2005; THALHOFER et al, 2011). No entanto, a cooperação entre macrófagos e neutrófilos pode contribuir para a susceptibilidade, uma vez que a fagocitose de neutrófilos apoptóticos gera mediadores anti-inflamatórios (como TGF- β e PGE2), que inibem a ativação macrófagica;

como visto em modelos de infecção por *L. amazonensis* (AFONSO et al., 2008; FARIA et al., 2012).

Apesar de amastigotas estarem no interior de neutrófilos após a infecção, é dentro dos fagócitos mononucleares que a *Leishmania* encontra um ambiente mais adequado para sua replicação e sobrevivência a longo prazo. Macrófagos dérmicos residentes apresentam amastigotas em seu interior poucas horas após a infecção e, após 24 horas, os macrófagos passam a ser a população predominantemente infectada (BOSQUE et al 2000; PETERS et al, 2008).

Os macrófagos são as células mais importantes do sistema inato na infecção por *Leishmania*, por desempenharem um papel triplo: como células hospedeiras, como células apresentadoras de antígenos (APC) e como células efetoras. Elas exercem a função de eliminação dos parasitas, através da produção de óxido nítrico e citocinas inflamatórias como INF- γ , TNF (SRIVASTAVA et al., 2012; MUNIZ et al., 2016). Contudo, em infecções por *leishmania* as atividades microbidas dos macrófagos ficam comprometidas, levando a sobrevivência e proliferação do parasito (BIRNBAUM; CRAFT, 2011). Além da função microbida, os fagócitos são o elo entre a imunidade inata e adaptativa, através da apresentação de antígenos para os linfócitos T. A resposta imunológica bem estabelecida será o determinante se haverá a cura clínica da doença ou se a patologia irá progredir (SOUZA et. al., 2013).

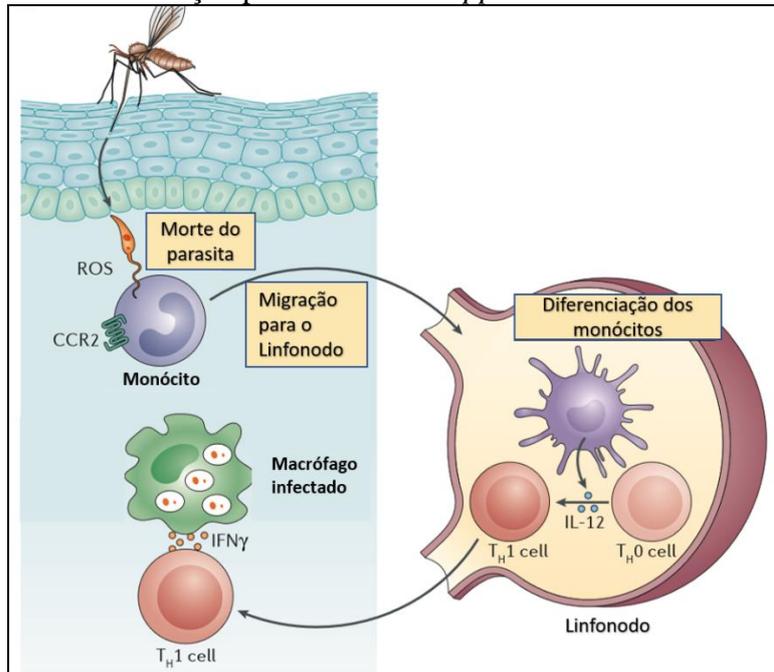
2.3.1.1 Monócitos CD14⁺

Os monócitos são células da imunidade inata, conhecidos como fagócitos mononucleares, responsáveis por desempenhar funções como defesa contra agentes infecciosos, ativação de linfócitos T e reparo tecidual. Elas infiltram-se no local da infecção e fagocitam as promastigotas nas primeiras horas após ou, mais tarde as formas amastigotas, que são libertadas das células infectadas. Essa função dos monócitos é extremamente importante, pois é um dos mecanismos responsáveis pelo controle da parasitemia na LTA (Figura 3) (GONCALVES et al., 2011).

A heterogenidade de funções dos monócitos e sua plasticidade, impulsionou estudos com o intuito de diferenciar os tipos de monócitos e culminou na divisão dos monócitos em 3 subpopulações: Clássicos, intermediários e não clássicos (ZIEGLER-HEIBROCK et al, 2010). A divisão baseia-se na intensidade de expressão de dois receptores de membrana, o CD14⁺, que é um coreceptor de TLRA-4 *Toll Like* receptor 4, receptor similar a Toll 4) e o

CD16⁺ que é um receptor lipopolissacarídeo (LPS) de baixa afinidade para imunoglobulina G (FcγRIII) (NOVAIS et al., 2015; PASSOS et al., 2014). Os monócitos clássicos, são aqueles que apresentam uma alta expressão de CD14 (CD14^{high}) e ausência do CD16⁺, o intermediário são os que expressam CD14⁺ e CD16⁺ na mesma intensidade e os não clássicos são os que apresentam uma baixa expressão de CD14 (CD14^{low}) e alta expressão de CD16 (CD16^{high}) (ZIEGLER-HEITHBROCK et al., 2010).

Figura 3- Recrutamento e diferenciação dos monócitos durante a infecção por *Leishmania spp.*



Fonte: SCOTT; NOVAIS, 2016. Adaptado pela autora.

A distinção entre os tipos de monócitos não está relacionada somente ao seu perfil fenotípico, pois estas células apresentam distinções quanto a sua capacidade de produzir citocinas, quimiocinas e apresentação de antígenos (ANSARI et al., 2012; BELGE et al., 2012). Tem sido relatado que pacientes com LTA exibem aumento das frequências de monócitos CD16⁺ no sangue, em comparação com indivíduos saudáveis, um fenômeno observado em outras doenças inflamatórias, como artrite e sepse (SOARES et al., 2006). Contudo na LTA, os 3 subconjuntos de monócitos parecem aumentar na mesma proporção no estabelecimento da doença, no entanto o papel de cada um desses tipos celulares durante o curso da infecção por *Leishmania spp* ainda permanece desconhecido (PASSOS et al., 2014).

Na LTA, o recrutamento precoce de monócitos inflamatórios (monócitos ativados por INF-γ e TNF) é dependente da quimiocina CCL2, que é produzido por células dentro do sítio de

infecção. A consequência da infecção por monócitos apresenta peculiaridades quando comparada a dos macrófagos. Os monócitos produzem uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) após infecção, levando ao controle da multiplicação de parasitas, enquanto os macrófagos precisam ser ativados pelo IFN- γ para matar os parasitas (BRONTE; MURRAY, 2015; GONCALVES et al., 2011). Contudo, a produção inicial de EROs por monócitos não é eficiente em debelar a infecção, pois os parasitas presentes nos fagossomos parecem inibir a produção de EROS. Por outro lado, quando há ativação dos macrófagos por IFN- γ , a citocina leva ao aumento da atividade respiratória dos macrófagos, levando uma melhor eliminação parasitária por este tipo celular (MATHEOUD et al., 2013; NOVAIS et al., 2015; GONCALVES et al., 2011).

Além do seu papel de controlar a parasitemia, a capacidade dos monócitos/macrófagos de atuarem como células apresentadoras de antígeno eficazes é determinada pela expressão de complexo de histocompatibilidade tipo II (HLA-DR), peptídeo responsável pelo primeiro sinal de ativação de linfócitos T, e as moléculas co-estimulatórias (CD80⁺ e CD86⁺) fornecendo sinais de ativação ou supressão, dependendo do seu ligante, CD28⁺ e CTLA-4, respectivamente (JAIN et al., 2011; KIN; SANDERS, 2007). As moléculas CD80⁺ e CD86⁺ são expressas na superfície de monócitos ativados e tem função de auxiliar na indução da resposta imune adaptativa de Linfócitos T e B e são reguladas por ligação a receptores na superfície dessas células. Os níveis de CD80⁺ na superfície dos monócitos são regulados dependendo do estado de ativação, e o CD86⁺ é tipicamente expresso em frequências mais altas nos monócitos (KIN; SANDERS, 2007; VIEIRA et al., 2013). É importante ressaltar que foi demonstrado que o CD80 preferencialmente recruta o CTLA-4, enquanto o CD86 tem uma maior predileção pelo CD28. Essa diferença fornece um viés para inibição e ativação pelas moléculas CD80 e CD86, respectivamente (PENTCHEVA-HOANG et al., 2004).

Utilizando células mononucleares de portadores da LCD, estimuladas com antígenos de *L. mexicana*, foi evidenciada uma alta expressão de CD86 em monócitos, sugerindo a indução de uma resposta de perfil Th2 e tolerância aos antígenos de *Leishmania*, visto que a os níveis de expressão de CD86 continuaram elevados, mesmo quando não havia estímulo por antígenos de *Leishmania* (CARRARA et al., 2007). Contudo, quando foi utilizado PBMC de pacientes portadores de LCL e estimuladas por antígenos solúveis de *L. braziliensis*, foi observado que houve uma diminuição das moléculas CD80 e CD86, quando comparado com o controle negativo, sugerindo que os monócitos desses pacientes, infectados a *L. braziliensis*, demonstram um envolvimento sistêmico confirmado pela expressão diminuída das moléculas co-estimulatórias. (VIEIRA et al., 2013).

Em modelos de camundongos C57BL/6 (resistentes a infecção) *knockout* para o receptor de quimiocina CCR2, foi visto o desenvolvimento da infecção por *L. major* que é caracterizada por um aumento do recrutamento de neutrófilos e o desenvolvimento de uma resposta do tipo TH2, o perfil susceptível a infecção (SATO et al., 2000). Por outro lado, em modelos murinos deficientes de neutrófilos a resistência à infecção parece aumentar ao mesmo passo que há um aumento no recrutamento de monócitos inflamatórios para o local da infecção, sugerindo o papel protetor dos monócitos na imunopatologia da LTA (SCOOT; NOVAIS, 2016; HURREL et al., 2015).

Em humanos, o papel dos monócitos/macrófagos ainda apresenta dualidade, pois eles parecem estar relacionados com a patologia ou envolvidos na proteção, dependendo de aspectos vetorias e epidemiológicos. Estudos realizados em uma área endêmica de transmissão de *L. (V.) panamensis*, mostraram que os macrófagos de pacientes com LCL crônica (lesões com mais de 6 meses de duração) e com leishmaniose recorrente foram mais permissivos à entrada do parasito que os indivíduos com infecção sub-clínica, sugerindo que esta proteção estava associada a uma maior capacidade dos macrófagos desses indivíduos em controlar a infecção (ROBLEDO et al., 2012; BOSQUE et al., 2000). Assim, os macrófagos podem participar tanto da proteção do hospedeiro, quanto da doença na infecção por *Leishmania*, pois macrófagos de indivíduos com infecção subclínica (SC) têm uma maior capacidade de matar a *Leishmania* quando comparado com macrófagos de pacientes com LCL e LM (GIUDICE et al., 2012).

2.3.2 Resposta Imune Adaptativa

Estudos utilizando camundongos, principalmente infectados com *Leishmania major*, mostraram que a resposta imune mediada por células T também desempenham um papel fundamental na evolução sintomática da LTA (CHOI; KROPF, 2009; KEDZIERSKI, 2010; PISCOPO; MALLIA, 2006; SCOOT; NOVAIS, 2016). As infecções experimentais por *L. major* em diferentes linhagens de camundongos tem sido usada para identificar os fatores que promovem o desenvolvimento diferencial de células Th1 e Th2 (SCOOT; NOVAIS, 2016) e foi visto que em camundongos resistentes à infecção (como C57BL/6, CBA, C3H) o perfil Th1 estaria predominante, enquanto em camundongos susceptíveis (BALB/c) houve um predomínio de resposta do tipo Th2 (REIS et al., 2006).

No modelo humano, as infecções por *Leishmania* podem levar a uma resposta imunológica específica por parte do hospedeiro, caracterizada pelo aumento de células T

CD4⁺ e T CD8⁺ e produção de citocinas Th1 ou Th2 (REIS et al., 2006; BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012). Evidências comprovam que a participação da resposta imune mediada por células T está intimamente relacionada ao aparecimento das lesões da LTA (BACELLAR et al., 2002). Pacientes com LCL e LM que produzem altos níveis de IFN- γ , TNF e baixos títulos de IL-10, levam ao aparecimento de lesões cutâneas e mucosas, pois as citocinas inflamatórias além de não serem eficientes em controlar a infecção por a *L. braziliensis*, levam também à exacerbação da resposta inflamatória. Este acontecimento pode ser justificado pela ineficiência da resposta Th2, principalmente por parte da IL-10, em que não foi capaz de evitar o aumento da inflamação, levando ao dano tecidual nos pacientes com LTA (GOOLOB et al., 2008; LIMA et al., 2011).

Apesar de ser descrito na literatura que o perfil Th1 está relacionado com à resistência da infecção, há evidências relacionado à patogênese da LTA, devido a exacerbação da resposta inflamatória, como foi descrito anteriormente. A ausência de uma imunorregulação negativa das citocinas inflamatórias, por parte da citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β é primordial para evitar os sintomas clínicos mais graves presentes na forma mucocutânea (FARIA et al., 2009; DE CARVALHO et al., 2007). Já foi demonstrado que é necessária a existência de um contrabalanço com citocinas do perfil Th1 com Th2 e não uma polarização para um tipo de resposta, pois esses mecanismos de imunorregulação são importantes para manter a integridade tecidual do hospedeiro por evitar a exacerbação da resposta inflamatória (BARATTA-MASINI et al., 2007; SCOOT; NOVAIS, 2016).

Várias outras células do sistema imune podem contribuir para a imunopatogênese da LTA. Por exemplo, as células NK respondem logo após a infecção por *L. major* e promovem aumento da resistência, aparentemente devido à produção de IFN- γ (NOVAIS et al., 2009). Na investigação do papel das células B e anticorpos na leishmaniose, demonstram que os anticorpos não desempenham papel fundamental na proteção contra a *Leishmania* spp. (BUXBAUM; SCOTT, 2005; KIMA et al., 2001). Por outro lado, as células Th1 são essenciais para a resistência à *Leishmania*, as células T CD8⁺ também fornecem um nível de controle através da produção de IFN- γ . Assim, o estudo desses tipos celulares se faz necessário para um maior conhecimento das diferentes formas e sintomas que a LTA apresenta (NOVAIS; SCOTT, 2015).

2.3.2.1 Linfócitos T auxiliares (T CD4)

Os linfócitos T CD4⁺ são essenciais na imunopatogênese da LTA, e logo após a infecção estas células são recrutadas para o local da infecção, levando ao aumento da produção da citocina IFN- γ . Esta citocina atua em sinergia com TNF ativando a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) de macrófagos a produzir óxido nítrico, resultando na morte intracelular do parasito e controle da doença (BOGDAN et al. 2000; NYLEEN; GAUTAM, 2010).

Na LTA humana, a diferenciação de células T CD4⁺ para o tipo Th1 é mediada por IL-12, produzida por células apresentadoras de antígenos no curso da infecção (ALEXANDER; BROMBACKER, 2012). O padrão de resposta imune Th1 com produção de IFN γ , TNF e IL-12, tem sido associado com o controle da infecção por ativação macrófagica e, portanto, eficiente destruição parasitária (ROBERTS, 2006; AMEEN, 2010). Por outro lado, citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-10 e TGF- β) diferenciadas pela produção de IL-4 principalmente por mastócitos, favorecem a multiplicação parasitária através da inibição da produção de IFN- γ e bloqueio da ativação de macrófagos, reduzindo os níveis de óxido nítrico (GOMES-SILVA et al. 2007, OLIVEIRA et al. 2014).

As citocinas do perfil Th2 também são capazes de inibir a diferenciação dos linfócitos T para um perfil Th1 e conseqüentemente a inibição da produção de IFN- γ e TNF, desfavorecendo assim a ação protetora do perfil inflamatório (BARATTA-MASINI et al. 2007). Estudos de imagem intravital demonstraram que as células T não estão uniformemente distribuídas nas lesões de *Leishmania* e que as células T CD4⁺ não interagem com todas as células infectadas (MOU et al., 2014). Contudo, o IFN γ produzido por estes tipos celulares possui um efeito de longo alcance, permitindo a produção de NO por células infectadas que estão mais afastadas (MULLER et al., 2012).

As diferentes espécies de *Leishmania* spp. nos seus diferentes hospedeiros, podem comportar-se de forma distinta, atenuando a resposta imunitária ou exacerbando-a (BRELAZ et al., 2012; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, et al., 2017). A gravidade da lesão da LTA, em modelo murino, é parcialmente dependente do desenvolvimento de uma resposta do tipo T CD4⁺ do perfil Th2, mediada pela citocina IL-4, que favorece a multiplicação parasitária, no entanto quando a citocina é bloqueada com tratamento com um anticorpo específico, as lesões desaparecem.

Em humanos a IL-4 parece não ter uma influência efetiva na gravidade da doença, já que pacientes com leishmaniose cutânea difusa grave, apresentam baixos níveis de IL-4

séricos, sugerindo que as respostas do tipo Th2 por essa citocina pode ser menos importante para a progressão da doença em humanos (SCOOT; NOVAIS, 2016). A leishmaniose cutânea difusa causada por *L. amazonensis* e *L. mexicana*, apresenta uma anergia da resposta imune podendo ser devido a uma maior produção de IL-10, levando a ativação inadequada de fagócitos e produção de IL-12, primordial para ativação da resposta fagocítica e consequentemente a morte dos parasitas (PETRITUS et al., 2012; SOONG et al., 2008).

2.3.2.2 Linfócitos T CD8 citotóxicos e inflamatórios

O papel efetor das células TCD8⁺ no modelo das LTA, é um assunto que ainda apresenta várias lacunas. De acordo com a literatura, esse tipo celular parece ter um papel dubio, pois a sua função irá depender se os linfócitos TCD8 são citotóxicos produtores de granzimas e perforinas, associados com a progressão e aumento das lesões, ou são inflamatórios, produtores de IFN- γ , associado a proteção à doença (SANTOS et al., 2013; CARDOSO et al., 2015).

Após a infecção com *Leishmania* spp, as células T CD8⁺ se ligam ao Complexo Principal de Histocompatibilidade humano classe I (MHC-I), presente na maioria das células humanas, entre elas os fagócitos infectados, e se diferenciam em uma população de células T CD8⁺ de memória (NOVAIS; SCOOT, 2015). Contudo a ativação dessas células nas Leishmanioses ainda não é totalmente esclarecido. Os linfócitos T CD8⁺ convencionalmente são ativadas pela sua ligação a peptídeos ligados a molécula MHC de classe I, o qual são ligadas a molécula pela atuação da enzima TAP (tapasina), presente no citoplasma das APCs. No entanto, como a *Leishmania* não está presente no citoplasma, outros mecanismos devem estar envolvidos no carregamento do MHC I dos peptídeos de *Leishmania*. Uma possibilidade é que os fagossomos sejam autossuficientes para apresentar antígenos exógenos, o que foi demonstrado em outros modelos (HOUDE et al., 2003).

Em modelo murino, deficiente de células T CD8⁺, infectados com doses fisiológicas de *L. major*, foi visto que os animais desenvolveram o perfil Th2 e progressão da doença (UZONNA et al., 2004). Contudo, quando os animais receberam os linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ resultou no desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 e resistência à infecção. Assim, após a infecção experimental foi possível inferir que a produção de IFN- γ por células T CD8⁺ bloqueia o desenvolvimento de células Th2, promovendo assim o desenvolvimento da resposta Th1 protetora (NOVAIS; SCOOT, 2015).

Após a infecção por *Leishmania* em um sistema *in vitro* de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC), células T CD8 são estimuladas mais cedo em comparação com células T CD4 e produzem grandes quantidades de IFN- γ , possivelmente dirigindo a diferenciação de linfócitos Th1 (POMPEU et al., 2001). Da Cruz e colaboradores (2005), observaram a presença de células T CD8 reativas a *Leishmania* em lesões mais antigas, sugerindo que elas também têm um papel importante no processo de cicatrização das lesões.

Na LTA, os linfócitos T CD4 são conhecidos por serem a principal fonte de IFN- γ na fase inicial da doença causada por *L. braziliensis* (BOTTREL et al., 2001). Contudo, o papel dos linfócitos TCD8 como produtores de IFN- γ já vem sendo explorado. Estudo avaliando o papel dos linfócitos TCD8 na LTA demonstrou que pacientes com LTA subclínica apresentaram uma maior produção de IFN- γ por parte dos linfócitos TCD8, ao invés da alta produção através dos linfócitos TCD4, quando comparados as pacientes com LCL. Assim, os linfócitos T CD8 foram os principais produtores de IFN- γ , por sua vez sugerindo a participação dessas células no controle de *L. braziliensis* em indivíduos com Leishmaniose subclínica (CARDOSO et al., 2015).

Diferentemente do perfil protetor dos linfócitos TCD8, o seu papel citotóxico já vem sendo explorado e a literatura desmonstra que este perfil tem associação com a gravidade da LTA (BRODSKYN et al., 1997; FARIA et al., 2009). Em pacientes infectados por a *L. braziliensis*, à medida que a doença progride desde lesões precoces (não ulceradas) até lesões tardias (ulceradas), a relação entre células T CD4 e CD8 muda, e mais células T CD8 são encontradas em pacientes com lesões ulceradas. Em contraste com as células T CD4 que expressam IFN γ , as células T CD8 nas lesões têm um perfil citotóxico marcado pela expressão granzima B, proteína que induz a morte celular por apoptose (NOVAIS et al., 2014; CROSBY et al., 2014; CARDOSO et al., 2015).

Algumas das lesões mais graves na LTA são encontradas em pacientes infectados por a *L. braziliensis*, e é cada vez mais claro um papel patogênico das células T CD8 nesses indivíduos. Estudos em biópsias das lesões da LTA humana, observaram que há um aumento da frequência de Linfócitos T CD8 quando comparados com os Linfócitos T auxiliares nos pacientes com as lesões ulceradas (FARIA et al., 2009). As células T CD4 obtidas de lesões de pacientes infectados por a *L. braziliensis*, apesar de estarem em menor quantidade nos pacientes mais graves, elas expressam o RNA mensageiro do IFN- γ , diferentemente do que ocorre com as células T CD8 (CARDOSO et al., 2015). A baixa produção de IFN- γ pelas células T CD8 também foi observada em camundongos infectados com *L. major*, e tanto no

modelo animal como no modelo humano a presença do IFN- γ é crucial para o desfecho benéfico na infecção por *Leishmania spp.* (CROSBY et al., 2014)

2.4 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico da LTA é realizado através de um conjunto de parâmetros epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (GOTO; LINDOSO, 2010; VEGA-LÓPEZ, 2003). No diagnóstico clínico são observadas as características da lesão associadas a anamnese do paciente, onde os dados epidemiológicos são de grande importância para caracterização clínica da doença (GONTIJO; CARVALHO, 2003). O diagnóstico laboratorial baseia-se principalmente na pesquisa direta de parasitos (exame histopatológico, e/ou “imprint” para identificar amastigotas). E/ou da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do DNA parasitário (GONÇALVES et al., 2012). Também são realizados testes sorológicos, que permitem a detecção de anticorpos circulantes específicos contra antígenos do parasita. Os testes sorológicos incluem a reação de imunofluorescência indireta (IFI), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e *Western Blot*, em geral, apresentando resultados satisfatórios. Além dos testes citados, ainda se utiliza a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) na avaliação da imunidade mediada por células, contudo apresenta reação cruzada com outras doenças como doença de Chagas, esporiotricose e hanseníase, além de apresentar baixa sensibilidade em áreas endêmicas (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2017).

A base terapêutica utilizada nas leishmanioses é através do uso dos antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan), utilizado primeiramente em países de língua inglesa e o antimoniato de meglumina (Glucantime), em países de língua não-inglesa. Estes medicamentos já são preconizados como terapia para LTA há mais de 60 anos, apesar dos efeitos colaterais como: mialgia, cefaléia, náuseas, aumento de diversos marcadores bioquímicos (ALT, AST, amilase) e cardiocitotoxicidade (MELO et al., 2006; AMATO et al., 2008; MACHADO et al., 2010). A dose recomendada para o tratamento da LTA é de 20 mg de antimonial pentavalente por kg / dia por 20 a 28 dias, e pode ser administrado por via endovenosa ou intramuscular (LOPES et al., 2013, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Apesar de ser a principal estratégia terapêutica para o tratamento da LTA no Brasil, falha terapêutica vem apresentando aumento no país. Considerando que, no início dos anos 80, apenas 10% dos indivíduos com LTA apresentaram falha terapêutica, pacientes que não obtiveram cura clínica na segunda tratamento com os antimoniais, apresentou um aumento

que varia de 44 a 53% (BRITO et al., 2014). De acordo com a estratégia terapêutica com o uso dos antimoniais, a repetição da dose com este medicamento geralmente leva a cura dos pacientes com LTA refratária inicial. Em contraste, foi observado que mais de 60% dos casos de LTA falhou nos dois tratamentos com os antimoniais pentavalentes (GUIMARÃES et al., 2016).

O tratamento de segunda escolha, quando há falha terapêutica dos antimoniais, é a Anfotericina B lipossomal. Seu mecanismo de ação é atribuído à ligação do ergosterol, levando à permeabilidade da membrana e à modificação do equilíbrio osmótico do parasita (LOPES et al., 2013). Anfotericina B lipossomal é administrada por via intravenosa na dose de 1-1,5 mg / kg / dia por 21 dias ou 3 mg / kg / dia por 10 dias (RASSI et al., 2008; LOPES et al., 2013). Atualmente as quimioterapias voltadas para o tratamento da LTA, favorecem o abandono dos pacientes, pois todas as terapias são administradas pela via endovenosa/intramuscular e apresentam longo período de tratamento, e conseqüentemente levando à resistência do paciente à terapia (RATH et al, 2003; CARDONA-ARIAS et al 2015).

A descoberta de novos agentes com propriedades leishmanicidas que sejam menos tóxicos e que produzam menos efeitos colaterais se faz necessária devido a falha terapêutica e os importantes efeitos colaterais que os atuais medicamentos apresentam. Nesse cenário os compostos heterocíclicos, já utilizados em inúmeros medicamentos, apresenta uma importância incontestável nesta busca (MELO et al., 2006)

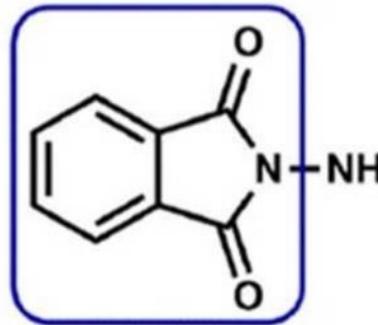
2.4 Compostos Heterocíclicos: Novas Alternativas Terapêuticas para Leishmanioses

Os compostos heterocíclicos fazem parte da promissora química sintética medicinal e de acordo com os achados da literatura demonstram que são drogas que apresentam uma grande atividade biológica, sobretudo nos protozoários (CHAN-BACA; HERNÁNDEZ-NÚÑEZ; NAVARRETE-VÁZQUEZ, 2009). Existem várias subclasses destes compostos, uma delas são os derivados das Ftalimidias e dos tiazóis (Ftalil-Tiazóis), que são compostos conhecidos por apresentar atividade imunomoduladora e antiparasitária (TEO et al., 2005; LAFRANC et al., 2013; ALIANÇA et al., 2017).

A Ftalimidias constitui uma importante classe de compostos heteroaromáticos, com uma estrutura promissora para uso na síntese de novos fármacos (DESHAYES et al., 1999) (Figura 4). As Ftalimidias receberam atenção devido aos seus antagonistas do receptor androgénico (SHARMA et al., 2012), anticonvulsivante (KATHURIA; PATHAK, 2012),

antimicrobiano (KHIDRE et al., 2011), hipoglicêmico (MBARKI; ELHALLAOUI, 2012), antiinflamatório (LIMA et al., 2002), antitumoral (NOGUCHI et al., 2005), ansiolítico (YOSUVA; SABASTIYAN, 2012) e atividades anti-HIV-1 (SHARMA et al., 2010). Assim, existe um crescente interesse nos seus derivados, pois eles apresentam uma ampla atividade biológica (OKUNROBO et al., 2006).

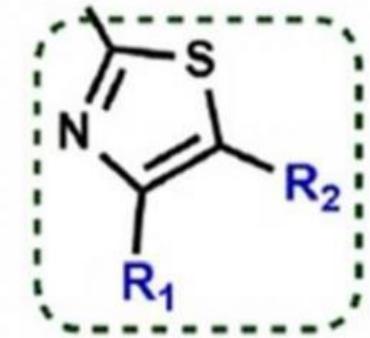
Figura 4- Figura esquemática da estrutura das Ftalimidas



Adaptado de Gomes et al., 2016

Os Tiazóis são um grupo de moléculas que se caracterizam quimicamente pela presença de um anel heterocíclico de 5 membros, tendo 3 carbonos, 1 átomo de enxofre na posição 1 do anel e um átomo de nitrogênio na posição 3 (Fig. 5) (DE MORAIS GOMES *et al.*, 2016). Com o aprimoramento da química voltada para os estudos biológicos, modificações podem ser feitas nas estruturas das moléculas a fim de que sejam mais eficazes, menos tóxicas e mais seletivas aos alvos biológicos. A literatura já relata que os tiazóis apresenta inúmeras atividades biológicas, tais como: antidibética (TSUYOSHI *et al.*, 2002), antiinflamatória (BARROS *et al.*, 2010), anti-oxidante (SWATHI *et al.* 2012), anti-tubercular (PATTAN *et al.*, 2008), antimicrobiana (OYA *et al.*, 2007), e atividade citotóxica (SHANKAR *et al.*, 2012).

Figura 5- Figura esquemática da estrutura dos Tiazóis



Adaptado de Gomes et al., 2016

A utilização dos compostos heterocíclicos sintéticos das classes Ftalamina e Tiazol, vem demonstrando que são compostos que apresentam extensas atividades biológicas, incluindo antitumoral, antifúngica, antimalárica, antihelmíntica e antiprotozoária (GOMES et al., 2016; ESPÍNDOLA et al., 2015; SANTIAGO et al., 2014; TURAN-ZITOUNI et al., 2016). Contudo, ainda são insipientes estudos utilizando estas classes contra aos agentes etiológicos das Leishmanioses. Um estudo recente avaliou a ação de compostos heterocíclicos da classe Ftalil-Tiazol sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. infatum* e foi observado que os compostos dessa classe apresentam atividade leishmanicida em ambas as formas evolutivas do parasita e atrelado ao um baixo efeito citotóxico sobre células de mamíferos (ALIANÇA, et al., 2017). Assim, de acordo com os achados atuais, os derivados das Ftalil-Tiazóis mostram-se como compostos promissores na busca de novas terapias para LTA.

3. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses representam uma das endemias parasitárias de maior importância em termos de saúde pública no mundo, devido a sua grande distribuição nas Américas, sobretudo na América Latina (ALVAR et al., 2012). A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) representa um risco à população mundial, onde cerca de 350 milhões de indivíduos estariam expostos ao parasita. A LTA apresenta uma incidência de 1,5 milhões de novos casos por ano no mundo (BRASIL, 2017). Apesar de ser uma doença que representa um risco à saúde mundial, há poucos investimentos em novas terapias para as leishmanioses e os tratamentos atuais apresentam efeitos colaterais e crescentes relatos de falha terapêutica.

Neste cenário de novas terapias para LTA, temos como candidatos promissores os compostos heterocíclicos sintéticos da classe das Ftalimidias e Tiazóis, compostos de síntese rápida, simples e baixo custo de produção e apresenta atividade leishmanicida.

De acordo com a literatura, a resposta imunológica do hospedeiro humano frente à infecção por *Leishmania* spp é essencial para definir a sintomatologia clínica do paciente. Com isso é imprescindível que haja uma investigação na capacidade imunomoduladora de novos compostos para o tratamento da LTA.

Assim, o presente estudo tem como objetivo investigar o potencial Leishmanicida e a capacidade imunomodulatória dos compostos Heterocíclicos sintéticos da classe Ftalil-Tiazóis, sobre as células do sistema imune dos indivíduos portadores da LTA, visando o desenvolvimento de novas formulações de terapias para LTA.

4 METODOLOGIA

4.1 Cultivo *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*

As formas promastigotas de *L. braziliensis* da cepa LBT 2903, foram cultivadas em meio Schneider com pH de 7,4, contendo 10% de soro bovino fetal (SBF 10U/ml de penicilina e 10µg/ml estreptomicina (Meio Scheneider completo), mantidas a 26°C, através de repiques semanais.

4.2 Obtenção de antígenos solúveis totais de *L. braziliensis*

As formas promastigotas foram mantidas conforme descrito no item 4.1 e alíquotas contendo 10⁹ células/mL submetidas a três lavagens com salina tamponada (PBS – pH 7,2). Para a obtenção do antígeno solúvel total, foi utilizado o protocolo descrito por Chamak-Ayari et al. (2014) adaptado. O método consiste basicamente em descongelar as alíquotas e ressuspendê-las em 1 mL de tampão de lise contendo inibidor de protease metil-fenil- fluoreto (Cytiva. USA). A suspensão celular foi submetida a 10 ciclos rápidos de congelamento e descongelamento, seguidos de 3 pulsos de ultrassom 40W/30 segundos. As frações antigênicas solúvel (AgST) e insolúvel (AgIT) foram separadas por centrifugação a 10.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante correspondente ao AgST de *L. braziliensis*, foi submetido a dosagem protéica utilizando o Kit comercial 2G Quant kit (Cytiva, USA), segundo as instruções do fabricante. Para a verificação da integridade dos antígenos foi realizado uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-gAGE) segundo Laemmli (1970) nas concentrações de 20µg/ml e 40µg/ml, que foram corados com Comassie blue.

4.3 Tratamento com os compostos Heterocíclicos

Para a realização dos testes, foram utilizados 2 compostos sintéticos da classe Ftalil-Tiazóis: **(2J)** 2- (4- (naftalen-2-il) tiazol-2-ilamino) isoindolino-1,3-diona e **(2M)** 2- (4- (2,4-diclorofenil) tiazol-2-ilamino) isoindolino-1,3-diona, cedidos pelo laboratório de Planejamento em Química Medicinal da UFPE, coordenado pela Dra Ana Cristina Leite. Esses compostos obtiverem o melhor desempenho nos testes de citotoxicidade em células Vero e macrófagos J77A e de ação leishmanicida em *Leishmania infantum* em trabalhos desenvolvidos no nosso grupo de pesquisa (Aliança, et al. 2017).

4.4 Atividade Biológica *in vitro* das promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com os compostos 2J e 2M

Para a determinação da atividade biológica, formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram coletadas, contadas e diluídas em meio Schneider suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino a uma concentração de 1×10^6 células/mL. Após a diluição, as células foram incubadas em uma diluição seriada de de 1:2, com concentração inicial de 100 µg/mL a concentração final de 6.25 µg/mL, dos compostos 2M e 2J, por 72 horas. Células incubadas apenas com o meio de Schneider foram utilizadas como controle. O crescimento da cultura foi acompanhado através de contagens diárias em câmara de Neubauer. O crescimento das promastigotas tratadas, comparado ao crescimento do controle e ao final do tempo de incubação, foi calculado a porcentagem de inibição do crescimento. A partir destes valores de inibição, para cada uma das concentrações testadas, foi realizada a determinação da IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos) por análise de regressão linear dos dados obtidos, utilizando o software SPSS 8.0 para Windows. Cada experimento foi realizado em duplicata biológica.

4.5 Seleção dos Pacientes

Foram selecionados doze indivíduos portadores da LTA com lesão ativa sem tratamento, do município de Timbaúba-PE, consultados em postos de saúde do município e acompanhados pela equipe de profissionais da saúde da família. Eles apresentaram uma média de idade de 33 anos (variação 18-67anos), sendo 16,66% do sexo feminino e 83,3% do sexo masculino. Estes pacientes obedeceram aos seguintes critérios de inclusão: Pacientes de ambos os gêneros, autóctones, com lesões cutâneas e/ou mucosas ativas e não ter recebido tratamento etiológico com os antimoniais pentavalentes. Indivíduos gestantes e portadores de doenças agudas ou crônicas tais como cardiopatias, diabetes mellitus descompensada e insuficiência renal foram excluídos do estudo.

Foram selecionados 08 indivíduos controles negativos de área não endêmica, com média de idade de 42 anos (variação 26-60 anos), sendo 62,5% do sexo feminino e 37,5 do sexo masculino. Eles obedeceram aos seguintes critérios de seleção: Não possuir sorologia reagente para LTA, nunca ter recebido transfusão de sangue, não ser cardiopatias, diabéticos, não apresentar insuficiência renal e não estar gestante.

4.6 Coleta de sangue

Vinte e cinco mililitros de sangue foram coletados em tubos contendo heparina sódica (Vacuette) para obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e utilização nos ensaios de cultura celular. Além disso, cinco mililitros de sangue foram coletados em tubo seco (Vacuette) para obtenção de soro. Após retração do coágulo, os tubos foram centrifugados (900 x g/ 10 minutos a temperatura ambiente) e realizada alíquotas de soro devidamente identificadas e armazenadas a temperatura de -20 °C, para a confirmação sorológica descrita no item 5.4.

4.7 Confirmação sorológica para LTA dos pacientes selecionados

O diagnóstico da LTA foi realizado a por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Os soros foram processados pelo Laboratório de Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães-IAM-FIOCRUZ.

4.8 Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)

Após a coleta do sangue, o isolamento das PBMC foi realizado através de centrifugação da amostra de sangue em gradiente de densidade. Para este procedimento, o sangue foi colocado em tubos Falcon de 50 mL, seguindo a adição da solução de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, pH 7.2), na mesma quantidade obtida de sangue. Esta solução (sangue/meio) foi adicionada a tubos Falcon de 50 mL contendo Ficoll-Paque PLUS™ (Amersham Biosciences) numa proporção de 1:1 de Ficoll e sangue/PBS. Os tubos são inclinados a 45°, para criar uma separação entre o Ficoll-Paque e o sangue/PBS adicionado. Os tubos foram centrifugados por 30 minutos (900 x g a 20°C) e o anel de PBMC que se formou na interface entre o Ficoll e o plasma será removido utilizando-se pipetas *transfer* e colocados em tubos Falcon de 15 mL. As células foram lavadas duas vezes por centrifugação durante 15 minutos (400 x g a 20°C) em meio RPMI 1640 incompleto. Finalizadas as lavagens, as células foram ressuspensas em 2 mL de meio RPMI 1640 completo e contadas em câmara de Neubauer, em uma diluição (1:10) com azul de Trypan (SIGMA) e ajustadas para a concentração de 1×10^6 células/ml.

4.9 Citotoxicidade das moléculas 2J, 2M e Anfotericina B em células mononucleares humanas

Foram coletados de três indivíduos saudáveis para a obtenção do PBMC. As células foram adicionadas em placas de 96 poços, em uma concentração de 2×10^5 /well e incubadas por 2 horas em estufa de CO₂ (5% de CO₂ e temperatura de 37°C). Após este período as células foram tratadas com os compostos heterocíclicos sintéticos da classe Ftalil Tiazóis (2M e 2J) e a Anfotericina B, em uma diluição seriada em que a variação das concentrações para os compostos 2J e 2M foi de 250 µg/ml -15,5 µg/ml, para a Anfotericina B de 100µg/ml-6,25µg/ml e o controle somente com células e incubadas por 24h. Ao final do período de incubação, foi adicionado em cada poço o reagente MTT ([3(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo] -azul de tetrazólio) (Sigma-Aldrich), a uma concentração de 5mg/ml, diluído em 1:10 com meio RPMI sem vermelho de fenol (pH 7,2), ficando incubado por mais 3h. Após, o reagente foi retirado e adicionado DMSO, para assim realizar a leitura da viabilidade este tempo celular no espectrofotômetro (Thermo Scientific), a uma absorbância de 540 nm.

4.10 Cultura *in vitro* de PBMC, antígenos solúveis de *L. braziliensis* e tratamento com as moléculas 2J e 2M

As culturas de PBMC foram cultivadas em tubos de polietileno (14 ml) (Corning) contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB, desafiados com os compostos 2J e 2M, estimulação com o antígeno de *L.(V.) braziliensis* (10µg/ml) e com a Fitohemaglutinina A (PHA, 2,5 µg/ml), nas seguintes condições: Células + antígenos + 2J (C+A+2J); Células + 2J (C+2J); Células + antígenos (C+A); Células (C), Células+ antígenos + 2M (C+A+2M); Células + 2M (C+2M).

Para a escolha do melhor tempo de cultivo, foi necessário a execução de uma cinética de tempo, em que as culturas foram incubadas (37° C com 5% CO₂) por 24h, 72h e 5 dias, como descritas no item 4.10.1. Após o término do tempo de incubação, 100µL do sobrenadante das culturas foram coletados e estocados a -80 °C, para dosagem de citocinas por CBA (*Cytometric beads Array*) e as células foram utilizadas na Imunofenotipagem celular de monócitos e linfócitos e para a microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

4.10.1 Cinética de tempo de cultivo versus resposta Imunológica

Foram selecionados para a cinética um total de 5 pacientes com LTA com lesão ativa, de acordo com os critérios de inclusão descritos no item 4.5 e a coleta e confirmação da sorologia de acordo com os itens 4.6 e 4.7, respectivamente.

Foram obtidos o PBMC de todos os indivíduos selecionados como descrito no item 4.8 e realizado o co-cultivo das células mononucleares de acordo com o item 5.10. Para a análise das citocinas de perfil Th1/Th2 no PBMC desafiados com os compostos 2J e 2M (1 e 2x a IC₅₀) e com o antígeno de *L.(V.) braziliensis* (10µg/ml), nas seguintes condições: Células + antígenos + 2J 1x IC₅₀ (C+ANT+2J1x); Células + antígenos + 2J 2x IC₅₀ (C+ANT+2J2X); Células + 2J 1x IC₅₀ (C+2J1X); Células + antígenos (C+ANT); Células (C) e Células+ antígenos + 2M 1x IC₅₀ (C+ANT+2M1x); Células+ antígenos + 2M 2x IC₅₀ (C+ANT+2M2X); Células + 2M 1x IC₅₀ (C+2M1X); Células + antígenos (C+ANT); Células (C).

Sendo avaliado três tempos de incubação (24h, 72h e 5 dias), ao final de cada tempo foram coletados 500 µl do sobrenadante e estocados a -20 °C, até o momento da dosagem das citocinas de perfil Th1/Th2 por citometria de Fluxo.

4.11 Imunofenotipagem de Monócitos e Linfócitos

Quatro horas antes do término do cultivo de foram adicionados em cada cavidade da placa de cultura 10 µL de Brefeldina A (Sigma™) (10 µg/mL). Sua utilização promove a retenção da citocina no interior celular, uma vez que interfere no trânsito de secreção de proteínas, mantendo-as no interior do Complexo de Golgi (HUDSON; GRILLO, 1991). Ao final do tempo de 24 h do co-cultivo, as células foram retiradas dos tubos de cultura, e colocadas em tubos de poliestireno de 15ml e adicionados 6ml PBS-Wash (PBS contendo albumina sérica bovina a 0,5% e azida sódica a 1%) em cada tubo sendo centrifugados à 400 x g por 5 min a TA. Com auxílio de uma bomba a vácuo, os sobrenadantes foram retirados e descartados, até o volume final de 1 ml, e depositados em tubos de poliestireno (5ml) devidamente identificados, contendo os anticorpos monoclonais de superfície: anti-: CD4, CD8, CD14, CD28, CD80, CD86, CTLA-4 e HLA-DR (Tabela 2) conjugados a diferentes fluorocromos e previamente titulados, incubados por 30 min a TA. Após a incubação por 30 minutos a T.A., foi realizada a permeabilização das células através da adição de 2 mL da solução de Perm/Wash (contendo SBF e saponina – BD Biosciences®) por 5 minutos ao

abrigo da luz e a T.A. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 400 g por 5 minutos e depois o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados aos tubos os anticorpos intracitoplasmáticos anti-GRANZIMA A(1 μ L) e anti-IFN- γ (1 μ L), por um período de incubação de 30 minutos à T.A. e ao abrigo da luz. Após a marcação intracitoplasmática, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de Perm/Wash e 1 mL de PBS-Wash, respectivamente. Em seguida, foram adicionados 150 μ L da solução fixadora BD Cytotfix™ (BD Biosciences®) e os tubos foram incubados por 15 min. Depois do período de incubação, as células foram lavadas novamente com 2 mL de PBS-Wash. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 300 μ L de PBS-Wash e os tubos foram estocados a 4°C até o momento da leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson).

Tabela 2- Anticorpos utilizados nos ensaios de imunofenotipagem da cultura de PBMC de pacientes com LTA e os controles negativos.

Anticorpo	Clone	Fluoróforo	Fabricante
CD4	S3.5	PercyP	Invitrogen
CD8	3B5	FITC	Invitrogen
CD14	TUK4	FITC	Invitrogen
CD28	10F3	PE	Invitrogen
CD80	MEM-233	PE	Invitrogen
CD86	BU63	APC	Invitrogen
CTLA-4	BNIB	APC	BD
HLA-DR	TU36	PercyP	Invitrogen
GRANZIMA B	GB11	Alexa Fluor	BD
INF-γ	4S.B3 (RUO)	PE-Cy7	BD

4.12 Citometria de Fluxo

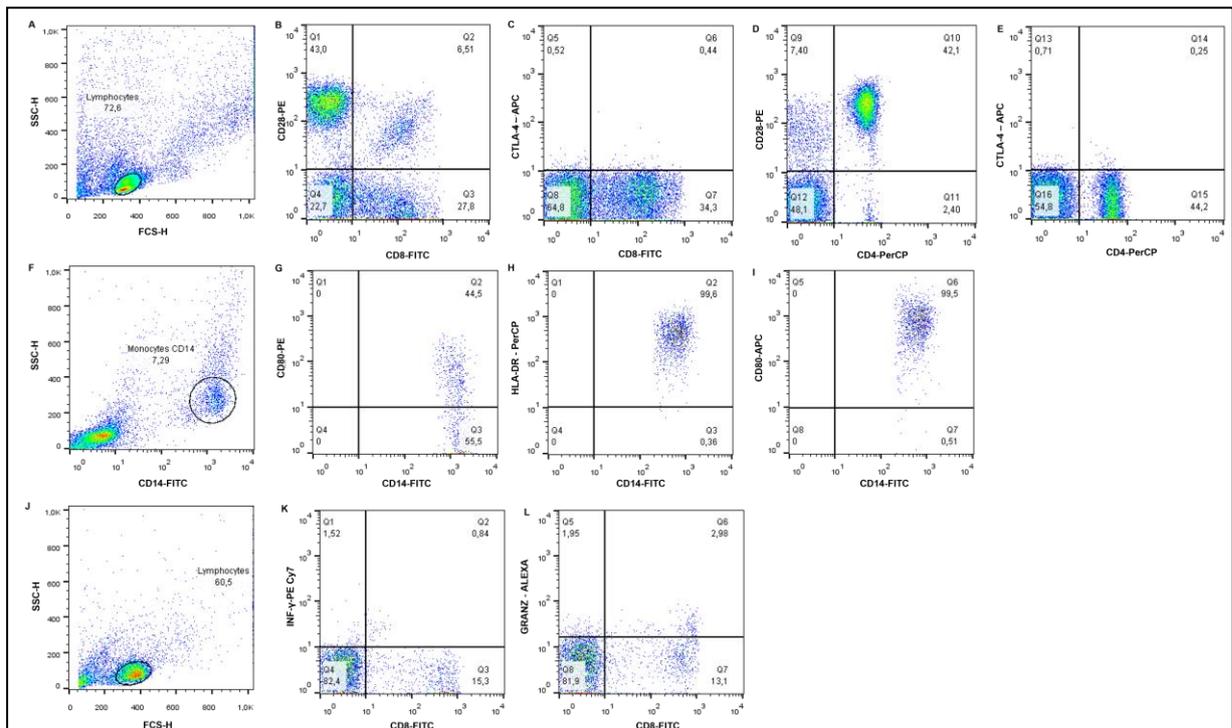
A aquisição e análise das amostras foi realizada na Plataforma Tecnológica de Citometria de Fluxo, localizada no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) /IAM/Fiocruz. Através do citômetro de fluxo FACScalibur (*Becton Dickson Immunocytometry Systems*) podemos avaliar o tamanho (Forward Scatter-FSC) e granulosidade das células (Side Scatter-SSC), além das fluorescências tipo 1 (FL1), tipo 2 (FL2), tipo 3 (FL3) e tipo 4 (FL4). Estas características são detectadas utilizando-se um sistema óptico-eletrônico que avalia a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula e a emissão de fluorescência, dada pelos diferentes fluorocromos, em diferentes comprimentos de onda. A análise dos dados adquiridos foi realizada no software CellQuestPro acoplado ao computador.

As aquisições e análises no citômetro de fluxo obedeceram às Normas de Boas Práticas de Laboratório instituídas no IAM/Fiocruz pelo Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS/Fiocruz).

4.12.1 Aquisição e análise de linfócitos e monócitos

A população de linfócitos foi selecionada através de gráfico do tipo dot plot FSC versus SSC (Figura 6), sendo adquiridos 10.000 eventos dentro da janela R1. Após a seleção da janela de interesse (R1), para os linfócitos T CD4⁺ foram selecionados os marcadores CD28⁺ e CTLA-4⁺ (Figura 6A-6E) e os para os linfócitos TCD8⁺ foram selecionados CD28⁺, CTLA-4, INF- γ e GRAZIMA B⁺ (Figura 6J-6L). Para os monócitos a análise foi realizada através de gráfico do tipo dot plot FCS versus FL1, sendo adquiridos 2000 eventos dentro de R1 e selecionados os marcadores CD80⁺, CD86⁺ e HLA-DR (Figura 6F-6I).

Figura 6- Estratégia de aquisição e análise em gráfico do tipo dot plot para linfócitos e monócitos.



Legenda: A - Gráfico dot plot da população de linfócitos selecionada para análise; B - Gráfico bidimensional de CD8 / FITC por CD28 / PE; C - Gráfico bidimensional de CD8 / FITC por CTLA-4 / APC; D - Gráfico bidimensional de CD4 / PerCP por CD28 / PE; E - Gráfico bidimensional de CD4 / PerCP por CTLA-4 / APC; F - Dot plot da população de monócitos selecionada para análise; G - Gráfico bidimensional de CD14 / FITC por CD80 / PE; H - Gráfico bidimensional de CD14 / FITC por HLA-DR / PerCP; I - plotagem bidimensional de CD14 / FITC por CD86 / APC; J- Dot plot da população de linfócitos selecionada para análise; K- Gráfico bidimensional de CD8 / FITC por INF- γ / PE Cy7 e gráfico bidimensional de CD8 / FITC por GRANZ./ALEXA. Fonte: Autora

4.13 Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura

O CBA foi utilizado para a mensuração quantitativa das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2, conforme recomendado pelo fabricante. Resumidamente, esta técnica emprega uma mistura de 6 esferas de poliestireno, com diferentes intensidades de fluorescência, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas detectadas no canal FL-4. Desta forma, 50 μ l da mistura de esferas de captura, marcadas com os anticorpos anti-: IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 foram adicionadas em tubos devidamente identificados. Em seguida foram adicionados 50 μ l do sobrenadante de cultura e do reagente Human Chemokine PE Detection (canal FL2) em todos os tubos. Após essa etapa as amostras foram incubadas por 3 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, 1 ml da solução tampão (Wash Buffer) foi adicionado e os tubos centrifugados a 200 g por 5 min. Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado, restando aproximadamente 100 μ l em cada tubo, onde foram adicionados 300 μ l de solução tampão (Wash Buffer) para ressuspender as esferas e posterior leitura das amostras no citômetro de fluxo, no software CellQuestPro (Beckton Dickson). Para cada citocina foram adquiridos 300 eventos, como recomendado pelo fabricante, assim totalizando 1800 eventos. A análise dos dados foi realizada no programa FCAP Array software (BD).

4.14 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para o processamento das células para a microscopia eletrônica de varredura, após o processamento do PBMC, as células foram cultivadas em placas de 48 poços com lamínulas redondas de 13 mm, previamente tratadas com L-lisina, e realizado o cultivo como descrito no item 4.10. Após, as lamínulas foram fixadas com solução Karnovsky (Glutaraldeído 2% e formaldeído 4% em tampão cacodilato 0,1M – pH 7,2) por no mínimo 2h. As amostras foram lavadas duas vezes com tampão cacodilato 0,1M – pH 7,2 e pós-fixado com 1% tetróxido de ósmio por 2h. Em seguida, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 3x100%). Após a desidratação foi realizado o ponto crítico para a substituição do etanol por dióxido de carbono, obtendo-se a secagem do material para montagem em suportes metálicos. Em seguida, foi realizada a metalização com cobertura do material por uma fina camada de ouro, para ser visualizado no microscópio eletrônico de varredura EVO LS (Zeiss).

4.15 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para o processamento das células para microscopia eletrônica de transmissão, as células foram separadas de acordo com o item 4.7 e cultivadas com os antígenos e as moléculas 2J e 2M, de acordo com o item 4.9. As células aderidas foram soltas utilizando solução PBS Wash gelado. Em seguida foram centrifugadas, lavadas em PBS e fixadas com solução Karnovsky (Glutaraldeído 2% e formaldeído 4% em tampão cacodilato 0,1M – pH 7,2). Após foram pós-fixadas em Tetróxido de ósmio (Os₄). Após a pós-fixação foram realizadas três lavagens, duas em tampão cacodilato e processado para a rotina da MET. O material foi desidratado utilizando uma série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 3x100%). Após, o material foi emblocado em resina epon 812, processados em cortes ultrafinos e realizados a pós-contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM109.

4.16 Análises estatísticas

Na análise estatística para os ensaios de viabilidade biológica da *L. braziliensis* e a citotoxicidade das PBMC frente ao tratamento com 2J e 2M, foi utilizado a regressão linear realizadas no programa SPSS 8.0 (IBM Co., Nova Iorque, EUA) para Windows.

Para a analisar os dados referentes a imunofenotipagem de linfócitos e monócitos, assim como a dosagem de citocinas, utilizamos o teste ANOVA e pós teste de Dunnett. As diferenças estatísticas também foram avaliadas usando o teste U de Mann-Whitney (* p, 0,05, ** p, 0,01, *** p, 0,001 e **** p, 0,0001). Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os softwares utilizados foram o Excel 2017, para a construção da base de dados e GraphPad Prism 5.0, para realização dos testes estatísticos citados e elaboração dos gráficos.

4.17 Aspectos Éticos

Os indivíduos incluídos na pesquisa tiveram participação voluntária e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndices B e C). A conduta de inclusão dos mesmos e os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em humanos do IAM/Fiocruz, com CAAE: 59093316.0.0000.5190 (Anexo A).

5 RESULTADOS

5.1 Atividade Biológica *in vitro* das promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com as moléculas 2J, 2M e anfotericina B.

As moléculas 2J, 2M e a anfotericina foram submetidas a análise da sua ação biológica sobre promastigotas de *L. braziliensis*, mostraram-se eficientes em inibir o crescimento em 50% das promastigotas em até 72 horas de cultivo. De acordo com o cálculo realizado pela regressão linear, o composto 2J teve uma média da IC₅₀ de 18,4µg/mL e o 2M de IC₅₀ de 23,1µg/mL e a anfotericina de 0,9 µg/mL (Tabela 3).

Tabela 3- Média e desvio padrão da IC₅₀, CC₅₀ e determinação do índice de seletividade (IS) dos compostos heterocíclicos 2M, 2J e Anfotericina B.

Compostos	IC ₅₀ (Média e DP)	CC ₅₀ PBMC(Média e DP)	IS
2J	18,4 ±4,2 µg/ml	243,17 ±52,4 µg/ml	13,21
2M	23,1 ±0,3 µg/ml	315,13 ±31,7 µg/ml	13,64
Anfotericina B	0,9 ±0,09 µg/ml	13,2±2,4 µg/ml	14,72

Legenda: DP- Desvio Padrão; IS- Índice de Seletividade.

5.2 Citotoxicidade das moléculas 2J, 2M e Anfotericina B em células mononucleares humanas

De acordo com os nossos achados, as moléculas 2J e 2M apresentaram formulações sintéticas com baixa toxicidade para células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis, quando submetidas aos tratamentos e observadas 24h e 48h após o desafio, sendo observado também que em ambos os tempos a viabilidade aumenta de acordo com a diminuição da concentração do composto (Figura 8). Para o composto 2J, foi observado no primeiro tempo de observação (24h), a viabilidade celular é inversamente proporcional a concentração testada da molécula, sugerindo um perfil citotóxico na concentração de 250ug/ml, porém, no segundo momento observado (48h) esta proporcionalidade inversa não é tão constante principalmente nas três concentrações iniciais, evidenciando uma ação tóxica ao longo do tempo de tratamento, visto que a viabilidade celular diminui entre os tempos de 24h para 48h, nestas concentrações. (Figura 7A e 7B).

Quando analisado o composto 2M, este fenômeno de ação tóxica ao longo do tempo não foi observado e o comportamento do composto no momento de 24h é semelhante ao momento de 48h (Figura 7C e 7D).

De acordo com o cálculo realizado pela regressão linear, o composto 2M (Tabela 3) teve uma média da CC_{50} de 315,13 μ g/mL e o composto 2J (Tabela 3) com CC_{50} de 243,17 μ g/mL. Na avaliação da Citotoxicidade da Anfotericina B foi visto que o fármaco apresentou um aumento da viabilidade proporcional com a diminuição da concentração do fármaco. Este comportamento foi semelhante nos dois tempos testados. A anfotericina apresentou uma média da CC_{50} entre os tempos de 24h e 48h de 13,2 μ g/mL (Figura 7) (Tabela 3).

Com relação ao índice de seletividade das moléculas avaliadas, a 2J apresentou o índice de 13,21, 2M de 13,64 e a anfotericina de 14,66. De acordo com os dados amabas as moléculas (2J e 2M), assim como a anfotericina apresentaram mais seletivas a promastigotas de *L. braziliensis* do que as PBMC humanas (Tabela 3).

Figura 7- Viabilidade das Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis tratados com os compostos heterocíclicos 2J e 2M.

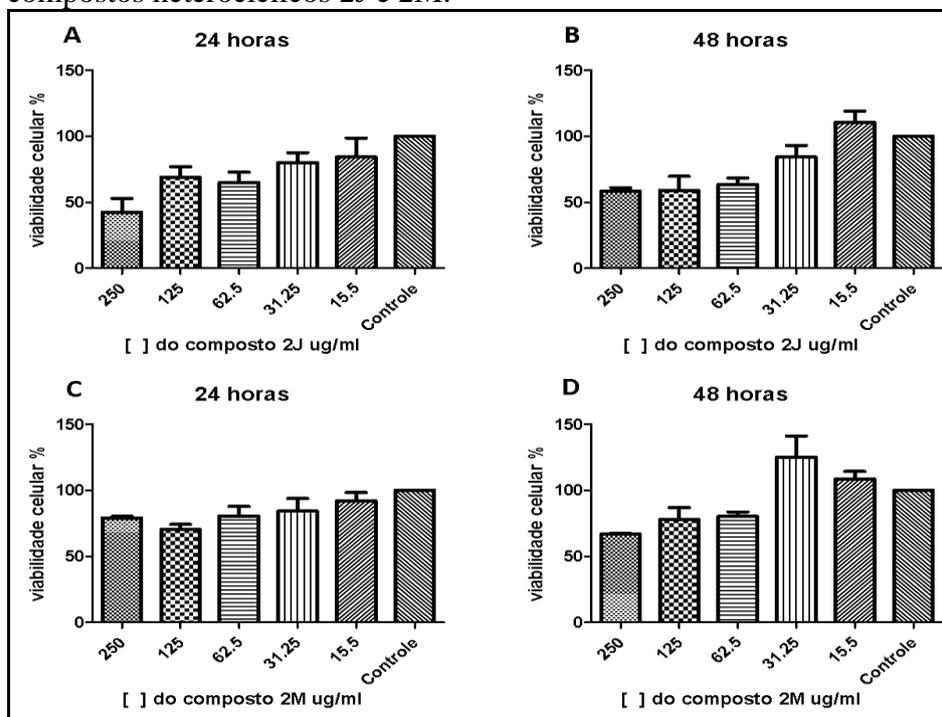
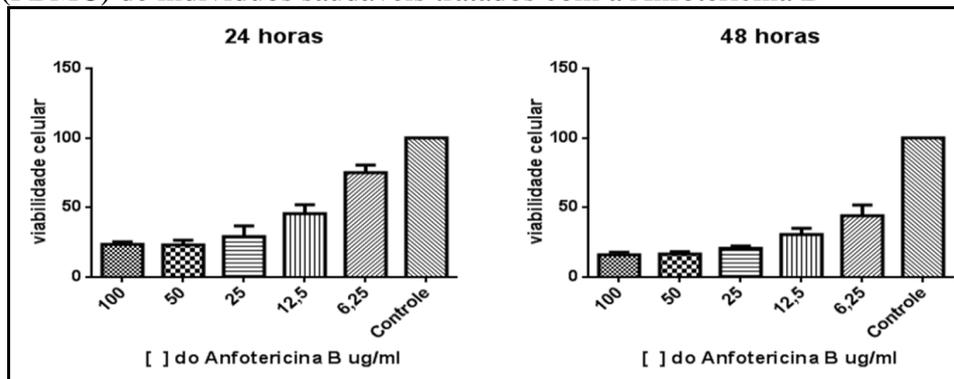


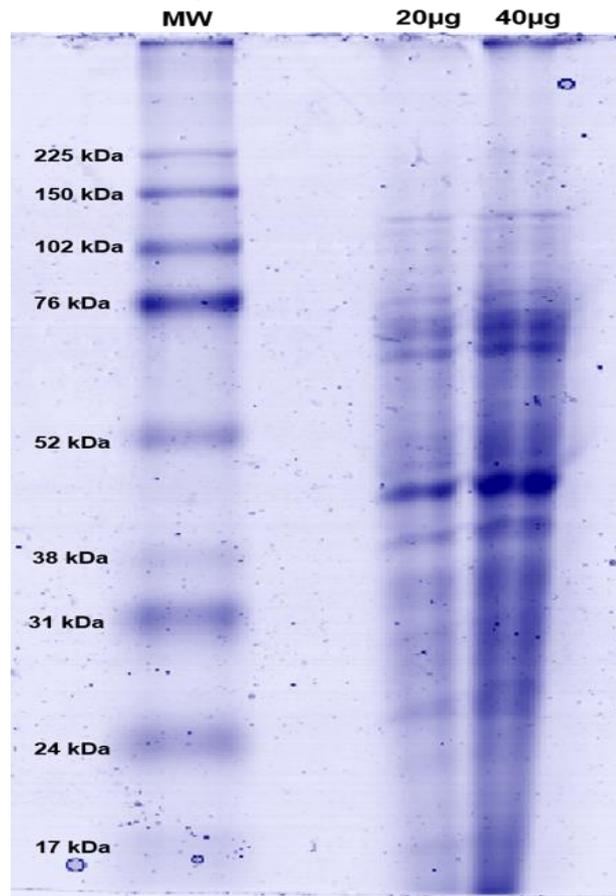
Figura 8- Viabilidade das Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis tratados com a Anfotericina B



5.3 Obtenção dos antígenos solúveis

Os antígenos de *L (V). braziliensis*, apresentaram um adequado padrão de proteínas. A fração antigênica solúvel de *L (V). braziliensis* apresentou proteínas cujos pesos moleculares variaram entre 225kDa e 17 kDa. A partir do gel obtido verificou-se que o antígeno tem perfil condizente com antígenos brutos de *L. braziliensis* e que ele não apresenta sinais de degradação, estando de acordo com o que consta na literatura. Desta forma os antígenos mostraram-se aptos para serem utilizadas nos ensaios imunológicos (Figura 9).

Figura 9- Gel de eletroforese SDS-PAGE corado por azul de Coomassie demonstrando o padrão de bandeamento da fração protéica solúvel purificada de cultura de promastigotas de *L. braziliensis* (AgST) em concentrações de 20 e 40 microgramas.



Legenda- WM- Peso molecular, (AgST) 20ug, (AgST)40ug

5.4 Cinética de tempo de cultivo *versus* resposta Imunológica

No presente estudo, foi avaliado a cinética do tempo (24h, 72h e 5 dias) da resposta imunológica de PBMC para produção das citocinas do perfil Th1 (IL-2, IL-6, TNF, INF- γ) e Th2 (IL-4 e IL-10), cultivadas *in vitro* com os antígenos de *L (V.) braziliensis* nas seguintes condições: Células + antígenos + 2J 1x IC₅₀ (C+A+2J1x); Células + antígenos + 2J 2x IC₅₀ (C+A+2J2X); Células + 2J 1x IC₅₀ (C+2J1X); Células + antígenos (C+A); Células (C) e Células+ antígenos + 2M 1x IC₅₀ (C+A+2M1x); Células+ antígenos + 2M 2x IC₅₀ (C+A+2M2X); Células + 2M 1x IC₅₀ (C+2M1X); Células + antígenos (C+A); Células (C).

De acordo com os resultados obtidos na dosagem de citocinas, os antígenos solúveis de *L. braziliensis* foram capazes de estimular as PBMC dos pacientes portadores da LTA nos tempos de 24h, 72h e 5 dias (Figuras 10 e 11).

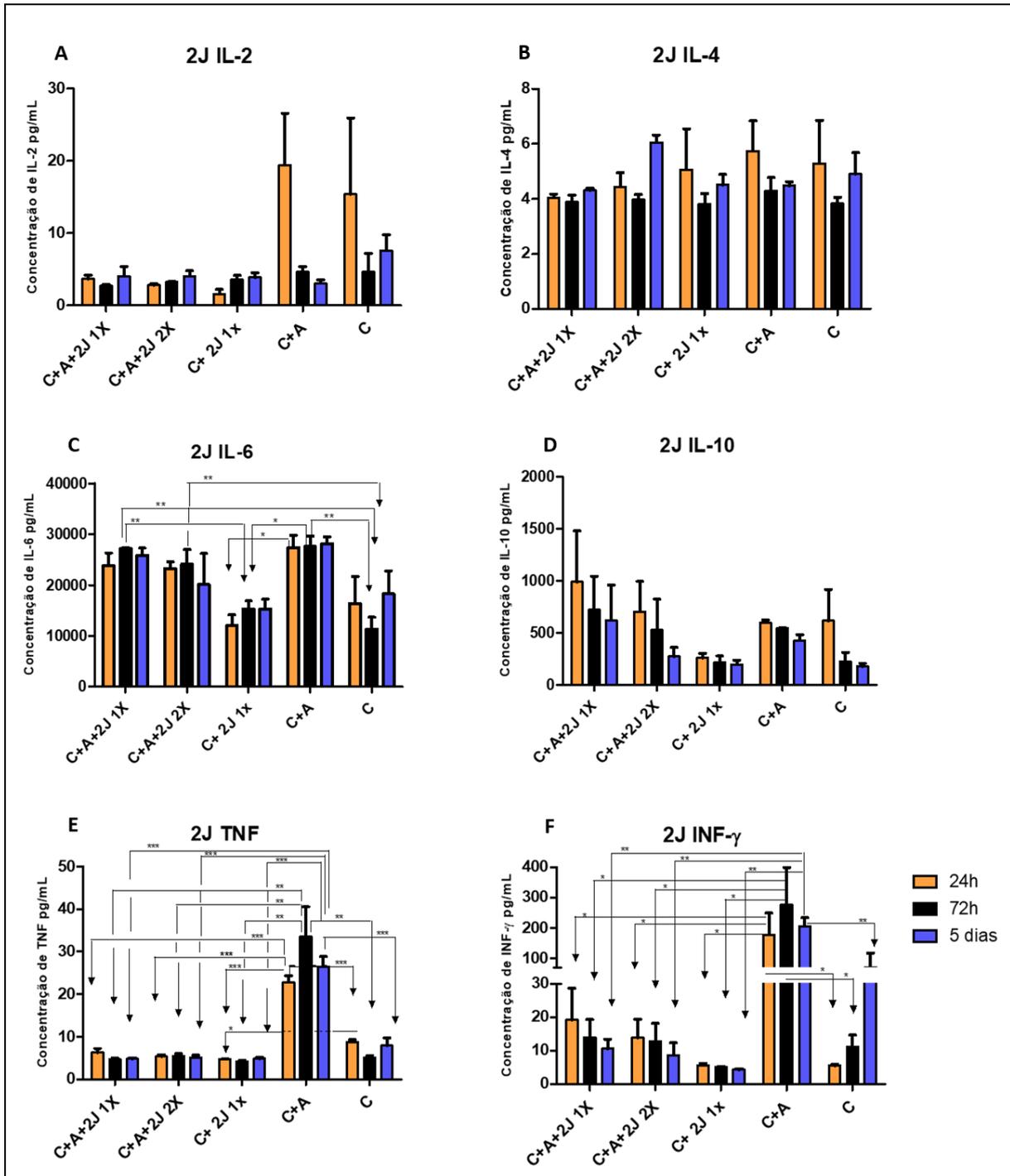
Na avaliação da molécula 2J, tomando com base o controle somente com células, as citocinas IL-2, IL-4 e IL-10 não apresentaram nenhuma diferença avaliando as demais condições (Figuras 10A, 10B e 10D). No entanto para citocina IL-6, pode-se observar que teve um aumento na condição de células estimuladas com o antígeno de *L. braziliensis* e o tratamento com o 2J nas concentrações 1X e 2X (C+A+2J 1X; C+A+2J 2X), nos tempos de 72h e 5 dias, quando comparadas as condições C+2J 1X e C (Figura 10C). Quando avaliada a condição C+A com as condições C+A+2J 1X e C+A+2J 2X, não foi visto diferença significativa nos três tempos avaliados, indicando que o conjunto de células estimuladas e tratadas foi semelhante a condição somente com antígenos (Figura 10C).

Na avaliação das citocinas TNF e INF- γ , apesar de não apresentar diferença estatística com a presença do composto 2J, essas citocinas apresentaram um aumento na condição de C+A, quando comparadas com as demais condições testadas e esse aumento foi observado em todos os tempos avaliados (Figura 10E e 10F).

Na análise das citocinas, na cultura de PBMC, com e sem estímulo, submetidas ao tratamento com o 2M, não foi observado diferença significativa na produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6 e INF- γ (Figuras 11A, 11B, 11C e 11F, respectivamente). Apesar da citocina INF- γ não apresentar dados significativos, foi observado um aumento desta citocina nas condições com a presença dos antígenos, independente do tempo avaliado (Figura 11F).

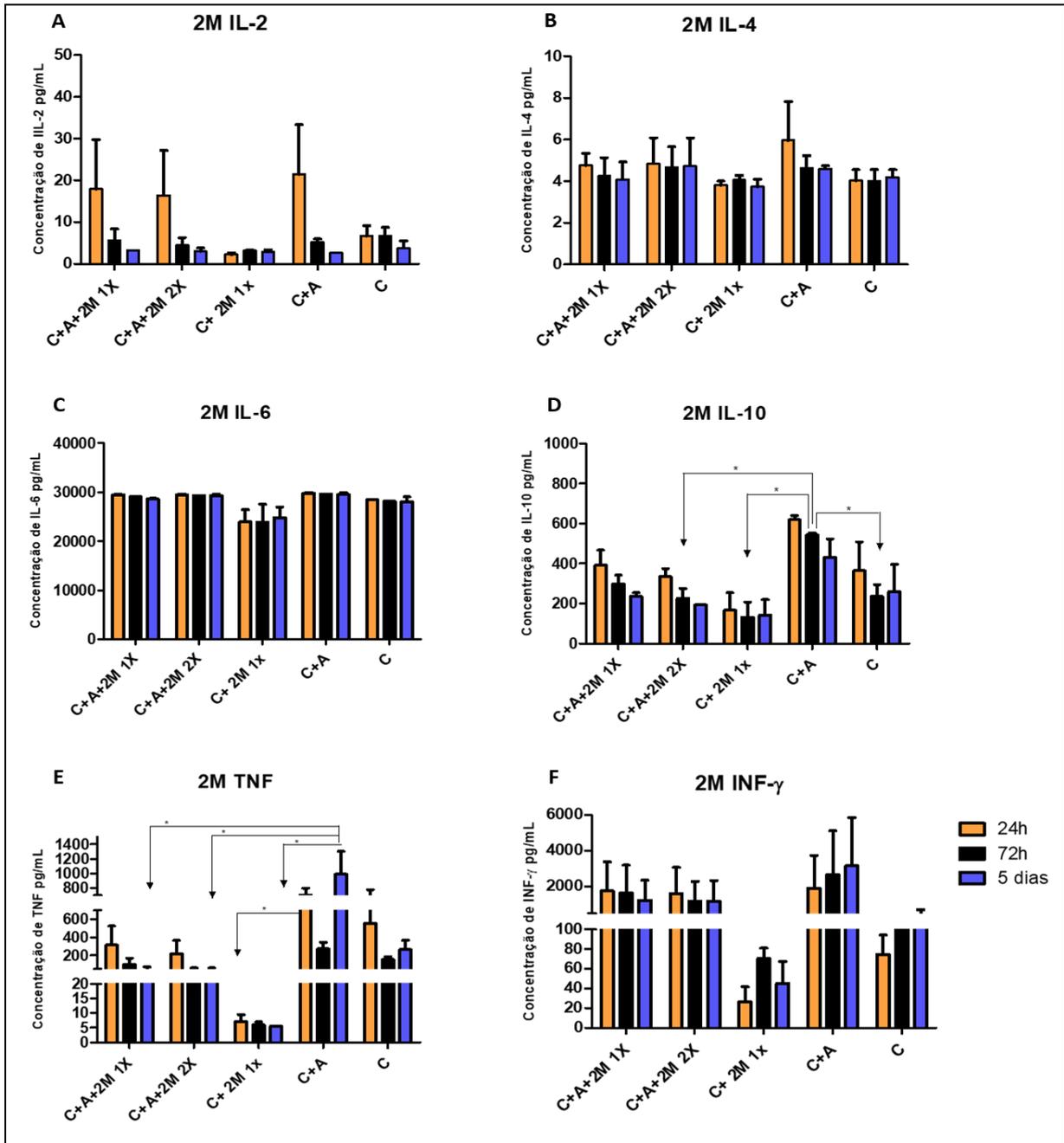
Para esta citocina inflamatória TNF, foi observado uma tendência de diminuição na presença do composto 2M, visto que no tempo de 5 dias houve uma menor produção na presença do 2M (C+A+2M 1X, C+A+2M 2X e C+2M 1X), quando comparadas com a condição C+A (Figura 11 E). Além disso, foi evidenciado uma diminuição do TNF, no tempo de 24h, na condição C+2M 1X quando comparada com a C+A (Figura 11E). Apesar da citocina IL-10 não apresentar diferença significativa na presença dos compostos 2M, foi evidenciado que houve um aumento dessa citocina somente na presença do antígeno solúvel de *L. braziliensis* quando comparados as condições C+A+2M 2X, C+ 2M 1X e C, no tempo de 72h (Figura 11D).

Figura 10- Dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e INF- γ no sobrenadante de PBMC estimuladas com antígenos solúveis de *L. braziliensis* e tratadas com a molécula 2J.



Legenda: O símbolo (*) representa a diferença estatística significativa, onde pValue <0,005. O símbolo (T) representa o desvio padrão das amostras. C+A+2J 1X (Células, antígenos e 2J1X), C+A+2J 2X (Células, antígenos e 2J 2X), C+ 2J 1x (Células e 2J 1X), C+A (Células e antígenos) e C (Células). O p valor é : *p, 0,05, **p, 0,01 e ***p,0,001.

Figura 11- Dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e INF- γ no sobrenadante de PBMC estimuladas com antígenos solúveis de *L. braziliensis* e tratadas com a molécula 2M.



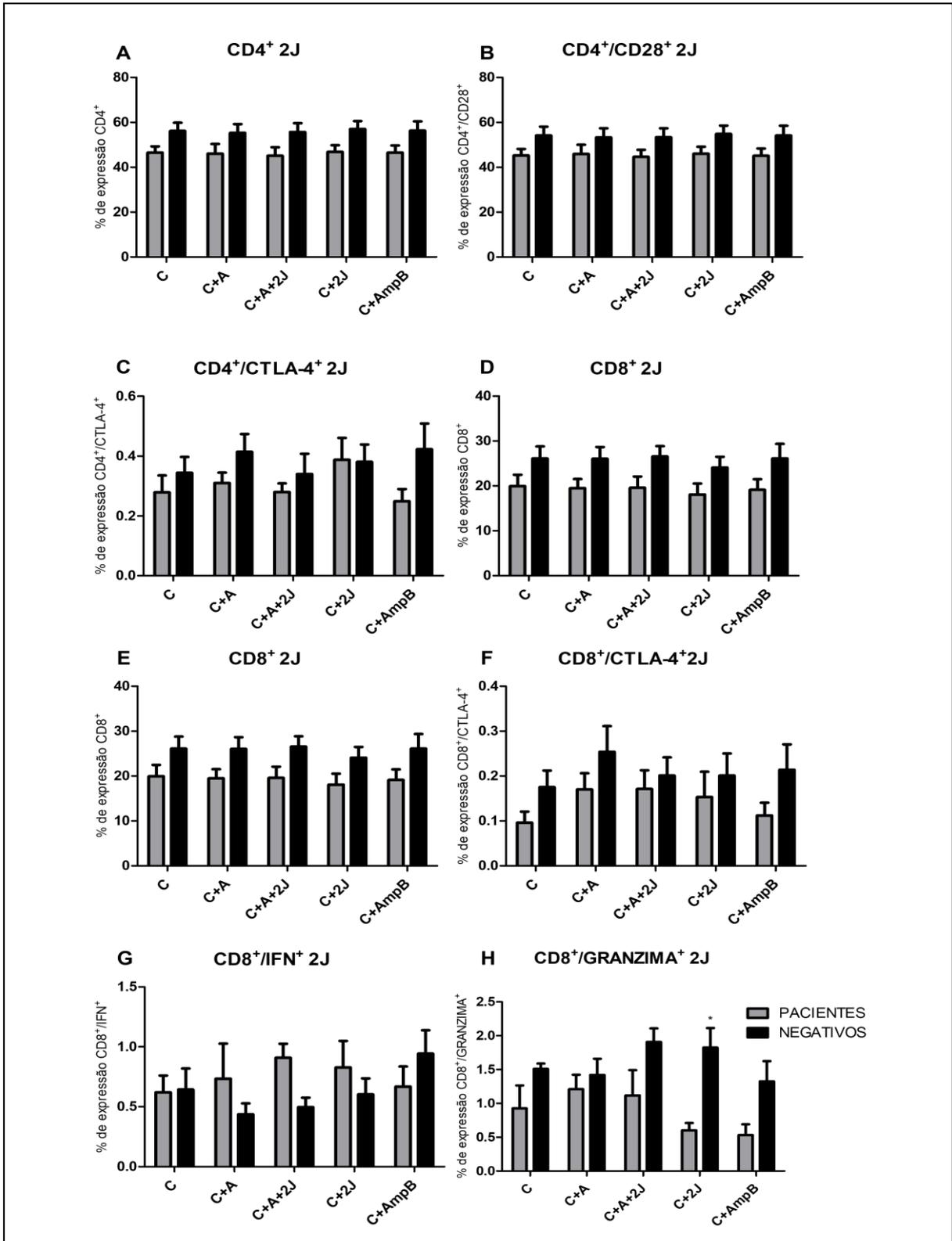
5.5 Expressão de moléculas de ativação/inibição em Linfócitos

De acordo com os achados, analisando a expressão de CD4⁺, CD8⁺ e as moléculas CD28⁺, CTLA-4, Granzima e a citocina intracitoplasmática IFN- γ nas condições: C, C+ANT, C+ANT+2J, C+ANT+2M, C+2J, C+2M e C+AmpB, podemos observar que para ambos os linfócitos a expressão fenotípica foi semelhante em ambos os grupos de estudo, pacientes portadores da LTA e os controles negativos (Figuras 12 e 13).

O tratamento *in vitro* das células com 2J e com 2M, não induziram alterações na expressão de marcadores imunológicos nos linfócitos (Figuras 12 e 13). No entanto, para a molécula 2J, foi visto uma menor expressão de linfócitos TCD8⁺ / Granzima A⁺ em pacientes quando comparados aos indivíduos negativos, na condição de cultivo C+2J (Figura 12H).

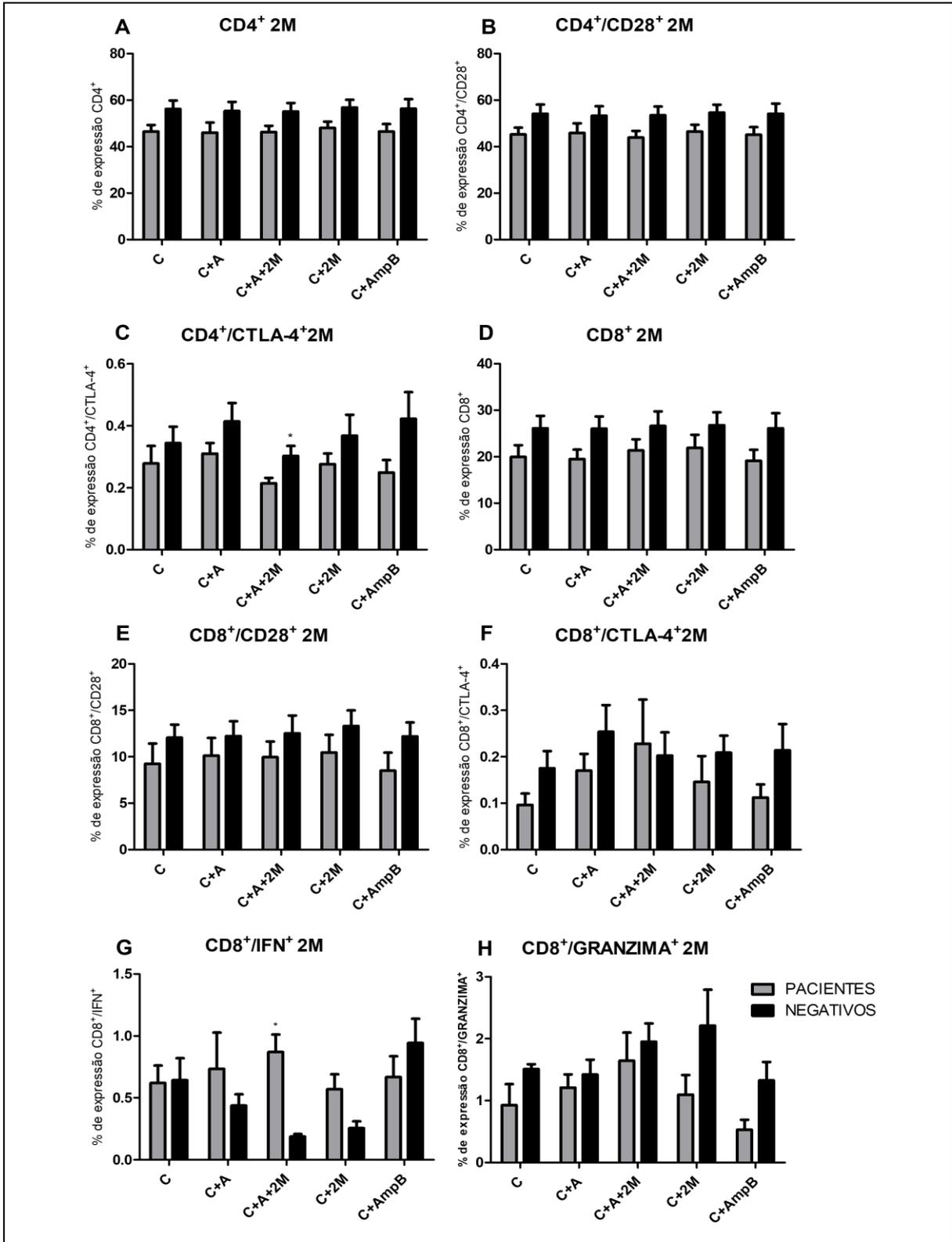
Para a molécula 2M, a expressão de linfócitos CD4⁺/CTLA-4⁺ foi maior no grupo de indivíduos negativos quando comparados aos pacientes, na condição C+A+2M (Figura 13C). Além disso, a expressão de linfócitos TCD8⁺/IFN⁺ foi maior no grupo de pacientes quando comparado ao grupo de controles negativos (Figura 13G).

Figura 12- Expressão dos marcadores fenotípicos para linfócitos CD4⁺(moléculas CD28⁺ e CTLA-4) e T CD8⁺(e moléculas CD28, IFN e Granzima) em PBMC de pacientes com LTA, desafiadas ao antígeno solúvel de *L. braziliensis* e tratadas com a molécula 2J.



Legenda: O símbolo (*) acima da barra representa a diferença estatística entre os grupos de pacientes e negativos. O símbolo (T) representa o desvio padrão das amostras. C (Células); C+A (Células e antígenos); C+A+2J (Células, antígenos e 2J); C+2J (Células e 2J) e C+AmpB (Células e Anfotericina). O p valor é *p, 0.05.

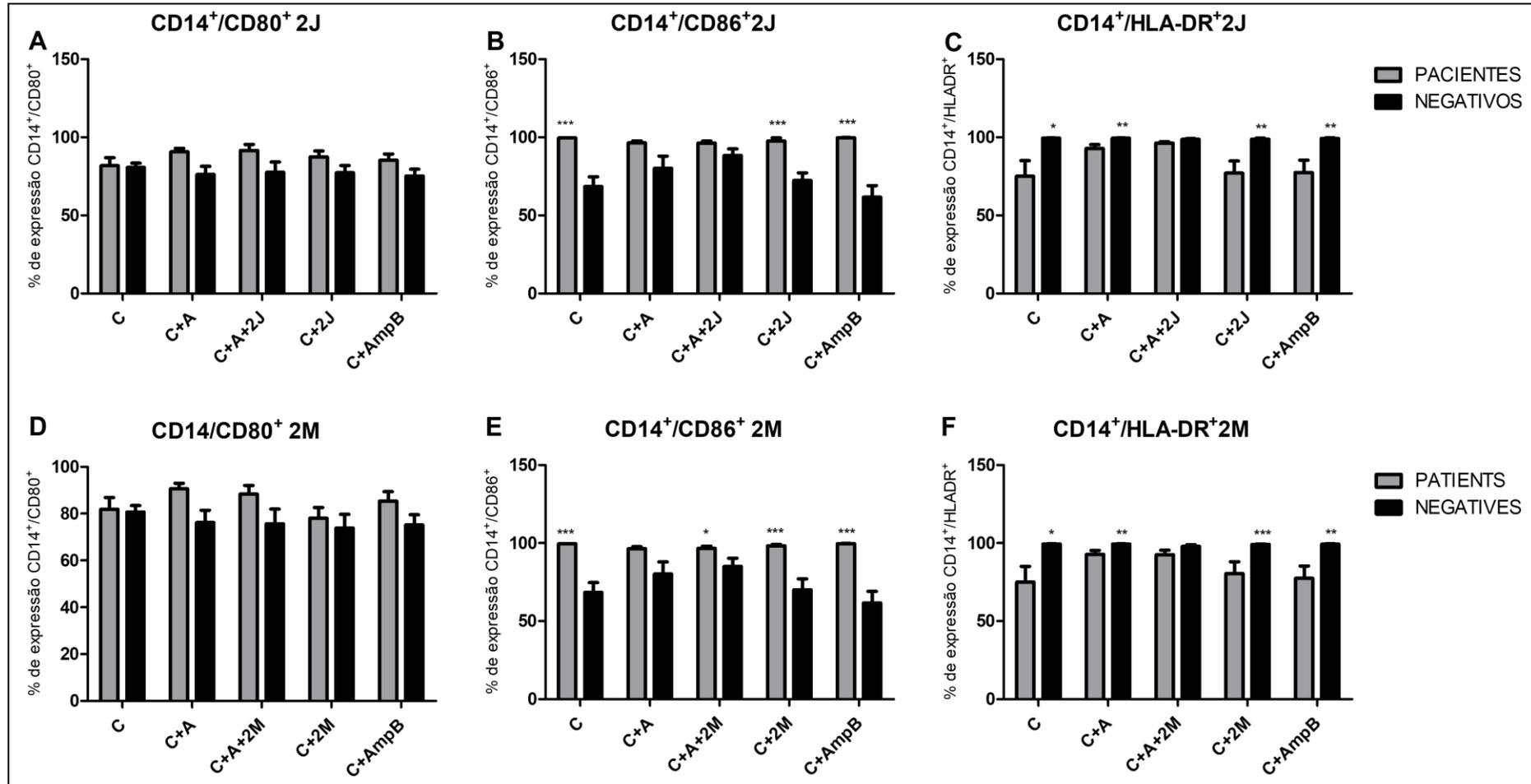
Figura 13- Expressão dos marcadores fenotípicos para linfócitos CD4⁺ (moléculas CD28⁺ e CTLA-4) e T CD8⁺ (e moléculas CD28, CTLA-4, IFN e Granzima) em PBMC de pacientes com LTA, desafiadas ao antígeno solúvel de *L. braziliensis* e tratadas com a molécula 2M.



5.6 Expressão de moléculas co-estimulatórias em Monócitos CD14⁺

Na avaliação da expressão dos monócitos CD14⁺ e as moléculas co-estimulatórias (CD80⁺ e CD86⁺) e o HLA-DR, foram observados que não houve diferença de expressão das moléculas em monócitos CD14⁺ entre as condições de cultivo na presença de 2J, 2M e AmpB. Porém, a expressão de CD14⁺/CD86⁺ foram mais expressos nas células dos pacientes portadores da LTA, quando comparados aos controles negativos, após tratamento com os compostos 2J (C+2J) e 2M (C+A+2M; C+2M), bem como nas condições de cultivo C e C+AmpB (Figuras 14 B e 14E). No entanto para molécula HLA-DR, os achados foram contrários, pois houve aumento dessa molécula nas células dos controles negativos, quando comparados às células dos pacientes, em C, C+A, C+A+2J, C+A+2M e C+AmpB (Figuras 14 C e 14F). Para a molécula CD80⁺, não encontramos diferença estatística entre os grupos de pacientes e negativos.

1 **Figura 14-** Expressão dos marcadores fenotípicos para monócitos CD14 e as moléculas CD80⁺, CD86⁺ e HLA-DR em PBMC de pacientes com
 2 LTA, desafiadas ao antígeno solúvel de *L. braziliensis* e tratadas com as moléculas 2J e 2M.



3
 4 Legenda O símbolo (*) acima da barra representa a diferença estatística entre os grupos de pacientes e negativos. O símbolo (T) representa o desvio padrão das
 5 amostras. C (Células); C+A (Células e antígenos); C+A+2J (Células, antígenos e 2J); C+A+2M (Células, antígenos e 2M); C+2J (Células e 2J); C+2M (Células e
 6 2M) e C+AmpB (Células e Anfotericina). O p valor é :*p, 0.05, **p, 0.01 e ***p, 0.001

5.7 Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura

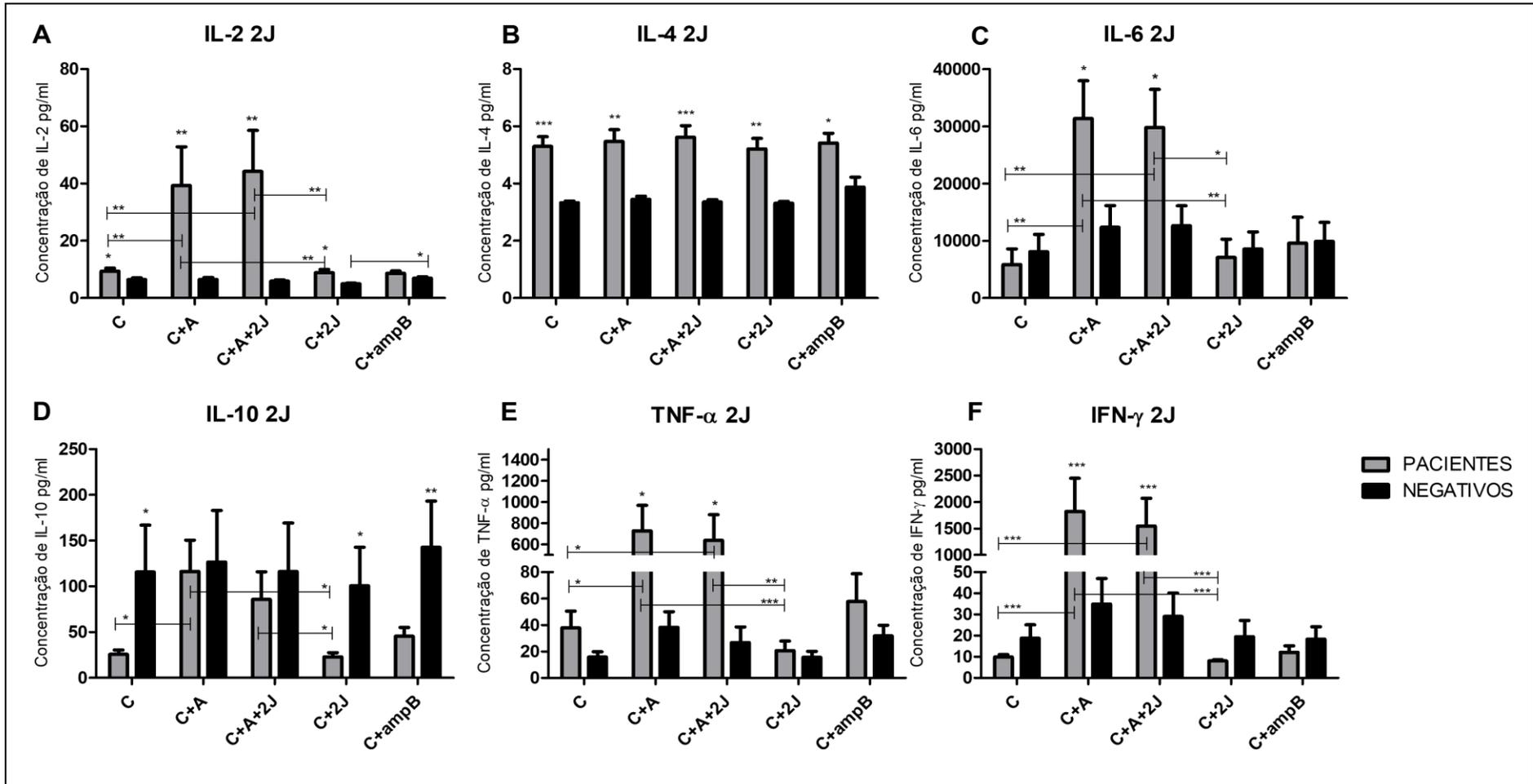
Os níveis de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ foram avaliados no sobrenadante do cultivo de PBMC. A figura 15 mostra as condições cultivo após tratamento *in vitro* com 2J entre pacientes e indivíduos controles. Os pacientes apresentaram maior produção de IL-2 quando comparado aos indivíduos controles negativos em C, C+A, C+A+2J e C+2J (Figura 15A). Além disso, observamos que o desafio com Antígeno induziu níveis mais elevados dessas citocinas, pois diferenças estatísticas significativas em: C+A em relação a C e C+2J e C+A+2J em relação a C e a C+2J, mas nenhuma diferença foi observada entre C+A e C+A+2J quando observado a cultura de células dos pacientes. A maior produção de IL-2 foi estatisticamente significativa em pacientes quando comparado aos indivíduos do grupo controle negativo (Figura 5A). Esses mesmos achados foram observados quanto à produção de IL-4 (Figura 15B), IL-6 (Figura 15C), TNF (Figura 15E) e IFN- (Figura 15F). No entanto, para a citocina IL-10, os controles negativos apresentaram uma maior produção, nas condições que não possuíam o estímulo com os antígenos, mas apenas nas condições C, C+2J e C+AmpB foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Figura 15D). Quando as condições de cultivo foram comparadas, foi verificado níveis maiores estatisticamente significativos dependente a presença do antígeno: C+A apresentaram níveis mais elevados de IL-10 quando comparado a C e a C+2J e C+A+2J em relação à C+2J (Figura 15D).

Nas condições de cultivo após o tratamento com o 2M, nos grupos de pacientes e controle negativos, foram observados achados semelhantes ao tratamento com o 2J (Figura 16). Os pacientes apresentaram uma maior produção da citocina IL-2 quando comparados aos controles negativos em C, C+A, C+A+2M e C+2M (Figura 16A). Também foi evidenciado que a estimulação com os antígenos levou a uma maior produção dessa citocina, visto que houve diferença estatística significativa nas condições: C+A em relação a C e C+2M e C+A+2M em relação a C e a C+2M (Figura 16A). Contudo não foi observado diferença entre as condições C+A em relação a C+A+2M, no grupo de pacientes (Figura 6A). No grupo de pacientes também evidenciamos uma maior produção da IL-2, quando comparados com o grupo controle negativo (Figura 16A). Esses mesmos resultados foram observados quanto à produção de IL-4 (Figura 16B), IL-6 (Figura 16C), TNF (Figura 16E) e IFN- (Figura 16F). Contudo, analisando a citocina IL-10, os controles negativos apresentaram uma maior produção, nas condições que não possuíam o estímulo com os antígenos, assim como no tratamento com a molécula 2J (Figura 16D) e quando as condições de cultivo foram

41 comparadas, também foi verificado níveis maiores estatisticamente significativos dependente
42 a presença do antígeno, mesmo fenômeno encontrado para a molécula 2J (Figura 16D).

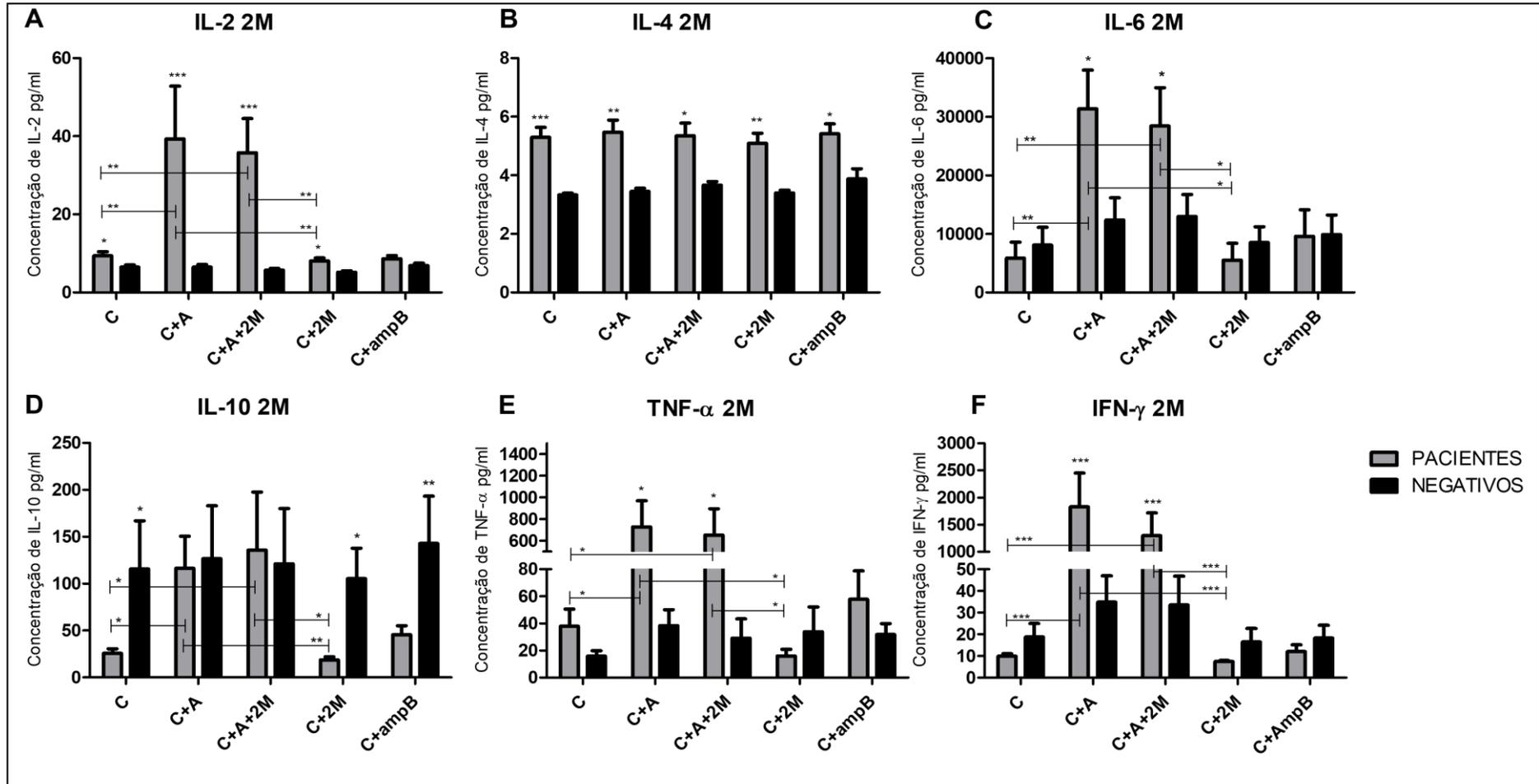
43

44 **Figura 15-** Dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ no sobrenadante de PBMC de portadores da LTA e controles
 45 negativos, desafiadas *in vitro* com antígenos solúveis de *L. braziliensis* e tratadas com a molécula 2J e a Anfotericina.



46
 47 Legenda: O símbolo (*) acima da barra representa a diferença estatística entre os grupos de pacientes e negativos. O símbolo (T) representa o desvio padrão das amostras. C
 48 (Células); C+A (Células e antígenos); C+A+2J (Células, antígenos e 2J); C+2J (Células e 2J) e C+ampB (Células e Anfotericina). O p valor é: *p, 0.05, **p, 0.01 e ***p,
 49 0.001
 50

51 **Figura 16-** Dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ no sobrenadante de PBMC de portadores da LTA e controles
52 negativos, desafiadas *in vitro* com antígenos solúveis de *L. braziliensis* e tratadas com a molécula 2M e a Anfotericina.



53
54 Legenda: O símbolo (*) acima da barra representa a diferença estatística entre os grupos de pacientes e negativos. O símbolo (T) representa o desvio padrão das amostras.
55 C+A (Células e antígenos); C+A+2M (Células, antígenos e 2M); C+2J (Células e 2M) e C+ampB (Células e Anfotericina). O p valor é: *p, 0.05, **p, 0.01 e ***p, 0.001.
56
57

58 **5.8 Microscopia eletrônica de Varredura de PBMC estimuladas com antígenos de *L.***
59 ***braziliensis* e tratadas as moléculas 2J e 2M**

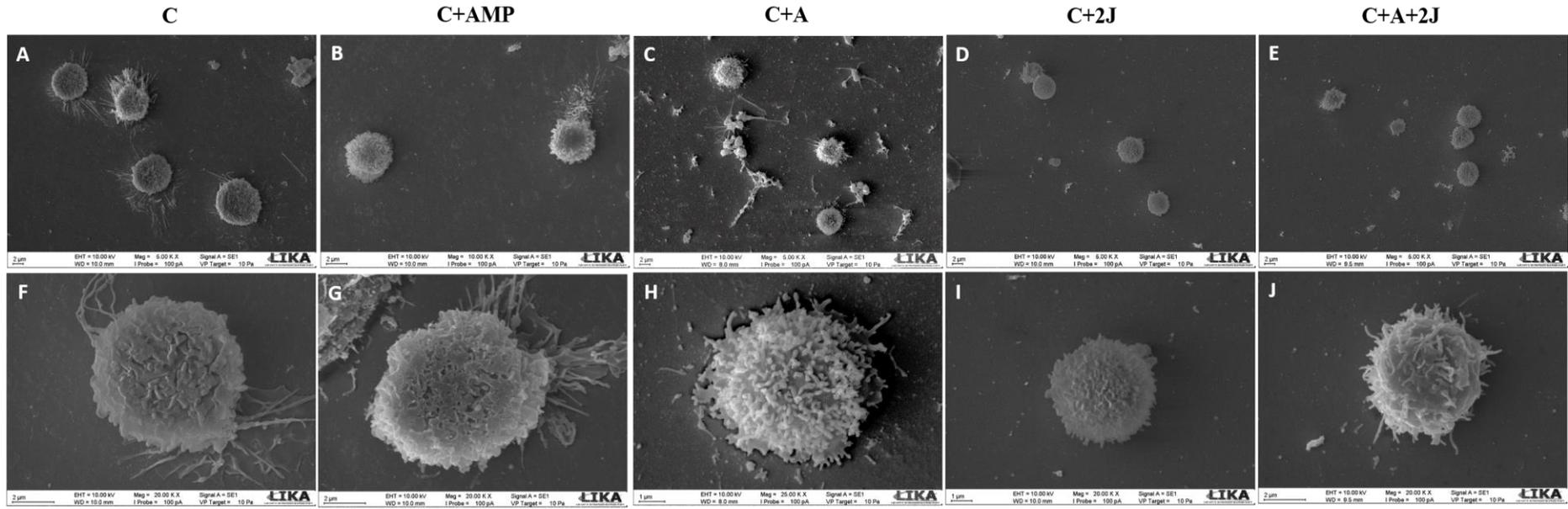
60

61 De acordo com os achados da Microscopia eletrônica de varredura, para os linfócitos,
62 foram observados que os controles somente com células (Figura 17A e 17F) e células tratadas
63 com a anfotericina (Figura 17B e 17G) foram evidenciados projeções das membranas. Já na
64 presença dos antígenos solúveis de *L. braziliensis* (C+A), as células apresentaram sinais de
65 ativação com aumento de projeções das membranas em toda superfície celular, quando
66 comparados ao controle somente com células (Figura 17C e 17H).

67 Com relação ao tratamento com as moléculas, os linfócitos tratados com 2J,
68 apresentaram uma discreta diminuição nas projeções membranosas, quando comparados ao
69 controle somente com células (Figuras 17D, 17E, 17I e 17J). Para a molécula 2M, as células
70 apresentaram morfologia semelhante ao controle com células, mantendo as projeções das
71 membranas (Figuras 18D, 18E, 18I e 18J).

72 Analisando a morfologia dos monócitos, foram observados que o controle somente
73 com células apresentou monócitos com projeções de membrana e células mais afastadas
74 (Figuras 19A, 19F, 20A e 20F). Quando avaliado o controle de células tratadas com a
75 anfotericina (Figuras 19B, 19G, 20B e 20G) e o controle de células com antígenos (Figura
76 19C, 19H, 20C e 20H), foram encontradas interação célula-célula e aumento de agregação
77 celular. Quando avaliados os tratamentos com as moléculas 2J (Figuras 19D, 19E, 19I e 19J)
78 e 2M (Figuras 20D, 20E, 20I e 20J), foram observados o mesmo padrão do controle somente
79 com antígenos, interação célula-célula e agregado celular.

80 **Figura 17-**Eletromicrografia de Linfócitos estimulados com antígenos de *L. braziliensis* e tratados a molécula 2J e anfotericina.

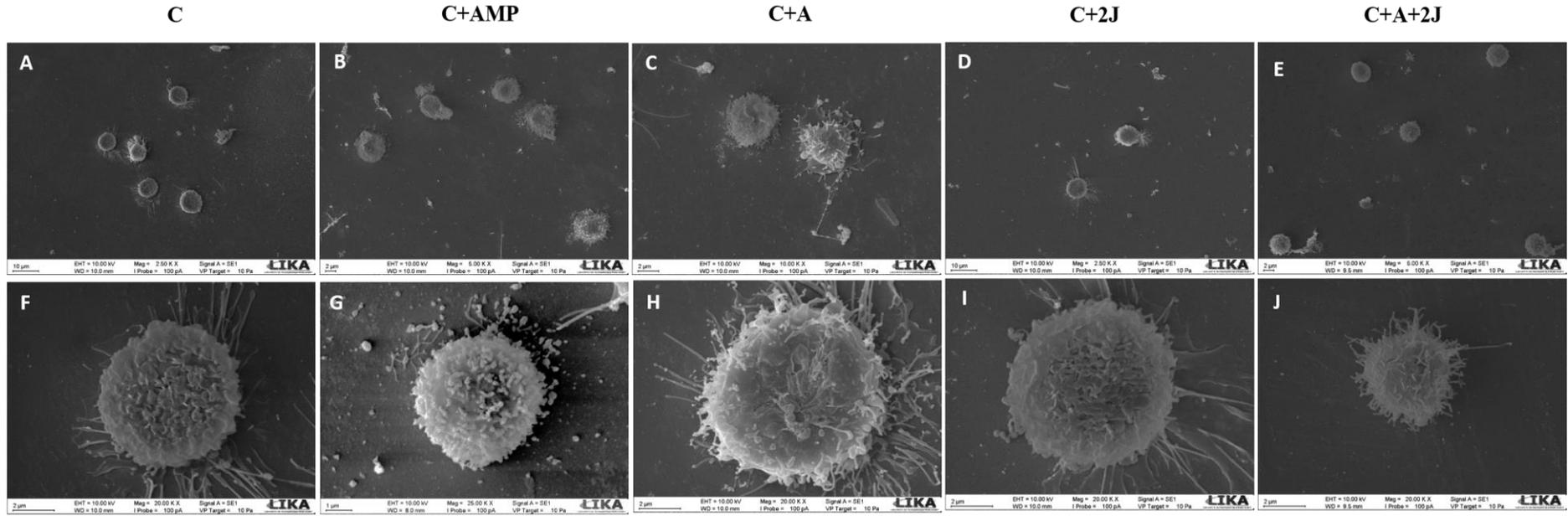


81

82 Legenda: C (Células); C+A (Células e antígenos); C+A+2J (Células, antígenos e 2J); C+2J (Células e 2J) e C+AmfB (Células e Anfotericina).

83

84 **Figura 18**-Eletromicrografia de Linfócitos estimulados com antígenos de *L. braziliensis* e tratados com compostos 2M e anfotericina.

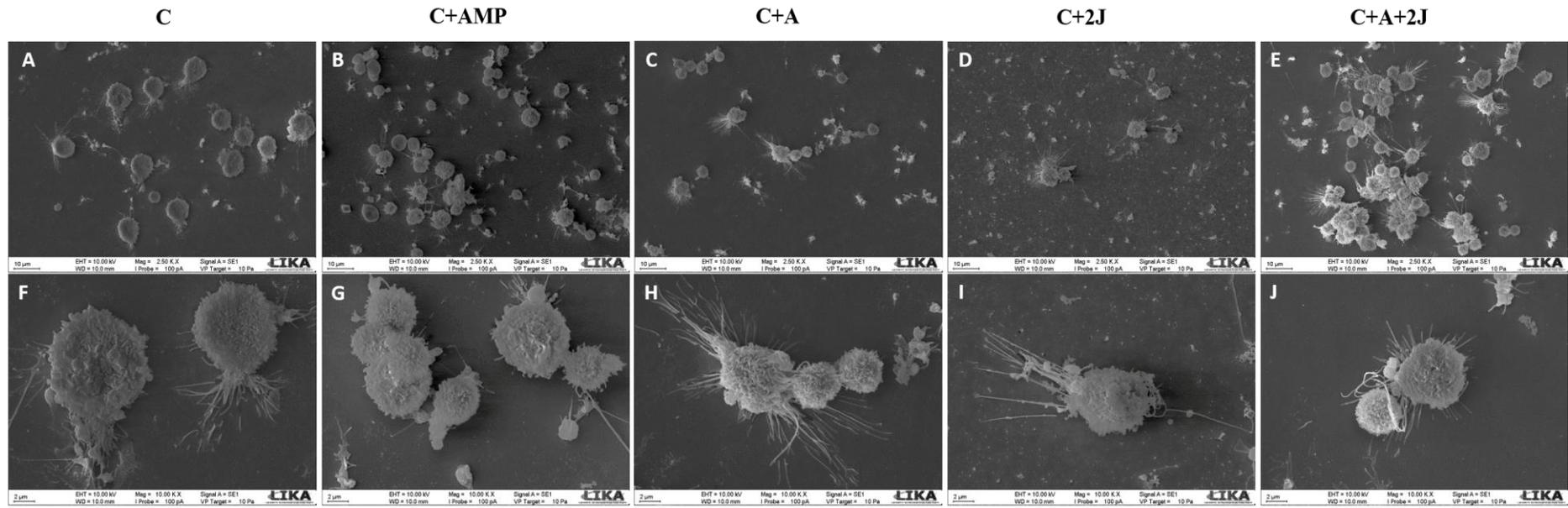


85

86 Legenda: C (Células); C+A (Células e antígenos); C+A+2M (Células, antígenos e 2M); C+2J (Células e 2M) e C+AmpB (Células e Anfotericina).

87

88 **Figura 19-**Eletromicrografia de monócitos estimulados com antígenos de *L. braziliensis* e tratados com a molécula 2J e anfotericina.

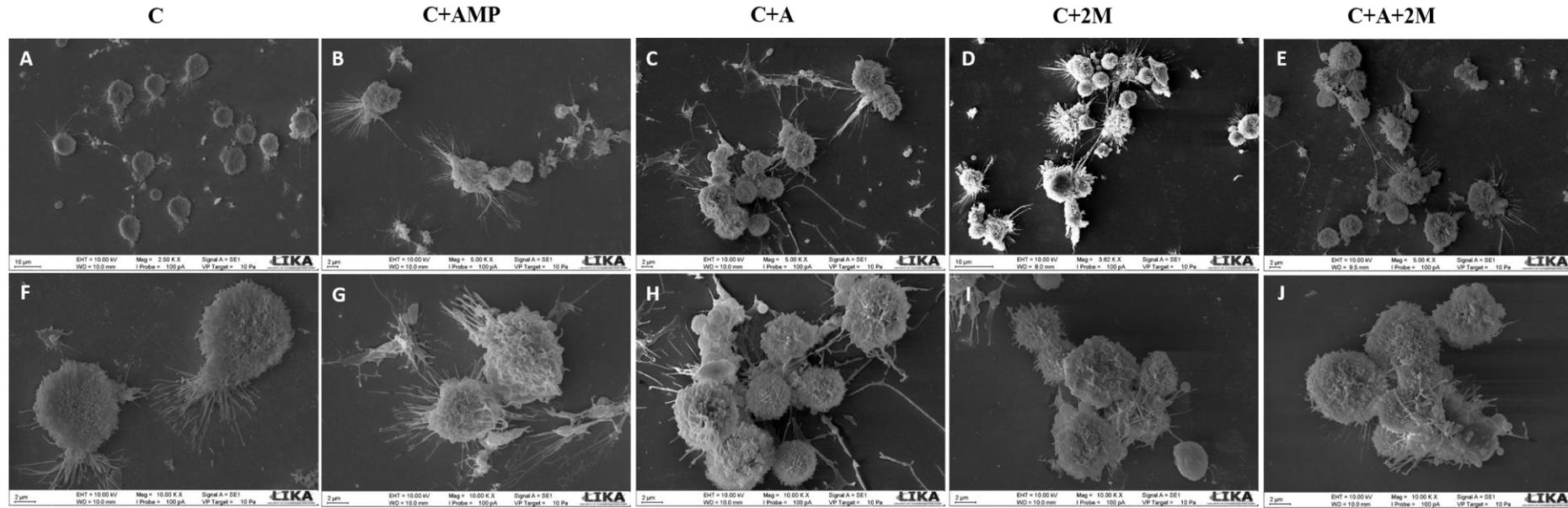


89
90
91

Legenda: C (Células); C+A (Células e antígenos); C+A+2J (Células, antígenos e 2J); C+2J (Células e 2J) e C+AmpB (Células e Anfotericina).

92 **Figura 20-**Eletromicrografia de monócitos estimulados com antígenos de *L. braziliensis* e tratados com a molécula 2M e anfotericina.

93



94

95

96

Legenda: C (Células); C+A (Células e antígenos); C+A+2M (Células, antígenos e 2M); C+2J (Células e 2M) e C+AmpB (Células e Anfotericina).

97 **5.9 Microscopia eletrônica de Transmissão de PBMC estimuladas com antígenos de *L.***
98 ***braziliensis* e tratadas as moléculas 2J e 2M.**

99

100 Analisando os linfócitos controle (somente com células), através da microscopia
101 eletrônica de Transmissão observamos estrutura celular conservadas, como presença de
102 projeções das membranas, de muitas mitocôndrias indicando alta atividade celular, estruturas
103 citoplasmáticas como vesícula autofágica, gotículas de lipídios, grânulos e a presença do
104 complexo de Golgi. Também foram observadas uma grande quantidade de ribossomos e a
105 eucromatina e heterocromatina bem distribuídas no núcleo (Figuras 21A; 21B e 22A; 22B).

106 Nos linfócitos tratados com a anfotericina, observamos também muitas mitocôndrias e
107 projeções de membranas, como visto no controle (apenas células). Observamos também a
108 presença do complexo de Golgi e estruturas lamelares em processo de mielinização sugerindo
109 estresse celular (Figuras 21D e 22D). No controle de células estimuladas com os antígenos,
110 foram encontrados aumento das projeções de membranas nos linfócitos e assim como os
111 demais controles, foram observados mitocôndrias, ribossomos e vesículas bem distribuídos
112 pelo citoplasma (Figuras 21F e 22F).

113 Na análise dos linfócitos tratados com as moléculas 2J, com ou sem estímulo dos
114 antígenos, foram observadas células com poucas projeções das membranas, núcleo ocupando
115 quase todo o citoplasma, presença de retículo endoplasmático rugoso e vários ribossomos
116 (Figuras 21G, 21H, 21I e 21J). Para a molécula 2M, com ou sem estímulo dos antígenos, os
117 achados foram semelhantes aos controles somente com células e a anfotericina, eucromatina e
118 heterocromatina bem distribuídas, presença de várias mitocôndrias e ribossomos (Figuras
119 22G, 22H, 22I e 22J).

120 Na avaliação dos monócitos, a condição somente com células, observamos a presença
121 de mitocôndrias distribuídas por todo citoplasma celular, retículo endoplasmático liso e
122 vesículas autofágicas, projeções das membranas e maior presença de heterocromatina no
123 núcleo (Figuras 23A; 23B; 24A e 24B). Quando os monócitos foram tratados com
124 anfotericina observamos; mitocôndrias, vacúolos autofágicos e estruturas lamelares de
125 processo de mielinização, sugerindo também estresse celular, situação já observada nos
126 linfócitos, nas mesmas condições (Figuras 23C, 23D, 24C e 24D).

127 Na análise dos monócitos estimulados com os antígenos, observamos o aumento da
128 presença de projeções das membranas, núcleo com ilhas de heterocromatina, citoplasma com
129 poucas mitocôndrias, vários ribossomos e múltiplas vesículas (Figuras 23E, 23F, 24E e 24F).

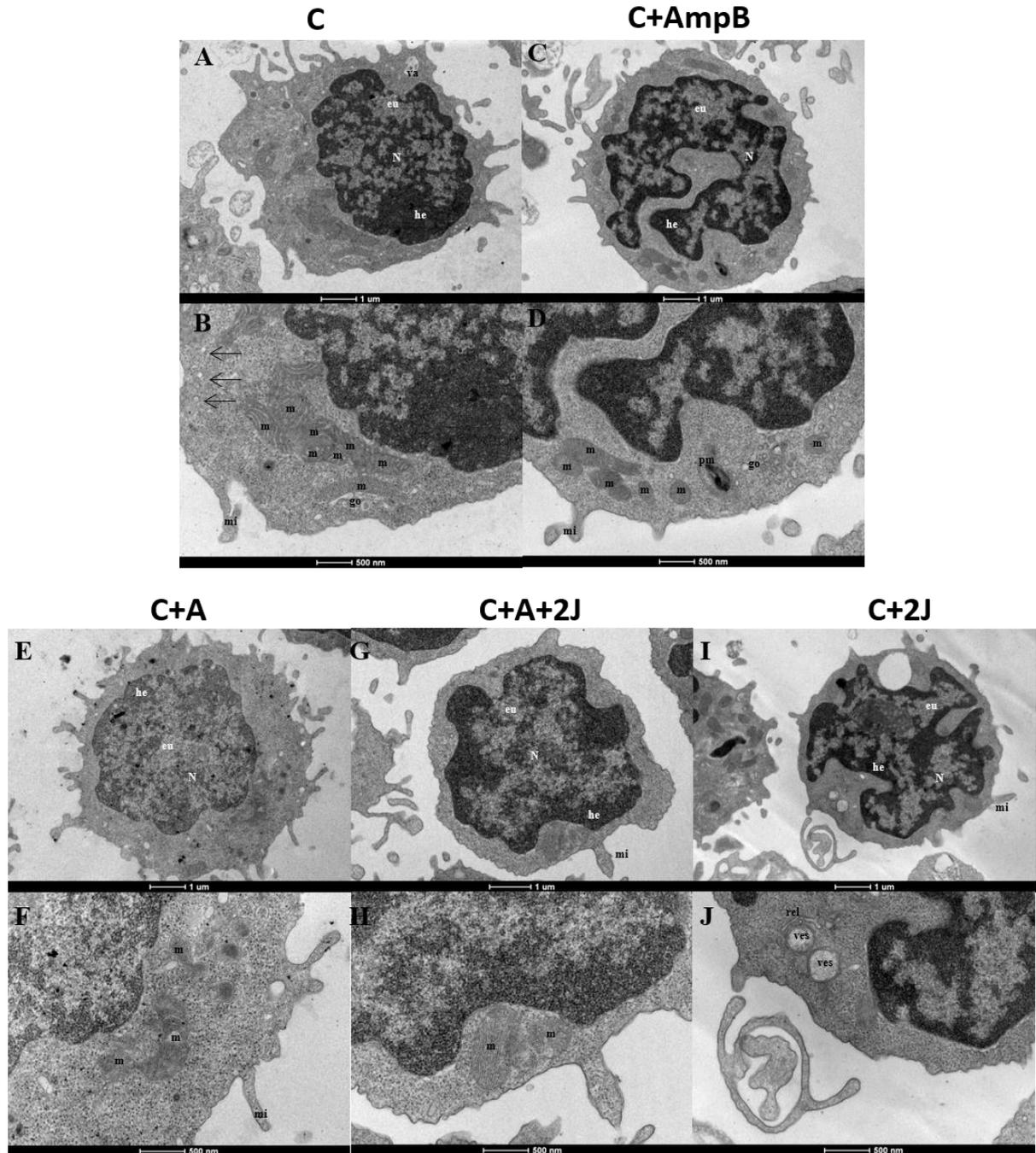
130 Quando os monócitos foram observados na condição (C+A+2J) células estimuladas
131 com os antígenos e tratadas com 2J, evidenciamos a presença de projeções das membranas,
132 mitocôndrias, vacúolos autofágicos e grânulos (Figuras 23G e 23H). Contudo na condição
133 (C+2J), células e a molécula 2J, observamos presença de mitocôndrias, grânulos, diminuição
134 das projeções das membranas e presença de processos mielinizantes sugerindo que o
135 composto 2J levou os monócitos ao estresse, não ocorrendo o mesmo aos linfócitos (Figuras
136 23I e 23J).

137 Com relação as alterações relacionadas aos monócitos estimulados com antígenos e
138 tratados com 2M observamos poucas projeções das membranas, com núcleo ocupando boa
139 parte do citoplasma. Presença de Mitocôndrias, grânulos, complexo de Golgi, vesículas
140 autofágica, ribossomos e uma discreta formação do processo de mielinização (Figuras 24G e
141 24H). Na condição(C+2M), apresentou os mesmos achados da condição C+A+2M, com
142 exceção dos processos de mielinização, que não foram encontrados nesta condição (Figuras
143 24I e 24J).

144

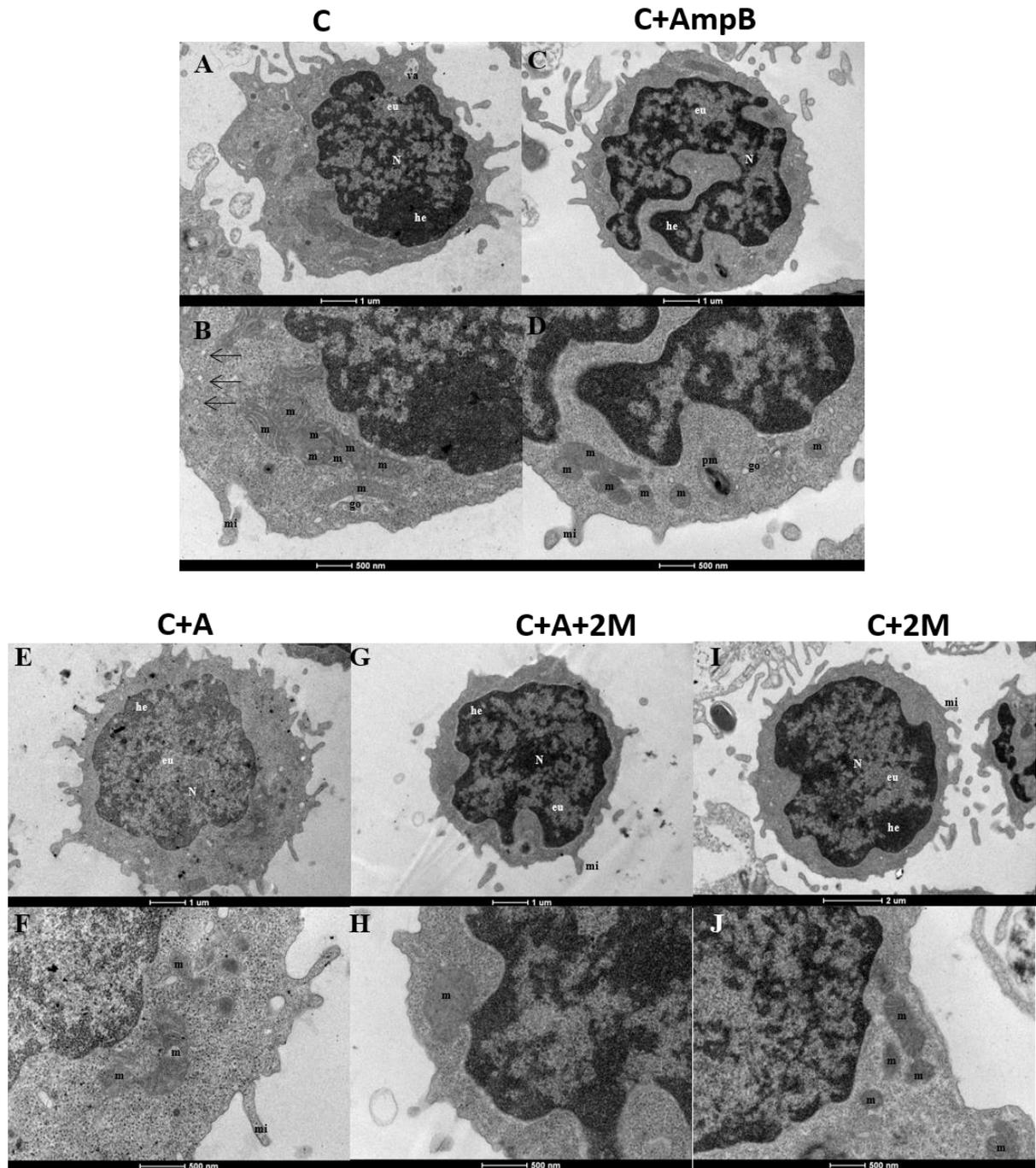
145

146 **Figura 21-** Eletromicrografia de transmissão dos linfócitos estimulados com antígenos de *L.*
 147 *braziliensis* e tratados com a molécula 2J e anfotericina.



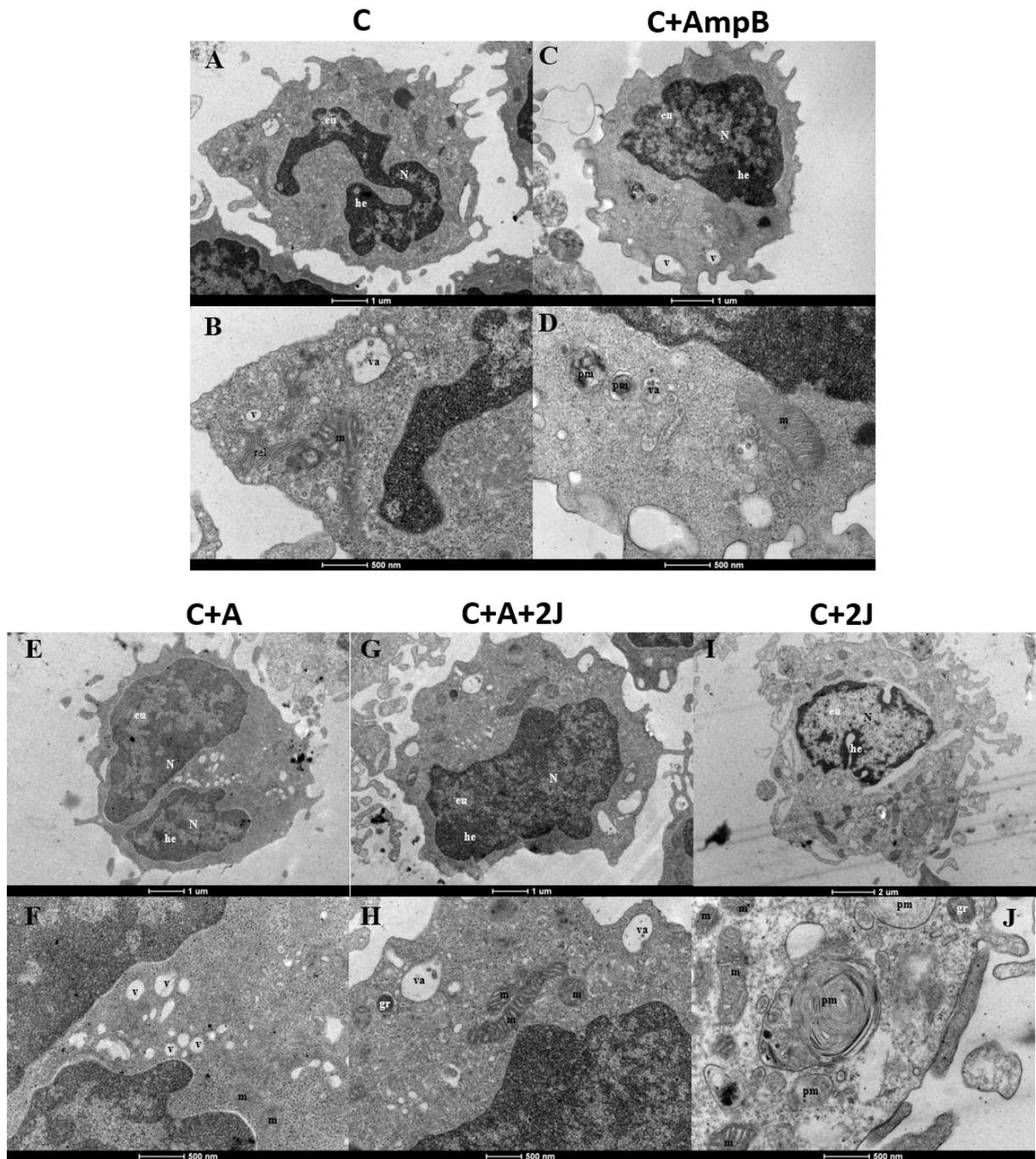
148
 149 Legenda: C (Células); C+A (Células e antígenos); C+A+2J (Células, antígenos e 2J); C+2J (Células e 2J) e
 150 C+AmpB (Células e Anfotericina). N- núcleo; eu-eucromatina. he-heterocromatina; m- mitocôndria; go-
 151 complexo de Golgi; pm-processo mielinizante; mi-microvilosidades, va-vacúlo autofágicos, ves-vesículas; rel-
 152 retículo endoplasmático e setas-gotículas de lipídios.
 153

154 **Figura 22-** Eletromicrografia de transmissão dos linfócitos estimulados com antígenos de *L.*
 155 *braziliensis* e tratados com a molécula 2M e anfotericina.



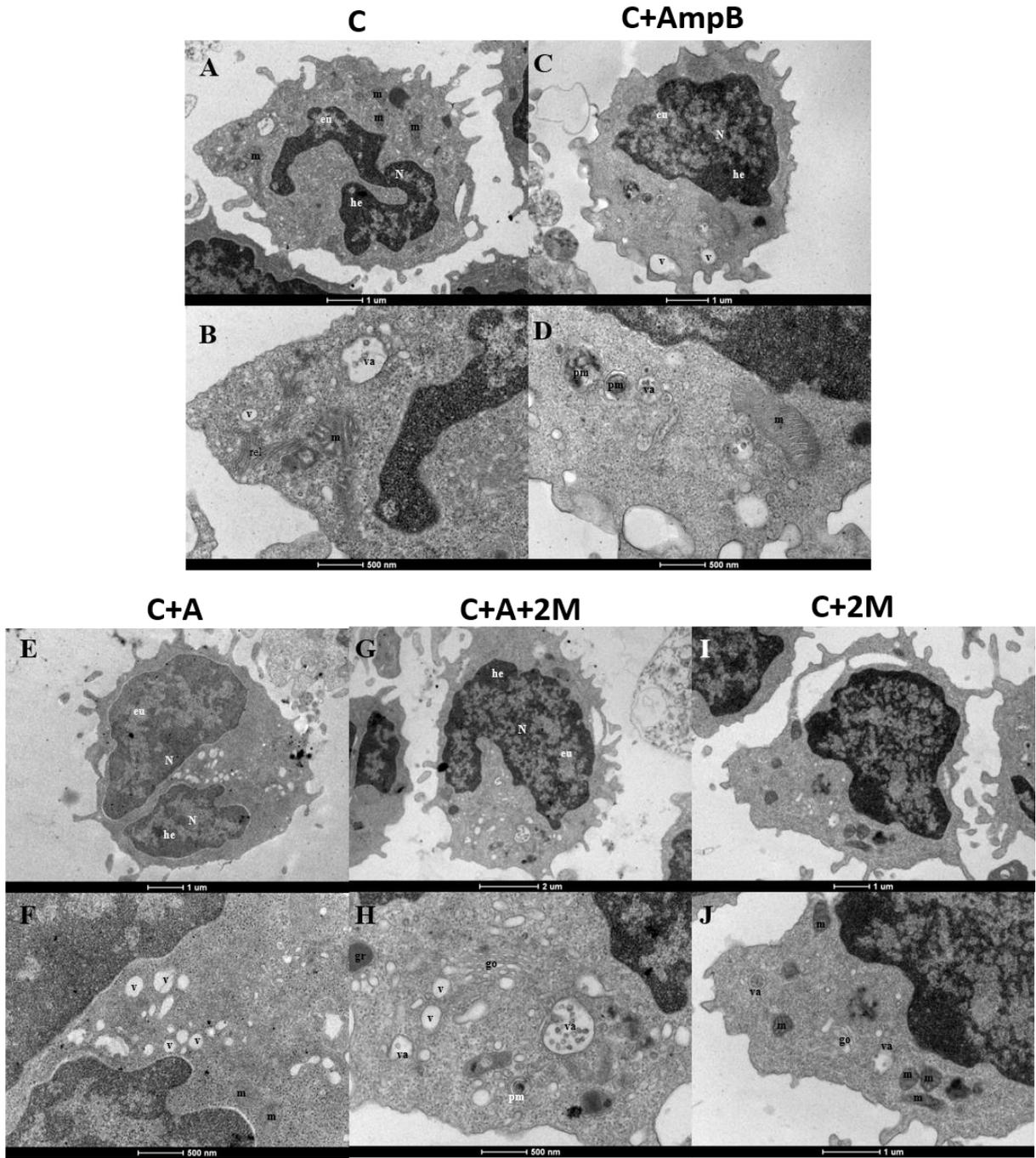
156
 157 Legenda: C (Células); C+A (Células e antígenos); C+A+2M (Células, antígenos e 2M); C+2M (Células e 2M) e
 158 C+AmpB (Células e Anfotericina). N- núcleo; eu-eucromatina. he-heterocromatina; m- mitocôndria; go-
 159 complexo de Golgi; pm-processo mielinizante; mi-microvilosidades, va-vacúlo autofágicos, ves-vesículas e
 160 setas-gotículas de lipídios.
 161

162 **Figura 23-** Eletromicrografia de transmissão dos monócitos estimulados com antígenos de *L.*
 163 *braziliensis* e tratados com a molécula 2J e anfotericina.



164
 165 Legenda: C (Células); C+A (Células e antígenos); C+A+2J (Células, antígenos e 2J); C+2J (Células e 2J) e
 166 C+AmpB (Células e Anfotericina).
 167

168 **Figura 24-** Eletromicrografia de transmissão dos monócitos estimulados com antígenos de *L.*
 169 *braziliensis* e tratados com a molécula 2M e anfotericina.



170
 171
 172

Legenda: C (Células); C+A (Células e antígenos); C+A+2M (Células, antígenos e 2M); C+2J (Células e 2M) e C+AmpB (Células e Anfotericina).

6 DISCUSSÃO

A classe dos Ftalimidas e Tiazóis são amplamente utilizados na indústria farmacêutica como antirretrovirais (SHARMA et al., 2010), anti-inflamatório (LIMA et al., 2002) e antitumoral (COÊLHO et al., 2014). Em trabalhos recentes avaliando a eficácia dessa classe em tripanosomatídeos, foi visto que as moléculas 2J e 2M, mostraram-se eficientes contra espécies de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* (ALIANÇA, et al., 2017; GOMES et al., 2016). Além de atividade leishmanicida relevante, as moléculas também apresentaram baixa toxicidade (ALIANÇA, et al 2017).

A classe Ftalimidas são conhecidas pela atividade imunomoduladora, sendo a inibição da citocina fator de necrose tumoral (TNF- α) bem investigada e com destacada importância por ser considerada mediadora dos processos inflamatórios e tumorais (TEO, 2005). Os Tiazóis também possuem atividade Imunomoduladora e ação citotóxica em diferentes tipos de tumores (LEFRANC et al., 2013).

Com relação aos nossos achados para citotoxicidade em células mononucleares humanas, observamos que as moléculas 2J e 2M apresentaram baixa toxicidade em PBMC, corroborando com os achados na literatura, que utilizaram outros modelos celulares não humano (GOMES et al., 2016; ALIANÇA et al., 2017; DE OLIVEIRA BARBOSA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2018).

A baixa toxicidade do 2J é justificada pela presença do substituinte derivado de fenil, como descrito no estudo de Gomes et al. (2016) e Aliança et al. (2017), em esplenócitos de camundongo e células VERO /macrófago J77, respectivamente. Já para a molécula 2M, baixa toxicidade não está ligada diretamente a presença do substituinte cloro, uma vez que outras moléculas que contém esse mesmo substituinte apresentam alta toxicidade, porém Barbosa et al. (2019) e Aliança et al. (2017) sugerem que a baixa toxicidade possa estar associada a posição que este substituinte foi inserido na molécula.

Para escolha de composto com potencial quimioterápico, deve-se levar em consideração a sua citotoxicidade, assim como, sua ação frente ao microrganismo. De acordo com os nossos achados as moléculas 2J e 2M apresentaram atividade leishmanicida em promastigotas de *Leishmania braziliensis*. Resultados semelhantes foram encontrados para ambas as moléculas em Aliança et al. (2017), em que os autores encontraram atividade leishmanicida frente a *Leishmania infantum*. Além da atividade biológica sobre espécies de *Leishmania*, a molécula 2J foi capaz de inibir o crescimento das formas evolutivas epimastigota e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (GOMES et al., 2016). Por outro lado, o

composto 2M, além da atividade sobre Tripanosomatídeos, também mostrou atividade relevante contra a larva e verme adulto do *Schistosoma mansoni* (DE OLIVEIRA BARBOSA et al., 2019).

O tratamento das leishmanioses depende exclusivamente de quimioterapia, incluindo anfotericina B (AmpB), antimoniais (Glugantime e Pentostan), miltefosina (hexadecilfosfocolina) e pentamidina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019). Além do fato de que essas moléculas são prejudiciais para os pacientes, pouco se sabe sobre o impacto de tais medicamentos nas células do sistema imunológico humano (RODRIGUES et al., 2016).

Assim como a eficácia dos compostos em controlar a parasitemia é um ponto importante na escolha de novos tratamentos para as leishmanioses, a indução de uma resposta imunológica protetiva também é um ponto imprescindível na seleção de novas moléculas (CARIDHA et al., 2019). De acordo com a literatura, a resposta imunológica que o paciente com leishmaniose cutânea irá desenvolver, é fundamental para a evolução para cura espontânea ou progressão para as formas mais graves da doença (BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012).

Nos nossos achados, as moléculas 2J e 2M parecem não influenciar na expressão de linfócitos e monócitos, assim como na produção de citocinas. Contudo com relação aos antígenos, foi observado que eles foram capazes de estimular as células dos pacientes portadores da LTA, principalmente quando foram analisadas as produções de citocinas inflamatórias.

Estudo com camundongos Balb C, susceptíveis à infecção por *L. braziliensis*, e tratados com o composto sintético DPPE.1, observaram que o composto levou um aumento dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, quando comparados ao controle sem tratamento (DOS SANTOS et al., 2018). Em um outro estudo, Da Silva et al. (2020) também utilizando o DPPE1.1 em camundongos resistentes a infecção por *L. braziliensis*, os autores também observaram aumento de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, quando comparados com o grupo de animais não tratados.

Ambos os trabalhos citados anteriormente apresentam resultados discordantes dos nossos achados. No entanto, eles apresentaram apenas um controle com o animal não tratado, assim não está claro se o aumento foi devido ao tratamento ou em resposta a infecção por *L. braziliensis*. Além disso, os trabalhos citados também apresentam animais de linhagem isogênica, sem variação genética e é descrito na literatura que o background genético é

determinante para o tipo de resposta imune que o indivíduo irá produzir (SODERQUEST et al., 2017; GONÇALVES DE ALBUQUERQUE et al., 2019).

Estudo utilizando Anfotericina B, Metilfosina e Pentamina, em cultura de PBMC de humanos, observaram que todas elas inibiram a proliferação de células T CD4⁺ e TCD8⁺, nas doses que não estão relacionadas ao aumento da morte celular (ANDRÉ et al., 2020). De acordo com relatos da literatura o tratamento padrão da LTA leva uma diminuição na atividade linfoproliferativa (COUTINHO et al., 1998; TOLEDO et al., 2001). Estudo utilizando PBMC de pacientes, avaliando antes e após tratamento com antimoniais, observaram que os linfócitos T totais, assim como os Linfócitos TCD4⁺, expressando citocinas intracitoplasmáticas inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-2), apresentaram-se diminuídas após o tratamento com os antimoniais (LAKHAL-NAOUAR et al., 2015). De acordo com os trabalhos citados acima, as drogas preconizadas para o tratamento da LTA parecem desencadear alterações importantes quanto a proliferação e efetividade do linfócitos T. Os nossos resultados não corroboram com achados citados acima, onde observamos que as moléculas 2J e 2M não alteraram a resposta imune dos linfócitos T.

Através da análise da microscopia eletrônica de varredura, evidenciamos que os linfócitos não sofreram danos com a adição do tratamento com 2J, 2M e anfotericina B. Já na microscopia de transmissão foram observados que células tratadas com a anfotericina B apresentaram estruturas em processos de mielinização, que estão próximas ao núcleo e mitocôndrias, sendo caracterizadas por acúmulo de processos anormais no metabolismo celular, conferindo assim um dano à célula (KINT, 1970; FISHER et al., 2006; KUNIYOSHI et al., 2020).

A utilização da microscopia eletrônica na avaliação ultraestrutural de novas formulações para o tratamento das diversas parasitoses vem sendo explorada pela literatura, sobretudo estudos avaliando a ação de novos compostos sobre formas evolutivas da *Leishmania spp* (ALIANÇA et al., 2017; DA SILVA et al., 2019; QUEIROZ et al., 2020). No entanto, a ação de novas moléculas com perspectiva terapêutica para as leishmanioses, sobre as células do sistema imune humano, ainda não está bem elucidada.

Entretanto, a investigação de alterações em células humanas utilizando outros modelos patológicos, como o câncer, já são descritos na literatura (QADIR et al., 2008; WANG et al., 2007), onde linfócitos pacientes sadios apresentam núcleo ocupando maior parte da célula, com presença de eucromatina e heterocromatina, possui uma grande quantidade de mitocôndrias, ribossomos e microvilosidades na superfície celular. Já os linfócitos que sofreram tratamento com drogas antitumorais, possuem retração nuclear, presença de

numerosos vacúolos, apresentaram em sua superfície depressões e ausência de microvilosidades. (HOFFMANN et al., 1976; DE OLIVEIRA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2017).

Em contrapartida, os nossos achados foram discordantes dos relatados acima, pois as moléculas além de não alterar fenotipicamente os marcadores para linfócitos, observados por citometria de fluxo, na ultraestrutura, mantiveram a morfologia celular semelhantes aos dos controles sem adição dos tratamentos. Assim de acordo com nossos resultados, as moléculas parecem não alterar negativamente a resposta imune dos indivíduos, sendo considerada um ponto positivo como nova terapia para LTA.

Além da avaliação de células da imunidade adaptativa, o nosso estudo também analisou a expressão de monócitos, que são células apresentadoras de antígenos. Apesar de estar intimamente ligado ao estabelecimento da imunopatogênese da LTA, os monócitos não são comumente estudados na avaliação da resposta imune do hospedeiro humano na LTA, cuja investigação é baseada nas mudanças de expressão dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ ao papel protetor na LTA (LEON et al., 2007; NOVAIS et al., 2014).

Estudos que investigam a resposta dos monócitos na infecção por *Leishmania* spp., observaram um aumento de monócitos em pacientes com LTA, independente do curso da infecção (VIEIRA et al., 2013; PASSOS et al., 2015). Em vias gerais a migração dos monócitos não é associada com a gravidade da doença, já que não foi associado o aumento de monócitos e a progressão da doença. Contudo, monócitos produtores de TNF e expressando o receptor de quimiocina CCR2, foram associados ao maior grau de inflamação, sugerindo ter papel patológico na LTA (PASSOS et al., 2014). Os nossos dados mostraram que as moléculas 2J e 2M não afetaram a expressão de monócitos e não houve aumento de TNF, no sobrenadante de cultura, nas condições com tratamento. Assim, as moléculas não têm a capacidade de exacerbar a inflamação e consequentemente manter o equilíbrio entre as respostas inflamatórias e anti-inflamatória.

A capacidade dos monócitos de atuarem como células apresentadoras de antígenos efetivas é determinada pela expressão das moléculas HLA-DR (primeiro sinal de ativação para linfócitos T) e as co-estimulatórias CD80⁺ e CD86⁺, que atuam na ativação, proliferação, diferenciação e sobrevivência das células T e são auxiliares na geração das células T de memória (KIN; SANDERS, 2007; JAIN et al., 2011). Para o HLA-DR evidenciamos uma maior expressão no grupo de indivíduos controles negativos. O aumento neste grupo controle comparado com os pacientes, provavelmente ocorre pois os monócitos dos pacientes são frequentemente agredidos pela infecção parasitária, diferente do que ocorre com os indivíduos

negativos. Vieira e colaboradores (2013) observaram uma diminuição das moléculas CD80⁺ e CD86⁺, também expressas nos monócitos, quando comparado com o controle negativo, sugerindo que os monócitos desses pacientes, infectados a *L. braziliensis*, estariam com as suas funções comprometidas

A molécula CD86⁺ naturalmente é maior expressa em monócitos quando comparada a molécula CD80⁺ (VIEIRA et al., 2013). Nos nossos resultados foram observados que a CD86⁺ foi maior expressa no controle somente com células (sem estímulo e tratamento) e nas células dos indivíduos controles negativos. Sabe-se que a CD86⁺ apresenta uma maior predileção para se ligar à molécula CTLA-4 e a CD80⁺ em se ligar ao CD28⁺ (PENTCHEVA-HOANG et al., 2004). Em nossos achados não evidenciamos diferença estatística na expressão de CD80 e CD86 no grupo de pacientes, utilizando as moléculas avaliadas. Contudo, no grupo de controles negativos, foi observado um discreto aumento de CD86⁺, assim como o de CTLA-4, corroborando com a literatura, em que relata como principal ligante do CD86⁺, a molécula inibitória CTLA-4.

Os achados da imunofenotipagem foram concordantes com os encontrados na ultraestrutura, onde as moléculas não desencadearam processos de morte celular dos macrófagos, os danos observados foram referentes ao estresse metabólico, que normalmente é causado por uma intensa atividade celular, como a metabolização de drogas (KUNIYOSHI et al., 2020).

A fagocitose de microrganismos por células especializadas como macrófagos e neutrófilos é um processo crucial na resposta imune inata. A fagocitose também é fundamental processo de remoção de células em apoptose. A primeira fase do processo de eliminação é a internalização dos patógenos ou corpos apoptóticos em um vacúolo derivado da membrana plasmática, conhecido como fagossoma (MELO; DVORAK 2012). De acordo com os nossos resultados, os macrófagos tratados com 2J e 2M são capazes de desempenhar a sua função fagocítica, pois eles mantiveram a integridade das organelas, assim como formações de vacúolos no interior das células.

A resposta terapêutica em doenças infecciosas envolve tanto a resposta imune do próprio hospedeiro como os determinantes microbianos. Na infecção por *L. braziliensis* a resposta imune inflamatória é definitiva no resultado da infecção e a eficácia do tratamento, em que a imunomodulação é considerada uma estratégia terapêutica promissora (DIAZ et al., 2010; CARVALHO et al., 2012).

O desenvolvimento das lesões na LTA está intimamente ligado ao estabelecimento de uma resposta imunológica apropriada (BRELAZ et al., 2012). Para isso, os linfócitos T têm

um papel importante, agindo por meio de citotoxicidade direta (Linfócitos T CD8⁺) e / ou produzindo várias citocinas e quimiocinas. As citocinas podem reagir em cascatas com outras citocinas levando a um aumento ou diminuição na secreção de outras citocinas, agindo de forma bastante complexa. Portanto, a análise dos perfis de citocinas é de extrema importância para a compreensão da resposta e ativação do sistema imunológico dos pacientes com LTA (BRELAZ DE CASTRO et al., 2018).

Nossos achados deixam claro que há uma predominância do perfil TH1, pois nas células estimuladas com os antígenos, foram observadas aumento das citocinas IL-2, IL-6, INF- γ e TNF. De acordo com a literatura, a predominância do perfil TH1, com a presença da citocina IL-10 seria um ambiente imunológico favorável ao paciente com LTA (BARATAMANSINE et al., 2007; CASTELLANO et al., 2009). Guimarães et al. (2016), investigaram o perfil de citocinas de pacientes com LTA clássica e com a forma atípica (mais severa), estimulando PBMC com antígenos de *L. braziliensis*, observaram que os pacientes com a forma clássica apresentaram uma resposta TH1 e presença da IL-10. Já os pacientes com a forma atípica, apresentaram uma baixa resposta TH1, e altos níveis de IL-10 e IL-17.

Na investigação de candidatos a drogas antileishmania, um ponto comumente explorado pela literatura é a produção de citocinas, por estarem intimamente ligadas ao sucesso do tratamento (GATTO et al 2015). Um estudo investigando a eficácia da droga Clioquinol, que é um antiparasitário e antifúngico, em esplenócitos de camundongos estimulados com antígenos solúveis de *L. amazonensis*, observou que a droga induziu uma resposta predominantemente TH1 quando comparado ao controle com a anfotericina, em que produziu altos níveis de IL-4 e IL-10 (TAVARES et al., 2019). Nossos achados encontraram resultados com predomínio da resposta TH1 e presença da citocina IL-10, nas células de PBMC estimuladas com os antígenos de *L. braziliensis* e tratadas com as moléculas 2J ou 2M.

7 CONCLUSÕES

- Foi observado que as moléculas 2J e 2M e apresentam baixa toxicidade em células mononucleares humanas;
- As moléculas apresentam atividade leshmanicida sobre promastigotas de *L. braziliensis*;
- Os antígenos solúveis de *L. braziliensis* estão com a integridade preservada e têm a capacidade de estimular células de pacientes com LTA;
- Com relação a cinética de tempos *versus* resposta imunológica, nos 3 tempos testados (24h, 72h e 5dias), não houve diferença entre os tempos;
- A estimulação pelos antígenos solúveis de *L. braziliensis* levou um aumento das citocinas de perfil inflamatório;
- A 2J e 2M não causam diminuição da atividade dos linfócitos T, nem altera a funcionalidade dos monócitos, como foi demonstrado nos resultados dos marcadores imunológicos e nos achados das microscopias eletrônica de varredura e transmissão.
-
- Os derivados da classe Ftalil-Tiazóis 2J e 2M demonstraram resultados satisfatórios como candidatos a futuro fármaco para o tratamento da LTA.

REFERÊNCIAS

- AFONSO L., et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **J. Leukoc. Biol.**, v.84, p. 389–396, 2008.
- ALEXANDER J.; BROMBACHER, F. T helper1/t helper2 cells and resistance/susceptibility to leishmania infection: is this paradigm still relevant? **Front. immunol.**, v. 3, p. 80, 2012.
- ALIANÇA, ASS et al. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives **Eur J Pharm Sci.** v 15, p 1-10, 2017.
- AL-SALEM et al. Cutaneous leishmaniasis and conflict in Syria. **Emerg. Infect. Dis.**, v.22, p.931–933, 2016.
- ALVAR, J. et al. *Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence.* **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n.5, e35671, 2012
- AMATO, V. S. et. al. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. **Act. Trop.**v. 105, p. 1-9, 2008.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin. exp. dermatol.**, v. 35, p. 699-705, 2010.
- ANDRADE, M. S. et al. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropic.**, v. 38, p. 229-233, 2005.
- ÁVILA, Lucilla Ribeiro et al. Promastigote parasites cultured from the lesions of patients with mucosal leishmaniasis are more resistant to oxidative stress than promastigotes from a cutaneous lesion. **Free radic. biol. med.**, v. 129, p. 35-45, 2018.
- ANSARI AW, MEYER-OLSON D, SCHMIDT RE. Selective expansion of pro-inflammatory chemokine CCL2-loaded CD14+CD16+ monocytes subset in HIV-infected therapy naive individuals, **J Clin Immunol.**, v. 33, p.302-6, 2012.
- ARAÚJO, A. Risk factors associated with american cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. SP.**, v. 58, p. 86-92, 2016.
- BACELLAR, Olívia et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect. immun.**, v. 70, p. 6734-6740, 2002.
- BARATTA-MASINI, A et al. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. **Front Biosci.**, v. 12, p. 839-49, 2007.
- BARTON, G.M; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor signaling pathways. **Science**, v. 300: p. 1524–1525, 2003.

- BASANO S. A.; CAMARGO L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, p.328-37, 2004.
- BELGE et al. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺ monocytes are a major source of TNF. **J Immunol**, v. 168, p. 3536-42, 2002.
- BERMAN, J. D. et al. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. **Bull. W.H.O.**, v. 76, p. 25, 1998.
- BIRNBAUM, R.; CRAFT, N. Innate immunity and Leishmania vaccination strategies. **Dermatol. Clin.**, v.29, p.89-102, 2011
- BOSQUE, F. et al. Distinct innate and acquired immune responses to Leishmania in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. **Scand. J. Immunol.**, v.51, p.533–541, 2000.
- BOTTREL RL, et al. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokineproducing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble Leishmania antigen in human cutaneous leishmaniasis. **Infect Immun.**, v. 69, p. 3232–3239, 2001.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Ministério da Saúde**, p. 189, 2017.
- BRELAZ, M. C. et al. Leishmania (*Viannia*) braziliensis antigenic fractions: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasit. Immunol.**, Oxford, v.34., p. 236-239, 2012.
- BRITO, M. E. F. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.45, p.425-429, 2012.
- BRITO G, et al. Clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis patients treated with pentoxifylline. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 90, p.617–20, 2014.
- BRODSKYN, C. et al. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 159, p. 4467–4473, 1997.
- BRONTE, V.; MURRAY, P.J. Understanding local macrophage phenotypes in disease: Modulating macrophage function to treat cancer. **Nat. Med.**, v. 21, p. 117–119, 2015.
- BUXBAUM LU, SCOTT P. Interleukin 10- and Fcγ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. **Infect Immun.**, v.73, p. 2101–2108, 2005.
- CAMPBELL-LENDRUM D. et al. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v.96, p.159-62, 2001.

- CARDONA-ARIAS et al. Efficacy of Thermootherapy to Treat Cutaneous Leishmaniasis: A Meta-Analysis of Controlled Clinical Trials. **Plos one**, v.10, p. 1-15, 2015.
- CARDOSO, T. M. et al. Protective and pathological functions of CD8+ T cells in Leishmania braziliensis infection. **Infect. Immun.** v. 83, p. 898–906, 2015.
- CARIDHA, D. et al. Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 11, p. 106-117, 2019.
- CARRADA, G. et al. Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with Leishmania mexicana. **Parasite immunol.**, v. 29, p. 117-126, 2007.
- CARVALHO, LP.et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. **Parasite Immunol.**, v. 29, p.251–8, 2007.
- CARVALHO, L.P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Front immunol**, v.2, p.301, 2012.
- CASTELLUCCI, L. et al. IL6-174 G/Cpromoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **J Infect Dis.**, v.194, p.519–27, 2006.
- CASTELLANO, L. et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis, and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. **Hum. immunol.**, v. 70, p. 383-390, 2009.
- CHAMAKH-AYARI, R. et al. In Vitro Evaluation of a Soluble Leishmania Promastigote Surface Antigen as a Potential Vaccine Candidate against Human Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v.9, p.e92708, 2014.
- CHAVES LF, COHEN JM, PASCUAL M, WILSON ML. Social exclusion modifies climate, and de forestation impacts on a vector-borne disease. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.2, p.176, 2008.
- CHOI, B. S; KROPF P. Evaluation of T cell responses in healing and nonhealing leishmaniasis reveals differences in T helper cell polarization ex vivo and in vitro. **Parasit. Immunol.**, v. 31, p. 199-209, 2009.
- COUTINHO, S. G. et al. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. **Braz. j. med. biol. res.**, v. 31, p. 139-142, 1998.
- CROFT, S L.; SUNDAR, S; FAIRLAMB, A H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical microbiology reviews*, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.
- CROSBY, E.J. et al. Engagement of NKG2D on bystander memory CD8 T cells promotes increased immunopathology following Leishmania major infection. **PLoS Pathog.**, v.10, p.e1003970, 2014.

DA SILVA, P.R. et al. Novel indol-3-yl-thiosemicarbazone derivatives: Obtaining, evaluation of in vitro leishmanicidal activity and ultrastructural studies. **Chem. biol. interact.**, v. 315, p. 108899, 2019.

DESHAYES S. et al. Microwave activation in phase transfer catalysis. **Tetrahedron**. V.55, 1999.

DÍAZ, Y.R. et al. T-bet, GATA-3, and Foxp3 expression and Th1/Th2 cytokine production in the clinical outcome of human infection with *Leishmania* (*Viannia*) species. **The Journal of infectious diseases**, v. 202, p. 406-415, 2010.

ESPÍNDOLA, J. W.P. et al. Synthesis and structure–activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain. **Eur. j. med. chem.**, v. 101, p. 818-835, 2015.

FARIA, DR et al. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v.31, p.432–9, 2009.

FARIA, M. S. et al. Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters? **J. Parasitol. Res.**, v.12, p.930257, 2012.

FISCHER, E et al. Fabry disease: a morphologic study of 11 cases. **Mod. pathol.**, v. 19, p. 1295-1301, 2006.

FLANDIN J. F., et al. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v.36, p. 411–420, 2006.

FRANCA-COSTA, J. et al. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v.211, p. 426–435, 2015.

GATTO, M. et al. The involvement of TLR2 and TLR4 in cytokine and nitric oxide production in visceral leishmaniasis patients before and after treatment with anti-leishmanial drugs. **PloS one.**, v. 10, p. e0117977, 2015.

GIUDICE, Angela et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC infect. dis.**, v. 12, p. 1-9, 2012.

GOLLOB KJ et al. Immunoregulatory mechanisms and CD4–CD8– (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. **Int Immunopharmacol.**, v. 8, p.1338–43, 2008.

DE MORAES GOMES, P A T et al. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. **Eur. j. med. chem.**, v. 111, p. 46-57, 2016.

GONCALVES, R. et al. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania* major infection. **J. exp. med.**, v. 208, p. 1253-1265, 2011.

GONÇALVES DE ALBUQUERQUE, S.C. et al. The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of Leishmaniasis. **Front. Immunol.**, v. 8, p.1437, 2017.

GONÇALVES DE ALBUQUERQUE, S.C et al. Study of association of the rs2275913 IL-17A single nucleotide polymorphism and susceptibility to cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Cytokine**, v.123, p.154784, 2019.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana Revista da **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 71-80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.8, p. 419-433, 2010.

GUIMARAES, L. H. et al. Atypical manifestations of cutaneous leishmaniasis in a region endemic for *Leishmania braziliensis*: clinical, immunological and parasitological aspects. **Plos negl. trop. dis.**, v. 10, p. e0005100, 2016.

HASHIGUCHI et al. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: Clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. **Trop. Med. Health**, v. 2, p. 44 – 46, 2016.

HARMET, J. J. et al. Phenolic thiazoles as novel orally active neuroprotective agents. **Bioorg Med. Chem.**, v. 14, 2004.

HOUDE M et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. **Nat.**, v. 425, p.402–406, 2003.

HURRELL, B. et al. Rapid sequestration of *Leishmania mexicana* by neutrophils contributes to the development of chronic lesion. **PLoS Pathog.**, v.11, p. 1004929, 2015.

JAIN, S. et al. CD40 signaling synergizes with TLR-2 in the BCR independent activation of resting B cells. **PLoS ONE**, v. 6, p. e20651, 2011.

LEFRANC, F et al. 4-Bromo-2-(piperidin-1-yl) thiazol-5-yl-phenyl methanone (12b) inhibits Nap/K_p-ATPase and Ras oncogene activity in cancer cells. **Euro. J. Med.Chem.**. v. 63, p. 213-223, 2013.

LEON, B et al. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. **Immunity**, v. 26, p. 519-531, 2007.

LIMA, L. M. et al. Synthesis and anti inflammatory activity of phtalimide derivates, designed as new thalidomids analogues. **Bioorg Med Chem.** v. 10, p. 3067-3073, 2002.

LIMA, T. K. S. et al. CD4 (+) T cells defined by their V β T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. **Clin. exp. immunol.**, v. 165, p. 338–351, 2011.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **J. glob. Infect. Dis.**, Mumbai, v. 2, p. 177-185, 2010.

KEESEN, T et al. CD4(+) T cells defined by their Vbeta T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. **Clin Exp Immunol.** v.165, p 338–51, 2011.

KIMA, PE et al. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. **J Exp Med.**, v. 191, p. 1063–1068, 2000.

KIN NW, SANDERS VM. CD86 regulates IgG1 production via a CD19-dependent mechanism. **J Immunol.**; v. 179, p. 1516–23, 2007.

KINT, J. A. Fabry's disease: alpha-galactosidase deficiency. **Sci**, v. 167, n. 3922, p. 1268-1269, 1970.

KUNIYOSHI, K et al. Clinical course and electron microscopic findings in lymphocytes of patients with DRAM2-associated retinopathy. **Int. j. mol. sci.**, v. 21, p. 1331, 2020.

MACEDO, A. B. et al. Multifunctional CD4⁺ T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 167, p.505-513, 2012.

MACHADO et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: In situ and systemic immune response. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.105, p. 438–444, 2011.

MACHADO-COELHO, et al. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. **Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.** v.99, p.55–61, 2005.

MALAVIYA et al. Visceral leishmaniasis in Muzaffarpur district, Bihar, India from 1990 to 2008. **PLoS ONE** , v.6, p.14751, 2011.

MATHEOUD, Diana et al. *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. **Cell host microbe.**, v. 14, p. 15-25, 2013.

MELO, J. O. F. et al. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Quim. Nova**, v. 29, p. 569-579, 2006.

MOU et al. MHC class II restricted innate-like double negative T cells contribute to optimal primary and secondary immunity to *Leishmania major*. **PLoS Pathog**, v.10, p.104-109, 2014.

MOURA T.R., et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.**, v.73, p.5827–5834, 2005.

MULLER, A. J. et al. CD4⁺ T cells rely on a cytokine gradient to control intracellular pathogens beyond sites of antigen presentation. **Immunity**, v. 37, p. 147–157, 2012.

- MUNIZ, A.C. et al. Immunologic markers of protection in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection: A 5-Year cohort study. **J. Infect. Dis.**, v. 214, p. 570–576, 2016.
- NEVES, David Pereira. Parasitologia humana. In: **Parasitologia humana**. 2004. p. 428-428.
- NOVAIS, F et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. **J Infect Dis**, v. 209, p.1288-96, 2014.
- NOVAIS, F. et al. Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. **J. Invest. Dermatol.**, v.135, p. 94–101, 2015.
- NOVAIS, F O.; SCOTT, P. CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. **Springer Semin Immunopathol.**, p. 251-259, 2015.
- NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological Perspectives of Leishmaniasis? **J. glob. Infect. Dis**, Mumbai, v. 2, p. 135-146, 2010.
- OLIVEIRA, F., et al. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.**, v.85, p.70–73, 2011.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Control of the leishmaniases**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva, 2010.
- PACE, D. Leishmaniasis. **J Infect** v. 69, p. 10-18, 2014.
- PASSERO, L.F.D. et al. Histopathology, humoral and cellular immune response in the murine model of *Leishmania (Viannia) shawi*. **Parasitol. Int.**, v.59, p.159-165, 2010.
- PASSOS et al. Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in *Leishmania braziliensis* infections. **J. Infec. Dis.**, v.211, p. 274-282, 2014.
- PAVLI, A.; MALTEZOU, H.C. Leishmaniasis, an emerging infection intravelers. **Int. J. Infect. Dis.**, v.14, p.1032–1039, 2010
- PENTCHEVA-HOANG, T. et al. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. **Immunity.**, v. 21, p. 401-413, 2004.
- PETERS, N.C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Sci.**, v.321, p.970–974, 2008.
- PETRITUS, P.M., et al. *Leishmania mexicana* induces limited recruitment and activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells early during infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 6, p. 1858, 2012.
- PINHEIRO, R.O. Leishmaniose Tegumentar Americana:mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, v.16, p. 79-82, 2004.
- PISCOPO, T. V.; MALLIA, A. C. Leishmaniasis. **Post. Med. J. Londres**, v.82, p. 649-657, 2006.

- QADIR, M. A et al. Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. **Breast cancer res. treat.**, v. 112, p. 389-403, 2008.
- QUEIROZ, C.M. et al. Thiosemicarbazone and thiazole: in vitro evaluation of leishmanicidal and ultrastructural activity on *Leishmania infantum*. **Med. chem. res.**, v. 29, p. 2050-2065, 2020.
- RATH, S. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova**, v.26, p. 550-555, 2003.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous Leishmaniasis. **The Lanc. Infect. Dis.**, v. 7, p. 581-596, 2007.
- REIS, L. C.; BRITO, M. E. F.; SOUZA, M. A.; PEREIRA, V. R. G. Mecanismos imunológicos na resposta imune celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Rev. P. Trop.**, v.35, p.103-115, 2006.
- ROBLEDO, Sara M. et al. Cutaneous leishmaniasis in the dorsal skin of hamsters: a useful model for the screening of antileishmanial drugs. **J. vis. exp.**, n. 62, 2012.
- ROBERTS, M. T. M. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **Br. med. bull.**, v. 75, p. 115-130, 2005.
- RODRIGUES, V et al. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasit. vectors.**, v. 9, p. 1-13, 2016.
- SANTIAGO, E. F. et al. Evaluation of the anti-*Schistosoma mansoni* activity of thiosemicarbazones and thiazoles. **Antimicrob. agents chemother.**, v. 58, p. 352-363, 2014.
- SANTOS, S. et al. CD8+ granzyme B+-mediated tissue injury versus CD4+IFN γ + mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **J. Invest. Dermatol.**, v.133, p.1533-1540, 2013.
- SATO et al. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for Langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania* major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, B cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 205–218 , 2000.
- SCHNORR, D. et al. IFN- γ Production to *Leishmania* Antigen Supplements the *Leishmania* Skin Test in Identifying Exposure to *L. braziliensis* Infection. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 6, p. 1947, 2012.
- SCHRIEFER, A.; WILSON, M.E.; CARVALHO, E.M. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.21, p.483–488, 2008.

SCHWARTZ, E.; HATZ, C.; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. **Lancet Infect. Dis.** v. 6, p.342–349, 2006.

SCORZA et al. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **Int. j. mol. sci.**, v. 18, p. 1296, 2017.

SCOTT, P.; NOVAIS, F.O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat. rev. immunol.**, v. 16, p. 581-592, 2016.

SHARMA, U. et al. Recent advances in the chemistry of phthalimide analogues and their therapeutic potential. **Mini-reviews in medicinal chemistry**, v. 10, p. 678-704, 2010.

SOARES et. al. CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. **J Leukoc Biol**, v. 79 p. 36-9, 2006.

SODERQUEST, K. et al. Genetic variants alter T-bet binding and gene expression in mucosal inflammatory disease, **PLoS Genet.** v. 13, n. 2, p. e1006587, 2017.

SOONG, L. Modulation of dendritic cell function by Leishmania parasites. **J. Immunol.**, v.180, p. 4355–4360, 2008.

SRIVASTAVA, A. et al. Identification of TLR inducing Th1-responsive Leishmania donovani amastigote-specific antigens. **Molec. Cell. Biochem.**, v.359, p.359-368, 2012.

THALHOFER, C.J. et al. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan Leishmania infantum chagasi. **Infect. Immun.**, v.79, p.108–117, 2011.

TEO, S. K. Properties of thalidomide and its analogues: Implications for anticancer therapy. **AAPS J.**, v. 7, p. 14-19, 2005.

TIUMAN T.S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **Int. J. Infect. Dis.**, v.15, p. 525-32, 2011.

TOLEDO, V.C.P de et al. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 96, p. 89-98, 2001.

TURAN-ZITOUNI, Gülhan et al. Synthesis and evaluation of bis-thiazole derivatives as new anticancer agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 107, p. 288-294, 2016.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, p. 97-101, 2003.

VIANA, A. G, et al. Infection of human monocytes with leishmania infantum strains induces a downmodulated response when compared with infection with Leishmania braziliensis. **Front. Immunol.**, v. 8, p. 1896, 2017.

VICINI, P. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Benzo[d]isothiazole, Benzothiazole and Thiazole Schiff Bases. **Med. Chem.** V. 11, 2003.

VIEIRA, É. LM et al. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. **Parasite immunol.**, v. 35, n. 2, p. 65-72, 2013.

WANG, L.; YU et al. 166, a novel transmembrane protein, regulates cell autophagy and apoptosis. **Apoptosis.**, v. 12, p. 1489-1502, 2007.

WHO. 2019. Leishmaniasis. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

APENDICE A- Termo de consentimento livre e esclarecido do portador da LTA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Termo de consentimento livre e esclarecido do Portador da LTA

Convido o (a) Prezado (a) Senhor (a)

_____ para participar, como voluntário (a), da pesquisa (Caracterização da Leishmaniose Tegumentar Americana nas áreas endêmicas do município de Timbaúba/PE: aspectos clínicos, epidemiológicos, imunológicos, tratamento celular in vitro com novas drogas e dinâmica dos flebotomíneos).

Esta pesquisa é sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana, também conhecida por "espúndia", "úlceras de bauru" e "ferida brava", sob a coordenação Profs. Dr Luiz Carlos Alves e Dr. Fabio André Brayner dos Santos, ambos do Departamento de Parasitologia FIOCRUZ - PE. Os objetivos do estudo são identificar fatores relacionados a Leishmaniose, diagnosticar os casos suspeitos neste município e testar novas drogas candidatas a trata esta doença. A finalidade deste trabalho é contribuir para a prevenção/tratamento da doença e para ter certeza da causa (diagnóstico) da ferida de pele que o (a) senhor(a) apresenta.

Solicitamos a sua colaboração para responder um questionário que identificará algumas características suas e de sua residência, bem como, a coleta de até 6 (seis) colheres de chá de sangue (30 ml) através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. As amostras serão levadas ao laboratório para serem analisadas, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica (se for o caso). Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos que essa pesquisa possui riscos, durante a coleta de sangue, de gerar o incômodo de pequena dor e/ou hematoma (mancha roxa) no local da coleta do sangue. Outro risco poderá ser o constrangimento de responder um questionário socioeconômico, que terá perguntas sobre comportamento, situação social e econômica. Como benefício para o Senhor (a) haverá o diagnóstico (identificação) da leishmaniose se estiver doente, um maior conhecimento sobre a leishmaniose e formas de como se prevenir da doença, além de o Município de Timbaúba ter informações que poderão ser utilizadas para melhoramento das condições que causam a leishmaniose.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o (a) senhor (a) não é obrigado (a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador (a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição (se for o caso) e no serviço de saúde do município.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Campus da UFPE, Av. Moraes Rego, s/n, pelo telefone (81) 2101-



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

2693, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/CPqAM/FIOCRUZ, telefone (81) 2101-2639.

Consentimento Pós-Infomação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser.

Eu autorizo a utilização dessas amostras estocadas:

- () com a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE;
() dispenso a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE.

Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ___/___/___

Assinatura do participante

ou

Impressão do dedo polegar



Pesquisador Responsável
Luiz Carlos Alves/ CPqAM/Fiocruz

ou

Pesquisador Responsável
Fábio André Brayner/ CPqAM/Fiocruz



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o (a) senhor (a) não é obrigado (a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador (a) e também poderá retirar-se do estudo em qualquer etapa da pesquisa.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Campus da UFPE, Av. Moraes Rego, s/n, pelo telefone (81) 2101-2693, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/CPqAM/FIOCRUZ, telefone (81) 2101-2639.

Consentimento Pós-Infomação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser.

Eu autorizo a utilização dessas amostras estocadas:

- () com a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE;
() dispense a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE.

Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ___/___/___

Assinatura do participante

ou


Impressão do dedo polegar

Pesquisador Responsável
Luiz Carlos Alves/ CPqAM/Fiocruz

ou

Pesquisador Responsável
Fábio André Brayner/ CPqAM/Fiocruz

ANEXO A- Aprovação no Comitê de Ética de Pesquisa em humanos (CEP)



Título do Projeto: "Caracterização da Leishmaniose Tegumentar Americana nas áreas endêmicas do município de Timbaúba/PE: aspectos clínicos, epidemiológicos, imunológicos, tratamento celular in vitro com novas drogas e dinâmica dos flebotomíneos".

Pesquisador responsável: Luiz Carlos Alves

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 24/08/2016

Registro no CAAE: 59093316.0.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 1.908.594

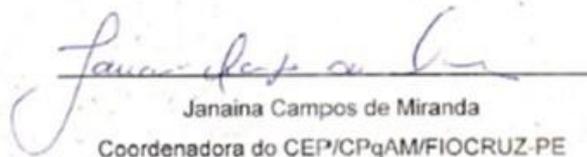
PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

O CEP/CPqAM reforça a necessidade de entrega de relatórios parcial e final, em cumprimento a resolução 466/12, capítulo XI, artigo 2d.

Recife, 06 de fevereiro de 2017.


Janaina Campos de Miranda
Coordenadora do CEP/CPqAM/FIOCRUZ-PE

Campos via LIPPY - Av. Moraes Rego, 611
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2609
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2630
Recife - PE - Brasil
comiteoetico@cpqam.fiocruz.br

Janaina Campos de Miranda
Pesquisadora em Saúde Pública
Coordenadora
Mat. SIAPE 454177
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

