

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto René Rachou

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Efeito do tratamento *in vitro* com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre macrófagos infectados com espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar

por

PRISCILA DE CÁSSIA DA SILVA

Belo Horizonte

Maio/2021

DISSERTAÇÃO M/CS – IRR

P. C. SILVA

2021

PRISCILA DE CÁSSIA DA SILVA

Efeito do tratamento *in vitro* com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre macrófagos infectados com espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Dra. Érica Alessandra Rocha Alves

Coorientação: Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva

Dr. Rodrigo Correa de Oliveira

Belo Horizonte

2021

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

S381e
2021

Silva, Priscila de Cássia da.

Efeito do tratamento *in vitro* com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre macrófagos infectados com espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar/Priscila de Cássia da Silva -Belo Horizonte, 2021

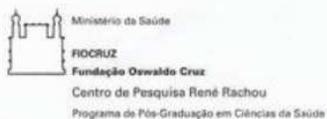
XVII, 93 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 84 - 93

Dissertação – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós – Graduação do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

1. Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro 2. Leishmania/efeito de fármacos 3. Ativação de Macrófagos/imunologia I. Título. II. Alves, Érica Alessandra Rocha (Orientação). III. Silva, Carlos Eduardo Calzavara e Oliveira, Rodrigo Corrêa (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.93



Ata da ducentésima sexagésima segunda defesa de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Priscila de Cássia da Silva orientada pela Dra. Érica Alessandra Rocha Alves e coorientada pelo Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva e pelo Dr. Rodrigo Corrêa de Oliveira.

Aos vinte e quatro dias do mês de maio do ano de dois mil e vinte e um, às quatorze horas, realizou-se por web conferência o exame da ducentésima sexagésima segunda defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou/FIOCRUZ MINAS, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática. A dissertação da aluna **Priscila de Cássia da Silva** intitula-se "**Efeito do tratamento *in vitro* com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre macrófagos infectados com espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose tegumentar**". A banca examinadora foi constituída pelos professores Dra. Érica Alessandra Rocha Alves - IRR - FIOCRUZ MINAS (Orientadora/Presidente), Dr. Edward José de Oliveira - IRR - FIOCRUZ MINAS (Titular) e Dra. Jane Lima dos Santos UESC (Titular). Após exposição, a candidata foi arguida oralmente pelos membros da banca tendo como resultado:

APROVADA

APROVADO CONDICIONALMENTE: Quando o trabalho final necessitar de elaboração adicional ou revisões parciais.

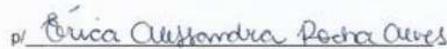
NÃO APROVADA

Uma vez encerrado o exame, eu, Dra. Érica Alessandra Rocha Alves, presidente da banca, assino a presente ata e atesto a participação remota dos membros da Banca Examinadora.

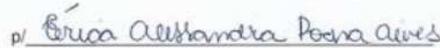
Belo Horizonte, 24 de maio de 2021.



Dra. Érica Alessandra Rocha Alves – IRR/FIOCRUZ MINAS (Orientadora/Presidente)

p/ 

Dr. Edward José de Oliveira – IRR/ FIOCRUZ MINAS (Titular)

p/ 

Dra. Jane Lima dos Santos - UESC (Titular)

Dedico este trabalho a Deus fonte inesgotável de inspiração; e a minha família, obrigada a tudo que vocês fazem por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado, com cuidado bondade e sabedoria me dando forças para enfrentar os desafios.

A minha família, em especial a minha mãe Ana Reis, meu exemplo de força, persistência e vitória, ao meu pai Jurandir Edson pelas orações e apoio mesmo estando longe, ao meu cunhado Luiz Augusto pelo incentivo e carinho. A minha irmã Poliana que me apresentou a Biomedicina e desde então me incentiva a acreditar que tudo é possível e que eu posso realizar coisas incríveis. A minha sobrinha e afilhada Isabela, obrigada por encher o meu coração de vida, eu amo você.

As minhas amigas de vida, que permaneceram ao meu lado durante essa caminhada em especial a Renata e Suelaine, vocês são incríveis. Aos novos amigos da pós-graduação em especial a Silvana, obrigada por deixar essa caminhada mais leve.

A minha orientadora, Dra. Érica Alessandra Rocha Alves, obrigada pela excelente orientação, pelos diversos ensinamentos, dedicação, comprometimento, além de apoio e contribuições na bancada. Agradeço também por toda palavra de incentivo e motivação, conviver com você me enriqueceu não só profissionalmente, mas também pessoalmente.

Aos meus coorientadores Dr. Rodrigo Correa e Dr. Carlos Eduardo Calzavara, obrigada pela contribuição para tornar esse trabalho possível.

A toda equipe do grupo de Imunologia Celular e Molecular obrigada pela receptividade, convivência e ensinamentos compartilhados.

Ao Dr. Celso Melo e a equipe do laboratório de Polímeros não Convencionais LPNC, do Departamento de Física, da Universidade Federal de Pernambuco por ter produzido as nanopartículas utilizadas nesse projeto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – pelo financiamento parcial do projeto (Código de Financiamento 001). Agradeço ainda à Fundação Oswaldo Cruz, ao Instituto René Rachou, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela infraestrutura e suporte material para a realização desse projeto, e aos professores pelos conhecimentos compartilhados. Agradeço também ao programa de Desenvolvimento Tecnológico da Rede de Plataformas da FIOCRUZ pelo uso da plataforma de citometria de fluxo.

RESUMO

Durante o tratamento anti-*Leishmania* pode ser observado resistência dos parasitos ao medicamento, além de sinais severos de toxicidade. Portanto, novas alternativas terapêuticas com baixa toxicidade e alta eficácia para o tratamento das leishmanioses são necessárias. Foi demonstrado que nanopartículas de óxido de ferro exercem ação anti-*Leishmania* por aumentarem a permeabilidade da membrana dos parasitos, bem como por meio da indução da produção de óxido nítrico pelos macrófagos infectados. Assim, foi hipotetizado que nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina, um nanocompósito de óxido de ferro, poderiam exercer ação antiparasitária, contribuindo para o controle da doença. Para investigar tal hipótese, foi avaliado o efeito de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre macrófagos infectados *in vitro* com espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar. Inicialmente, células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos pela adição de 12-miristato 7-phorbol acetato (PMA) ao meio de cultura. Em seguida, as células foram infectadas com *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* e tratadas com 0,06 mg/mL de nanopartículas de óxido de ferro por 24 e 72 horas. Após o tratamento, os sobrenadantes da cultura foram coletados e as células foram coradas com Instant-Prov. Em seguida, as células THP-1 foram avaliadas por microscopia óptica para analisar o índice de infecção, bem como o número de células aderentes e a porcentagem de células interagindo com as nanopartículas. Nos sobrenadantes da cultura, foram mensurados os níveis de óxido nítrico (NO) e de citocinas. Os níveis de NO foram determinados pelo método de Griess. Os níveis de citocinas foram avaliados por citometria de fluxo. Além disso, a viabilidade dos parasitos foi determinada pela contagem do número de promastigotas que proliferaram de amastigotas intracelulares. Os dados mostraram que o tratamento com as nanopartículas não alterou o índice de infecção dos macrófagos, bem como não modificou a viabilidade dos parasitos intracelulares. Essa ausência de efeito antiparasitário foi seguida de uma reduzida capacidade de as nanopartículas interagirem/penetrarem nas células parasitadas, tendo ocorrido um menor percentual de células em contato com as nanopartículas na presença da infecção. Contudo, as nanopartículas foram capazes de induzir a produção de NO, bem como das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10. Porém, os níveis produzidos foram insuficientes para alterar a carga parasitária, bem como a viabilidade dos parasitos intracelulares. Embora a ineficiência do tratamento em reduzir a carga parasitária possa ter sido ocasionada pela incapacidade de as nanopartículas induzirem potentes mecanismos microbicidas nos macrófagos, a impossibilidade de interagirem ou ingressarem nas células parasitadas pode ter sido a principal causa da ausência de ação

antiparasitária por parte de tais nanocompósitos. Embora o estudo aqui apresentado não tenha demonstrado ação antiparasitária por parte das nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina, foi possível avançar no conhecimento da interação entre nanopartículas de óxido de ferro no contexto da infecção pelas leishmanias e ainda pensar novas possibilidades de estudos *in vitro* e *in vivo* empregando tais nanopartículas no contexto das leishmanioses.

Palavras-chave: óxido de ferro, nanopartículas, *Leishmania*, macrófagos, citocinas, óxido nítrico, viabilidade.

ABSTRACT

During anti-*Leishmania* treatment, parasite resistance to the drug can be observed, in addition to severe signs of toxicity. Therefore, new therapeutic alternatives with low toxicity and high efficacy against *Leishmania* parasites are necessary. It has been shown that iron oxide nanoparticles have a direct anti-*Leishmania* action by increasing the parasite membrane permeability, as well as indirectly by inducing the production of nitric oxide (NO) by the infected cells. Thus, it was hypothesized that polyaniline-encapsulated maghemite nanoparticles, a nanocomposite of iron oxide, could exert antiparasitic action, contributing to the control of *Leishmania* infection. To investigate this hypothesis, the effect of polyaniline-encapsulated maghemite nanoparticles on macrophages infected *in vitro* with causative agents of tegumentary leishmaniasis was evaluated. Initially, THP-1 cells were differentiated into macrophages by the addition of 12-myristate 7-phorbol acetate (PMA) to the culture medium. Then, cells were infected with *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* and treated with 0.06 mg/mL of polyaniline-encapsulated maghemite nanoparticles for 24 and 72 hours. After treatment, culture supernatants were collected, and cells were stained with Instant-Prov. Then, THP-1 cells were evaluated by optical microscopy to analyze the infection index, as well as the number of adherent cells and the percentage of cells interacting with nanoparticles. In culture supernatants, NO and cytokine levels were measured. NO levels were determined using Griess method. Cytokine levels were assessed by flow cytometry. In addition, parasite viability was determined by counting the number of promastigotes that proliferated from intracellular amastigotes. The data showed that the treatment with polyaniline-encapsulated maghemite nanoparticles did not change the infection index, as well as the viability of the intracellular parasites. This absence of antiparasitic effect was followed by a reduced capacity for nanoparticles to interact or penetrate in parasitized cells. However, nanoparticles were able to hyper modulate the production of NO, as well as the cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-10. However, the levels produced were insufficient to alter the parasitic load, as well as the viability of the intracellular parasites. Although the inefficiency of the treatment in reducing the parasitic load may have been caused by the inability of the nanoparticles to induce potent microbicidal mechanisms in the infected macrophages, the impossibility of entering the intracellular microenvironment may have been the main cause of the absence of antiparasitic action by such nanocomposites. Although the study presented here has not demonstrated antiparasitic action on the part of polyaniline-encapsulated maghemite nanoparticles, it allowed us to advance in the knowledge of the interaction between iron oxide

nanoparticles during *Leishmania* infection and still think about new possibilities for *in vitro* and *in vivo* studies employing such nanoparticles in the context of leishmaniasis.

Keywords: iron oxide, nanoparticles, Leishmania, macrophages, cytokines, nitric oxide, viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	19
Figura 2: Número de casos de leishmaniose tegumentar no mundo.....	21
Figura 3: Casos de leishmaniose tegumentar por UF, de acordo com o Ministério da Saúde do Brasil.....	22
Figura 4: Recrutamento de células do sistema imune inato na infecção por <i>Leishmania</i> ..	25
Figura 5: Polarização de macrófagos no contexto das leishmanioses.....	29
Figura 6: Vias imunológicas na leishmaniose tegumentar.....	31
Figura 7: Delineamento experimental do estudo.....	44
Figura 8: Curvas de crescimento de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	46
Figura 9: Influência da proporção célula/parasitos sobre o índice de infecção em células THP-1.....	50
Figura 10: Índice de infecção em células THP-1 infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (V.) guyanensis</i> após incubação <i>in vitro</i> com 0,06 mg/mL de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina.....	56
Figura 11: Produção de óxido nítrico por células THP-1 infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (V.) guyanensis</i> após tratamento <i>in vitro</i> com 0,06 mg/mL de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina.....	58
Figura 12: Produção de citocinas por células THP-1 infectadas com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> após tratamento <i>in vitro</i> com 0,06 mg/mL de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina.....	60
Figura 13: Produção de citocinas por células THP-1 infectadas com <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> após incubação <i>in vitro</i> com 0,06 mg/mL de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina.....	62
Figura 14: Produção de citocinas por células THP-1 infectadas com <i>Leishmania (V.) guyanensis</i> após incubação <i>in vitro</i> com 0,06 mg/mL de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina.....	64
Figura 15: Quantidade de células THP-1 aderidas às lamínulas após infecção com <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> e <i>L. (V.) guyanensis</i> e tratamento <i>in vitro</i> com 0,06 mg/mL de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina.....	67
Figura 16: Viabilidade de parasitos intracelulares após o tratamento <i>in vitro</i> de células THP-1 infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (V.) guyanensis</i> com 0,06 mg/mL de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina.....	68
Figura 17: Percentual de células THP-1 contendo nanopartículas interiorizadas e/ou aderidas.....	70

Figura 18: Percentual de células THP-1 infectadas ou não apresentando nanopartículas interiorizadas e/ou aderidas.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Influência do tratamento <i>in vitro</i> com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-12p70 e IL-10 por células THP-1 infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (V.) guyanensis</i>	65
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag - Prata

AgNp-bio - Nanopartículas biogênicas de prata

AgNPs - Nanopartículas de prata

AgNPs-TA - Nanopartículas de prata e ácido tânico

AMP - Peptídeos antimicrobianos

APCs - Células apresentadoras de antígeno

AuNPs - Nanopartículas de ouro

B.O.D - Demanda Bioquímica de Oxigênio

CeO₂ - Óxido de cério

CO₂ - dióxido de carbono

CR1- Receptor para complemento do tipo 1

CR3 - Receptor para complemento do tipo 3

CD14⁺⁺ - *do inglês* Cluster of differentiation 14

CD16⁺ - *do inglês* Cluster of differentiation 16

CD80 - *do inglês* Cluster of differentiation 80

CD86 - *do inglês* Cluster of differentiation 86

DAMPs- Padrões moleculares associados à danos

DCs - Células dendríticas

DMEM – *do inglês Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

Fe₃O₄ - Magnetita

γ-Fe₂O₃ - Maghemita

α-Fe₂O₃ - Hematita

FcγRs - Receptores para porção Fc de IgG

FnRs - Receptores de fibronectina

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GSPL - Glicosíngofosfolípideo

H₃PO₄ - Ácido fosfórico

IFN- γ - Interferon- γ

IL-1 β - Interleucina-1 beta

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-12p70 - Interleucina 12p70

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

iNOS - Sintase do óxido nítrico induzível

LCD - Leishmaniose cutânea difusa

LCL - Leishmaniose cutânea localizada

LMC - Leishmaniose mucocutânea

LPG - Lipofosfoglicano

LT- Leishmaniose tegumentar

LV- Leishmaniose visceral

MA - Antimoniato de meglumina

MCP-1 - *do inglês* monocyte chemoattractant protein-1

MgO - Óxido de magnésio

MHC I - Complexo principal de histocompatibilidade do tipo I

MHCII - Complexo principal de histocompatibilidade do tipo II

MONPCG - Óxido de magnésio coberto com glicose

MyD88 - Fator de diferenciação mielóide 88

NaNO₂ - Nitrito de sódio

NF- κ B - Fator nuclear kappa B

NK- Células natural killers

Nrf2 - Fator nuclear derivado do eritróide 2

NOX2 - NADPH oxidase 2

NO - Óxido nítrico

NO₂⁻ - Nitrito

NPs - Nanopartículas
 O_2^- - Ânion superóxido
PAMPs - Padrões moleculares de patógenos
PBS - Salina tamponada com fosfato
PMA - 12-miristato 7-acetato de forbol
p38 - Via de sinalização p38
P8GLC - Proteoglicolipideo
PO - Piroctana olamina
RM - Receptor de manose
RNS - Espécies reativas de nitrogênio
ROS - Espécies reativas de oxigênio
R-SNO - Nitrosotióis
 $Sb5^+$ - Antimoniais pentavalentes
SbL8 - n-octanoil-N-metil-glucamida
SDF1 - *do inglês* stromal cell-derived factor 1
SFB - Soro fetal bovino
-SH- Resíduos de tiol
 SiO_2 - Dióxido de silício
SODs - Superóxido dismutases
SPIONs - Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas
SSG - Estibogluconato de sódio
STAT - Transdutor de sinal e ativador da transcrição
SUS - Sistema Único de Saúde
 TaO_x - Óxido de tântalo
 $TCD4^+$ - Linfócitos T auxiliares
 $TCD8^+$ - Linfócitos T citotóxicos
 $TGF\beta$ - Fator de transformação do crescimento β
 TiO_2 - Dióxido de titânio
Th1 - Células T auxiliares do tipo 1

Th2 - Células T auxiliares do tipo 2

Th17 - Células T auxiliares do tipo 17

THP-1 - Célula monocítica humana

TLRs - Receptores tipo Toll

TLR2 - Receptor tipo Toll 2

TLR3 - Receptor tipo Toll 3

TLR4 - Receptor tipo Toll 4

TLR5 - Receptor tipo Toll 5

TLR6 - Receptor tipo Toll 6

TLR9/21 - Receptor tipo Toll 9/21

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Treg - Linfócitos T reguladores

WHO - *do inglês* World Health Organization

ZnO - Óxido de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 As leishmanioses	18
1.2 A leishmaniose tegumentar no Brasil e no mundo	20
1.3 Características clínicas da leishmaniose tegumentar	22
1.4 Papel da resposta imunitária inata na leishmaniose tegumentar	24
1.5 Papel da resposta imunitária adaptativa na leishmaniose tegumentar	29
1.6 Tratamento convencional da leishmaniose tegumentar	34
1.7 Nanopartículas como alternativa para o tratamento da leishmaniose tegumentar	37
1.8 As nanopartículas de óxido de ferro no contexto da leishmaniose tegumentar	40
2. OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo geral	42
2.2 Objetivos específicos	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Delineamento experimental	43
3.2 Nanopartículas	45
3.3 Parasitos	45
3.4 Descongelamento dos parasitos	45
3.5 Curva de crescimento das formas promastigotas	46
3.6 Obtenção e criopreservação das células THP-1	47
3.7 Cultivo e manutenção das células THP-1	48
3.8 Avaliação da influência da proporção célula/parasitos sobre o índice de infecção	49
3.9 Determinação do índice de infecção	50
3.11 Dosagem dos níveis de citocinas	52
3.12 Análise do número de células aderidas às lamínulas	52
3.13 Análise da viabilidade dos parasitos intracelulares	53
3.14 Avaliação do percentual de células THP-1 com nanopartículas interiorizadas/aderidas	53
3.15 Análise estatística	54
4. RESULTADOS	54

4.1	Influência do tratamento <i>in vitro</i> com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre o índice de infecção em células THP-1 infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (V.) guyanensis</i>	54
4.2	Influência do tratamento <i>in vitro</i> com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre a produção de óxido nítrico por células THP-1 infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (V.) guyanensis</i>	56
4.3	Influência do tratamento <i>in vitro</i> com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre a produção de citocinas por células THP-1 infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (V.) guyanensis</i>	59
4.4	Influência do tratamento <i>in vitro</i> de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre a aderência de macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> e <i>L. (V.) guyanensis</i>	66
4.5	Análise da viabilidade de parasitos intracelulares após o tratamento <i>in vitro</i> de células THP-1 infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (V.) guyanensis</i> com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina	68
4.6	Influência da infecção pelas leishmanias sobre o percentual de células THP-1 contendo nanopartículas interiorizadas/aderidas.....	69
5.	DISCUSSÃO	73
6.	CONCLUSÃO.....	83
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

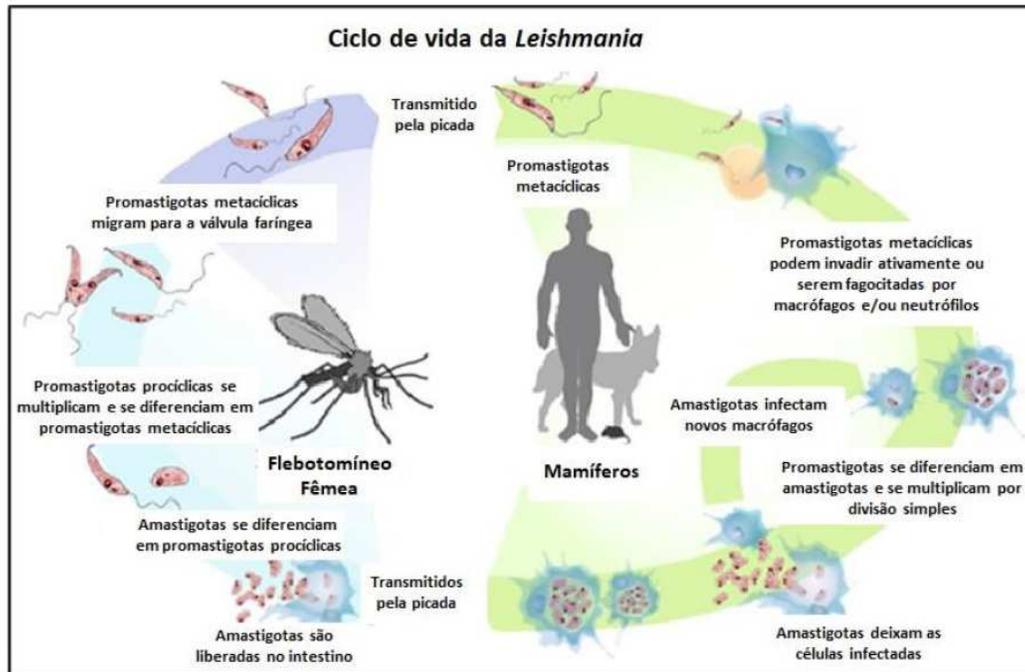
1. INTRODUÇÃO

1.1 As leishmanioses

As leishmanioses são doenças antroponóticas e zoonóticas causadas por aproximadamente 20 espécies de protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* (HERWALDT, 1999; GABRIEL et al., 2019). Tais doenças estão amplamente distribuídas em áreas tropicais e subtropicais do mundo e são endêmicas em 98 países da Europa, África, Ásia e América (TORRES-GUERRERO et al., 2007; GABRIEL et al., 2019). No entanto, mais de 90% dos novos casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Índia, Irã, Peru, Sudão do Sul, Sudão e Síria (STEVERTING, 2017). A Organização Mundial da Saúde (WHO) estima que 700.000 a 1.000.000 de novos casos ocorram anualmente (WHO, 2020).

As fontes de transmissão de leishmanias são diversas, tendo em vista a grande variedade de hospedeiros, bem como de reservatórios mamíferos domésticos e selvagens. Entretanto, dependendo da espécie de parasito e vetor e da região geográfica, as principais fontes de transmissão são os caninos, roedores ou humanos (GUREL et al., 2020; LORÍA-CEVERA et al., 2020). As leishmanias apresentam dois estágios morfológicos principais durante seu ciclo de vida (Figura 1). Em um dos estágios os parasitos se apresentam como promastigotas, que são móveis, extracelulares e encontradas no hospedeiro invertebrado. Em outro estágio, se apresentam como amastigotas, que são imóveis e encontradas no interior de células de hospedeiros vertebrados (KAMHAWI et al., 2016; SUNTER et al., 2017). As promastigotas são flageladas e se multiplicam no intestino de flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia*, no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e são transmitidas aos hospedeiros vertebrados pela picada de fêmeas infectadas durante o repasto sanguíneo. Uma vez no hospedeiro vertebrado, as promastigotas são interiorizadas por células do sistema monocítico/macrofágico e alojadas em vacúolos parasitóforos (fagossomas), que posteriormente se fundem com lisossomas para formar fagolisossomas contendo parasitos. Neste microambiente, as promastigotas se transformam em amastigotas intracelulares de formato arredondado, perdem o flagelo e se tornam imóveis (DOS SANTOS et al., 2019; GOSSAGE et al., 2003; MCGWIRE et al., 2013). Dentro dos fagolisossomas, as amastigotas se multiplicam por divisão simples, até que rompem as células hospedeiras e infectem novas células. Após a infecção e a multiplicação inicial dos parasitos, as características das leishmanias e do hospedeiro determinam a sintomatologia e a extensão da doença (GUREL et al., 2020).

Figura 1- Ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania*, agentes causadores das leishmanioses.



Fonte: Adaptado de ANVERSA et al., 2018

As manifestações clínicas das leishmanioses são diversas e multifatoriais, dependendo de interações complexas entre a espécie infectante, o estado imunológico do hospedeiro e de outros fatores relacionados ao vetor e ao ambiente (ALVARENGA et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2019). É importante ressaltar que a biologia do vetor e a espécie de *Leishmania*, influenciam no desfecho da doença, sendo que uma única espécie de *Leishmania* pode produzir mais de uma síndrome clínica e cada síndrome pode ser causada por múltiplas espécies de *Leishmania* (DOS SANTOS et al., 2019). Tradicionalmente, as leishmanioses são classificadas de acordo com a apresentação clínica: a) leishmaniose visceral, e b) leishmaniose tegumentar (WHO, 2020).

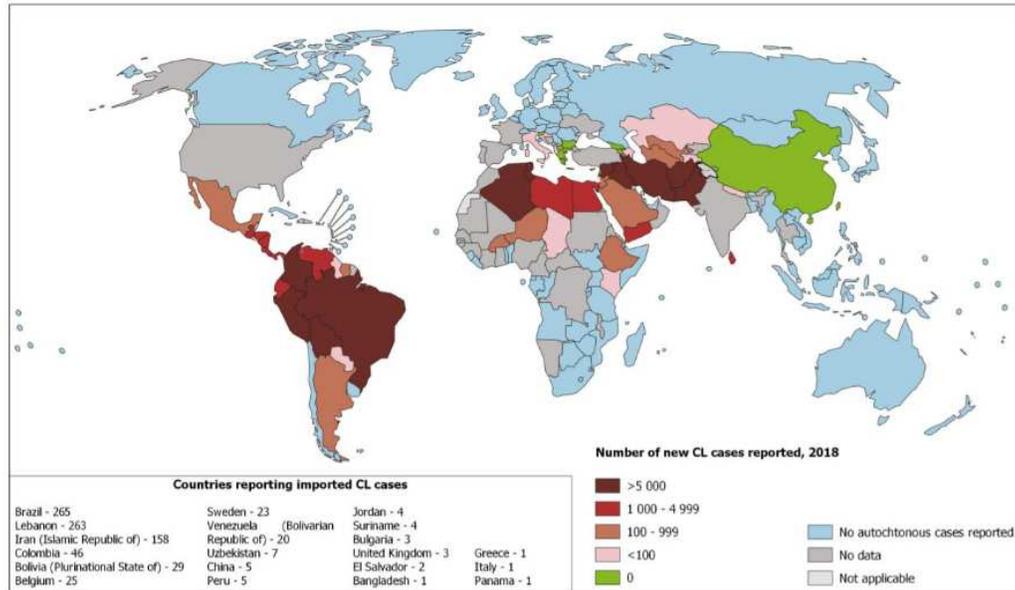
A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Calazar, é a forma mais grave da doença e fatal em mais de 95% dos casos quando os pacientes não recebem tratamento (DOS SANTOS et al., 2019; SUNDAR & SINGH et al., 2018; WHO, 2020). São estimados que ocorram anualmente cerca de 50.000 a 90.000 novos casos de leishmaniose visceral no mundo (WHO, 2020). No velho mundo, a leishmaniose visceral é causada pela *Leishmania (L.) donovani* na Índia, Paquistão, China e alguns países no norte da África e *Leishmania (L.) infantum* em alguns países europeus e na região do Mediterrâneo. No Novo Mundo, onde é

endêmica principalmente no Brasil, é ocasionada pela *Leishmania (L.) infantum* (MCGWIRE et al., 2013; WHO, 2020). Excepcionalmente, algumas espécies causadoras de leishmaniose tegumentar podem visceralizar e causar LV, principalmente em pacientes imunossuprimidos (VAN GRIENSVEN & DIRO, 2019). A leishmaniose visceral resulta da infecção de fagócitos do sistema reticuloendotelial devido a disseminação sistêmica dos parasitos. Na leishmaniose visceral, a proliferação disseminada de parasitos nos macrófagos do fígado, baço e medula óssea dá origem a hepatoesplenomegalia progressiva e supressão da medula óssea, além de perda de peso, febre persistente e anemia. A menos que sejam tratados, é comum que os pacientes desenvolvam imunossupressão severa e se tornem propensos a infecções por outros microrganismos, com conseqüente óbito (DOS SANTOS et al., 2019; MCGWIRE et al., 2013). Embora a leishmaniose visceral seja a forma mais grave, a leishmaniose tegumentar representa a maioria dos casos diagnosticados em seres humanos (DOS SANTOS et al., 2019).

1.2 A leishmaniose tegumentar no Brasil e no mundo

A leishmaniose tegumentar é prevalente em mais de 90 países em todo o mundo (figura 2) com transmissão endêmica comprovada em áreas tropicais e subtropicais, incluindo áreas rurais, florestas tropicais, áreas áridas, semiurbanas e áreas urbanas (GABRIEL et al., 2019). A Organização Mundial da Saúde estima que ocorra anualmente 600.000 a 1.000.000 de casos em todo o mundo (WHO, 2020). No entanto, 70-75% dos casos surgem principalmente no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria (WHO, 2020; HONG et al., 2020). Várias espécies de *Leishmania*, pertencentes a ambos os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* causam leishmaniose tegumentar em humanos, incluindo *Leishmania (L.) tropica*, *Leishmania (L.) major* e *Leishmania (L.) aethiopica* no Velho Mundo, e *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (L.) venezuelensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi* e *Leishmania (V.) lindenberg* no Novo Mundo (GABRIEL et al., 2019). Além disso, vários casos atípicos de leishmaniose cutânea causadas por *Leishmania (L.) infantum* foram relatados na Bacia do Mediterrâneo e em países da América Central e do Sul (HONG et al., 2020).

Figura 2- Número de casos de leishmaniose tegumentar no mundo reportado no ano de 2018 de acordo com a Organização Mundial de Saúde.

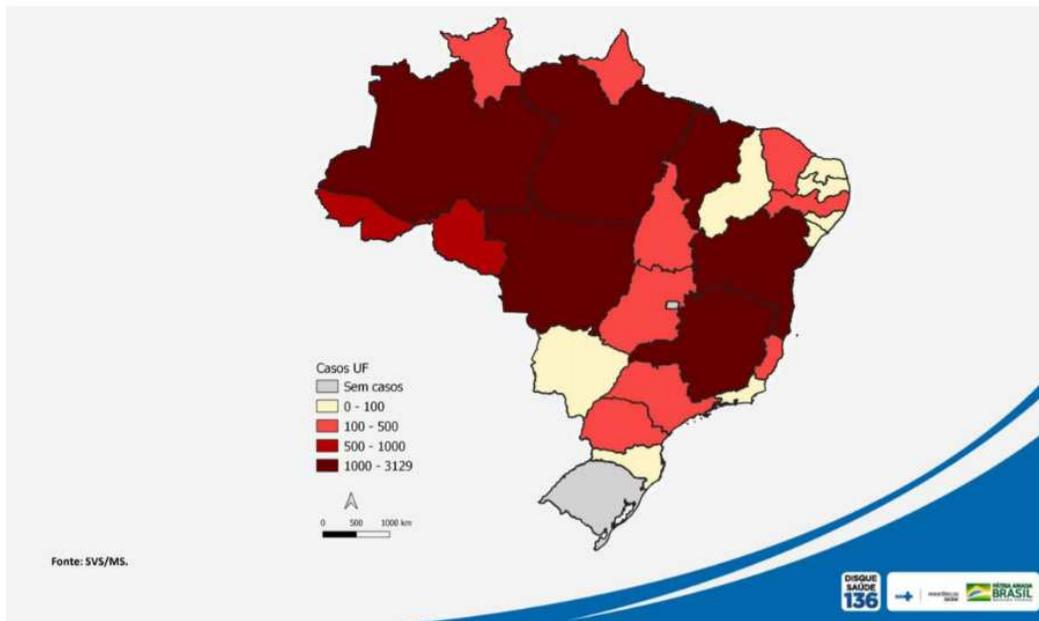


As cores representam o número médio de casos nesse período, e a faixa de cores varia de verde (0 casos) a vinho (> 5.000). Regiões que não possuem dados registrados foram representadas pela cor cinza escuro, enquanto regiões em que os dados não se aplicam foram representadas pela cor em cinza claro

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2018. Disponível em: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/GHO_CL_2018.pdf?ua=1

Pelo menos sete espécies de *Leishmania* são responsáveis pela leishmaniose tegumentar no Brasil, sendo as espécies *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) guyanensis* as principais por ordem de prevalência (MS, 2017; CARVALHO et al., 2019). No Brasil em média, são registrados cerca de 21.000 casos/ano, com coeficiente de incidência de 8,6 casos/100.000 habitantes nos últimos 5 anos. A região Norte apresenta o maior coeficiente com 46,4 casos/100.000 habitantes, seguida das regiões Centro-Oeste com 17,2 casos/10.000 habitantes e Nordeste com 8 casos/100.000 habitantes (Figura 3) (BRASIL, 2020).

Figura 3- Casos de leishmaniose tegumentar por UF, de infecção.



As cores representam o número médio de casos nesse período, e a faixa de cores varia de amarelo (0-100 casos) a vinho (1000-3129 casos). Regiões que não possuem casos registrados foram representadas pela cor cinza claro. **Fonte:** Ministério da Saúde do Brasil, 2019 Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/25/LT-Gr--ficos-e-Mapas.pdf>.

1.3 Características clínicas da leishmaniose tegumentar

A leishmaniose tegumentar (LT) afeta predominantemente a pele dos indivíduos infectados e dependendo da gravidade, do tipo de lesão ou presença de cicatriz pode influenciar o estado psicológico das pessoas acometidas pela doença, levando a piora da qualidade de vida, rejeição social e autodepreciação (BENNIS et al., 2018). A suscetibilidade à LT pode ser influenciada pela desnutrição, imunossupressão e base genética do hospedeiro (REITHINGER et al., 2007). A leishmaniose tegumentar pode se apresentar como diferentes formas clínicas, dentre elas a leishmaniose cutânea localizada (LCL), a leishmaniose cutânea difusa (LCD) e a leishmaniose mucocutânea (LMC) (HONG et al., 2020; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL), é a manifestação mais comum e responsável por até 95% de todos os casos de LT. Se caracteriza pelo desenvolvimento de um único ou pequeno número de lesões nos locais de inoculação do vetor que podem progredir gradualmente em semanas ou meses, de pápulas/nódulos para lesões ulceradas (DOS SANTOS et al., 2019; HONG et al., 2020). O tamanho das lesões é variável, sendo que a parte inferior das lesões ulceradas apresenta tecido de granulação, e a periferia rosa, e às vezes é coberta por uma

pseudomembrana esbranquiçada, e em alguns casos, uma secreção abundante forma uma crosta aderente. Geralmente, a lesão não tem característica dolorosa se não estiver infectada secundariamente (REITHINGER et al., 2007; TORRES-GUERRERO et al., 2017). Em casos esporádicos, podem ocorrer lesões múltiplas no corpo. Contudo, normalmente, as lesões cutâneas podem se resolver espontaneamente após o estabelecimento eficaz da resposta imune mediada por células. A cicatrização espontânea deixa uma placa deprimida com pigmentação e telangiectasia desiguais, ou cicatrizes retráteis com centro hipopigmentado e periferia hiperpigmentada, bem como deformidade local devido à grande destruição de tecido (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Já a leishmaniose cutânea difusa (LCD) é caracterizada pela ausência de resposta aos parasitos, que permite a disseminação através dos tecidos, linfa e vias sanguíneas. Isto faz com que os indivíduos afetados desenvolvam lesões na maior parte da pele (DOS SANTOS et al., 2019; TORRES-GUERRERO et al., 2017). Os pacientes com LCD são frequentemente refratários ao tratamento e as lesões não apresentam resolução espontânea (DOS SANTOS et al., 2019; REITHINGER et al., 2007). Geralmente começa com nódulos eritematosos duros e placas lisas ou verrucosas infiltrativas marrom-avermelhadas que contêm grande número de parasitos, que podem ou não ulcerar. Além disso, linfedema, linfadenopatia, mau estado geral e febre podem ser observados (TORRES-GUERRERO et al., 2017). Menos de 5% dos pacientes desenvolvem lesão de mucosas (HONG et al., 2020). Entretanto, quando as mucosas da orofaringe e nasofaringe estão envolvidas, nódulos dolorosos podem causar obstrução das vias aéreas (TORRES-GUERRERO et al., 2017). A LCD está amplamente associada às espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) aethiopica* e ocorre principalmente na América Central, América do Sul, Quênia e Etiópia. Outras espécies de *Leishmania* podem causar a forma difusa da doença em pacientes imunossuprimidos como, por exemplo, em pacientes co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (DOS SANTOS et al., 2019; HONG et al., 2020).

Na leishmaniose mucocutânea (LMC), que é responsável por 1-10% dos casos de LT em áreas endêmicas (DOS SANTOS et al., 2019; TORRES-GUERRERO et al., 2017), ocorre uma exacerbada imunidade mediada por células, que apesar de controlar a proliferação dos parasitos, também promove intensa inflamação e destruição dos tecidos (DOS SANTOS et al., 2019). Os pacientes tratados para LCL podem manifestar LMC mais tarde, após a resolução aparente das lesões primárias (DOS SANTOS et al., 2019; TORRES-GUERRERO et al., 2017). Mais de

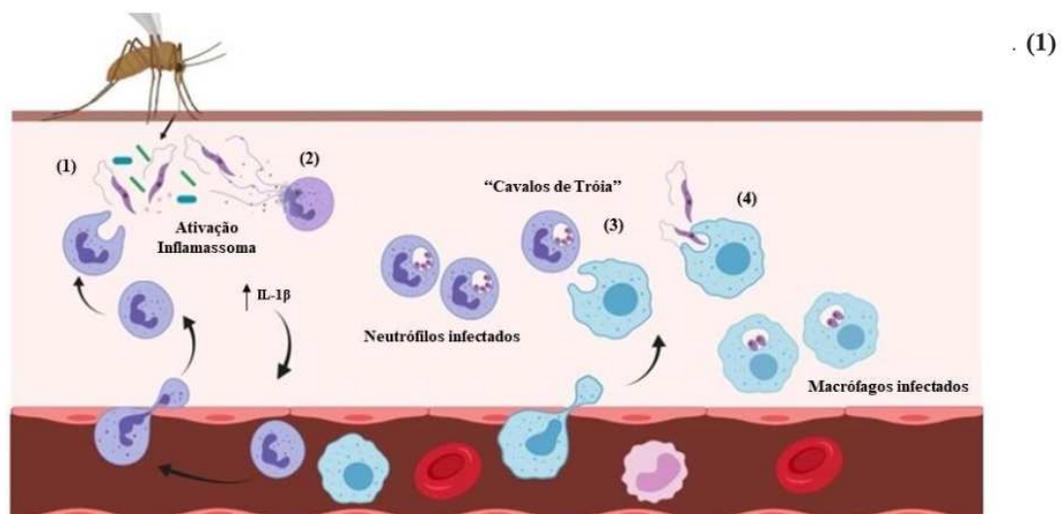
90% dos casos de LMC foram relatados no Brasil, Peru e Bolívia e, embora outras espécies estejam associadas a esta manifestação, como *L. (L.) major*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) infantum*, a LMC tem sido comumente observada em infecções por *L. (V.) braziliensis* (HONG et al., 2020). Os sinais clínicos variam de leve edema do nariz, lábio superior, palato e linfadenopatia local até mutilação grave com obstrução e/ou destruição do nariz, faringe e laringe. No início da doença, ocorre infiltração da mucosa com ulcerações superficiais. Posteriormente, quando as úlceras estão bem desenvolvidas, suas bordas apresentam aspecto necrótico. A úvula, o palato e as amígdalas podem ser destruídos. Devido a infecções superpostas, os gânglios linfáticos regionais podem aumentar e tornarem-se doloridos. Quando a infecção é na cavidade nasal, pode ocorrer atrofia das conchas nasais e destruição do septo cartilaginoso (TORRES-GUERRERO et al., 2017). A leishmaniose mucocutânea não se cura espontaneamente e é potencialmente fatal em função das infecções bacterianas secundárias, incluindo pneumonia e tuberculose (HONG et al., 2020).

1.4 Papel da resposta imunitária inata na leishmaniose tegumentar

Vários eventos ocorrem durante a interação patógeno-hospedeiro durante a infecção causada pelas leishmanias, os quais ativam distintos componentes do sistema imunitário. Após a inoculação dos parasitos pelo vetor, um dos primeiros componentes ativados é o sistema complemento. Contudo, a cobertura de lipofosfoglicano (LPG) das promastigotas impede a destruição dos parasitos mediada pelo complemento. Por outro lado, a opsonização das leishmanias por componentes do complemento favorece a entrada dos parasitos nos fagócitos por meio da fagocitose mediada pelo complemento (CUNNINGHAM, 2002; ROSSI & FASEL, 2018). Além de ativarem o complemento, as promastigotas atraem numerosas células fagocíticas para o ponto de inoculação, que as interiorizam utilizando diversos receptores. Nesse estágio inicial, componentes da saliva dos flebotomíneos como mediadores anti-hemostáticos, adenosina, peptídeos antimicrobianos (AMP) e microrganismos intestinais, desempenham papel essencial estimulando a quimioatração dos fagócitos, facilitando assim entrada dos patógenos em suas células-alvo (DOS SANTOS et al., 2019; ROSSI & FASEL, 2018). Embora os macrófagos sejam a célula hospedeira primária para as leishmanias, numerosos neutrófilos, células dendríticas (DCs) e monócitos são recrutados para o local da infecção e podem ser infectados e ter importantes e distintos papéis durante a infecção pelas leishmanias (figura 4) (SCORZA et al., 2017; SCOTT & NOVAIS, 2016). Durante o repasto sanguíneo componentes presentes na microbiota intestinal dos flebotomíneos estimulam a

ativação do inflamassoma e liberação de IL-1 β , uma potente citocina pró-inflamatória, que promove inflamação e recrutamento precoce de neutrófilos (DOS SANTOS et al., 2019). Os neutrófilos liberam grânulos citoplasmáticos, além de sintetizar quimiocinas e citocinas que podem propiciar o controle inicial da infecção. Entretanto, embora alguns parasitos sejam destruídos pelos mecanismos microbicidas dos neutrófilos, uma parte sobrevive no interior dos neutrófilos até que sofram apoptose. Então, ao serem fagocitados pelos macrófagos, os neutrófilos apoptóticos permitem a entrada silenciosa dos parasitos em suas células hospedeiras, facilitando assim a invasão das células-alvo pelas leishmanias (DOS SANTOS et al., 2019; SCORZA et al., 2017; SCOTT & NOVAIS, 2016).

Figura 4- Recrutamento de células do sistema imune inato na infecção por *Leishmania*



Componentes derivados da saliva do flebotomíneo como mediadores anti-hemostáticos, adenosina, peptídeos antimicrobianos (AMP) e micróbios intestinais induzindo a ativação do inflamassoma e liberação de IL-1 β , que desempenha papel essencial estimulando a quimioatração de neutrófilos. (2) Os neutrófilos liberam grânulos citoplasmáticos, além de sintetizar quimiocinas e citocinas que podem propiciar o controle inicial da infecção. Neutrófilos também podem recrutar células dendríticas para o local da infecção através da liberação de moléculas quimioatraentes para as DCs (não mostrado) (3) Entretanto, alguns parasitos sobrevivem até que os neutrófilos sofram apoptose. Então, ao serem fagocitados pelos macrófagos, os neutrófilos permitem a entrada silenciosa dos parasitos em suas células hospedeiras, agindo como “Cavalos de Tróia”, facilitando assim a invasão das células alvo pelas leishmanias (4) Promastigotas livres e/ou opsonizadas pelo complemento também podem ser internalizadas por macrófagos, onde se diferenciam em amastigotas. **Fonte:** Adaptado de DOS SANTOS et al., 2019.

Além dos aspectos citados anteriormente, os neutrófilos também podem recrutar células dendríticas para o local da infecção através da liberação de moléculas quimioatraentes para as DCs, tais como a quimiocina CCL3 que induz a maturação das células dendríticas proporcionando uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa (SCOTT & NOVAIS., 2016). As células dendríticas são importantes células apresentadoras de antígenos (APCs) que podem desempenhar funções diretas e diversas na resposta imune, levando à ativação dos linfócitos T, bem como à tolerância e à anergia (FEIJÓ et al., 2016). No contexto da leishmaniose tegumentar, os conhecimentos atuais são baseados em grande parte nos resultados de estudos sobre resistência e suscetibilidade à *L. (L.) major* em modelos murinos (SCOTT et al., 1988) e vários estudos têm mostrado que as DCs podem desempenhar papel funcional dicotômico na modulação da resposta imune do hospedeiro, afetando a resposta imune adaptativa e o desfecho da doença (GABRIEL et al., 2019; FEIJÓ et al., 2016; SCOTT et al., 2016). Durante a leishmaniose cutânea experimental, os monócitos inflamatórios infiltrantes na pele diferenciam-se localmente em DCs e subsequentemente migram para os linfonodos de drenagem, onde induzem respostas polarizadas de linfócitos T CD4⁺, com linfócitos Th1 participando do controle dos parasitos e linfócitos Th2 favorecendo sua proliferação. Esse controle mediado pelos linfócitos Th1 ocorre pelo fato dessas células secretarem IFN- γ , que induz os macrófagos infectados a produzirem NO, um radical livre com propriedades leishmanicidas. Já os linfócitos Th2 favorecem o crescimento parasitário por secretarem citocinas que desativam os macrófagos e induzem as células infectadas a produzirem poliaminas que servem como indutores do crescimento parasitário (DOS SANTOS et al., 2019). Assim, o microambiente inflamatório da lesão pele tem um papel importante em influenciar a resposta dos linfócitos T e a progressão ou resolução da doença (SCORZA et al., 2017).

Outro aspecto relevante é que antes do desenvolvimento dos linfócitos Th1, o interferon- γ (IFN- γ) é produzido principalmente por células natural killers (NK). Essa citocina oriunda das células NK, além do potencial ação leishmanicida direta, aumenta a produção de IL-12 pelas DCs ativadas, o que auxilia o desenvolvimento de linfócitos com perfil T auxiliar do tipo 1 (Th1). Os monócitos também são recrutados do sangue para as lesões causadas pelas leishmanias por meio de quimiocinas com afinidade pelo CCR2. Monócitos recrutados para o local da inoculação intradérmica de *Leishmania* podem se diferenciar localmente em células dendríticas ou macrófagos. Diferentemente dos neutrófilos, os monócitos inflamatórios são eficientes em matar os parasitos por produzirem espécies reativas de oxigênio (ROS) (LORÍA-CERVERA & NARVAEZ, 2020; SCORZA et al., 2017; SCOTT & NOVAIS, 2016). Outra

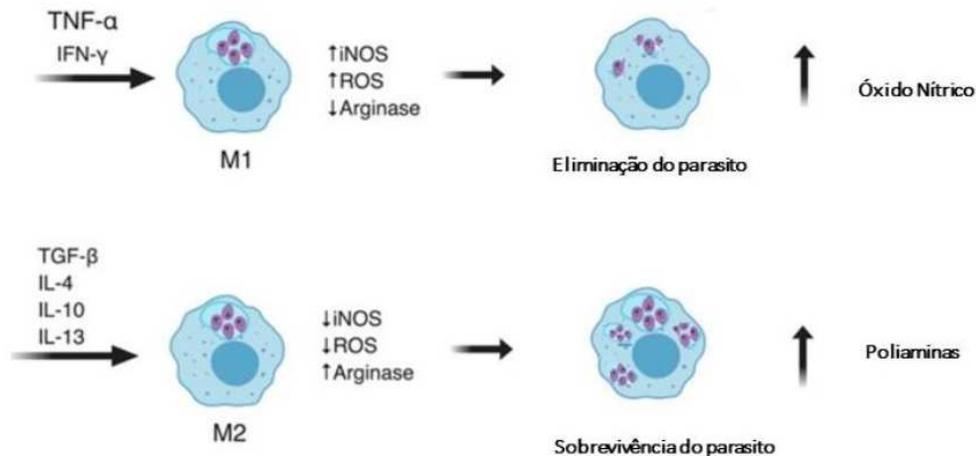
célula do sistema imunitário inato relevante no contexto das leishmanioses são os macrófagos, que são as principais células hospedeiras das leishmanias, sendo importante para o estabelecimento da infecção e persistência dos parasitos. Tais células são fagócitos especializados na eliminação de patógenos intracelulares (SCOTT & NOVAIS, 2016; PODINOVSKAIA et al., 2015; ROSSI & FASEL, 2018). O reconhecimento e a interiorização de microrganismos pelos macrófagos ocorrem por meio de: a) receptores para padrões moleculares de patógenos (PAMPs), que se ligam diretamente à antígenos expressos na superfície de microrganismos, e b) receptores para opsoninas, que se ligam a moléculas do hospedeiro que se depositaram na superfície dos patógenos (ADEREM & UNDERHILL, 1999; UNDERHILL & OZINSKY, 2002). No caso das leishmanias, os receptores tipo Toll (TLRs), reconhecem distintos antígenos expressos na superfície dos parasitos. Tais receptores desempenham diferentes papéis e frequentemente específicos para cada espécie de *Leishmania*, adicionando complexidade e diversidade aos seus papéis no contexto das leishmanioses, mas possivelmente explicando diferentes desfechos clínicos que vão desde a depuração até a patologia exacerbada (ROSSI & FASEL, 2018). O reconhecimento dos parasitos pelos macrófagos também dispara sua interiorização. A fagocitose das leishmanias em macrófagos é mediada tanto por receptores para PAMPs quanto para opsoninas e envolve principalmente o receptor de manose, o receptor de complemento do tipo 3 (CR3), o receptor de complemento do tipo 1 (CR1), os receptores para porção Fc de IgG, em particular (FcγRII-B2) e os receptores de fibronectina (FnRs) (PODINOVSKAIA et al., 2015; UENO & WILSON, 2012). Após a fagocitose, os macrófagos confinam as leishmanias nos fagolisossomas, que é uma organela repleta de enzimas líticas e com baixo pH.

Nas primeiras horas da infecção, a resposta anti-*Leishmania* mais eficaz por parte dos macrófagos é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), um processo rigidamente regulado que visa matar o patógeno invasor sem danificar a célula hospedeira (LORÓA-CERVERA et al., 2020; ROSSI & FASEL, 2018; PODINOVSKAIA et al., 2015). Mais tardiamente, os macrófagos produzem espécies reativas de nitrogênio (RNS), que são moléculas dotadas de potente ação leishmanicida, sendo extremamente importantes para o controle da infecção pela *Leishmania* (DOS SANTOS et al., 2019). Duas importantes enzimas envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio em macrófagos são a NADPH oxidase 2 (NOX2) e a sintase do óxido nítrico induzível (iNOS), que produzem ânion superóxido (O_2^-) e óxido nítrico (NO), respectivamente (ROSSI & FASEL, 2018). Tais enzimas encontram-se expressas em grande quantidade em macrófagos M1 (figura 5), que são células

ativadas por citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α (GABRIEL et al., 2019). A NADPH oxidase catalisa a geração do ânion superóxido (O_2^-) a partir do O_2 e NADPH (ABDAL et al., 2017) Tal molécula exerce ação anti-*Leishmania* por inativar enzimas dos parasitos e danificar o patógeno por meio da peroxidação lipídica (ABDAL et al., 2017). O ânion superóxido é um radical livre com vida biológica curta devido a sua rápida redução em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um radical livre que também possui ação leishmanicida (ABDAL et al., 2017). Já a síntese do óxido nítrico, uma das principais moléculas leishmanicidas conhecidas, é catalisada pela iNOS que metaboliza a L-arginina para gerar L-citrulina e óxido nítrico (ABDAL et al., 2017; LORÍA-CERVERA et al., 2020). A toxicidade do NO para as leishmanias resulta de sua ação sobre diversas proteínas como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e metaloproteases como a aconitase e a cisteína proteinase. O NO também altera a regulação pós-traducional das proteínas dos parasitos, pois ao reagir com resíduos de tiol (-SH) leva à formação de nitrosotióis (R-SNO), afetando profundamente a função da proteína alvo e, portanto, a síntese de proteínas pelos parasitos (VALE-COSTA, 2013).

Ao longo da coevolução com os hospedeiros, as leishmanias desenvolveram várias estratégias para escapar dos mecanismos microbicidas dos macrófagos. Após a fagocitose, o LPG das leishmanias retarda a fusão fagolisossomal e permite que as promastigotas se diferenciem em amastigotas, que são dotadas de maior resistência ao ambiente ácido dos fagolisossomas (CUNNINGHAM et al., 2002; ROSSI & FASEL, 2018). O escudo de lipofosfoglicano (LPG) também protege os parasitos das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e, ainda retarda a montagem de NOX2 na superfície do fagossoma, suspendendo a produção de O_2^- . O estresse oxidativo também pode ser inibido pela metaloprotease gp63, que interfere nas vias de sinalização de macrófagos que levam à indução de NOX2 e iNOS (ROSSI & FASEL, 2018). Por outro lado, quando espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são geradas, as leishmanias secretam peroxidoxinas (LcPxn1 e 2) e superóxido dismutase, que neutralizam as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio liberadas no fagolisossoma (OLIVIER et al., 2005). Além disso, a infecção pelas leishmanias pode induzir a polarização dos macrófagos para um fenótipo M2 (figura 5), que expressa arginase, enzima que compete com a iNOS e metaboliza a L-arginina para gerar nutrientes essenciais para os parasitos, como as poliaminas, favorecendo a sobrevivência e o crescimento parasitário (GABRIEL et al., 2019; LORÍA-CERVERA).

Figura 5- Polarização de macrófagos no contexto das leishmanioses.



Em (A) Macrófagos ativados por citocinas pró-inflamatórias (M1), como IFN- γ e TNF- α , apresentam expressão aumentada de iNOS, ROS e baixa expressão de arginase e geram óxido nítrico que medeia a destruição dos parasitos. (B) Macrófagos ativados por citocinas anti-inflamatórias (M2), como IL-4, IL-1, IL-10 e TGF- β , apresentam baixa expressão de iNOS, ROS e expressão elevada de arginase e geram poliaminas que estimula a sobrevivência e proliferação dos parasitos. **Fonte** :Adaptado de DOS SANTOS et al., 2019.

Assim, o escape do parasitário da resposta imunitária inata induz a ativação da resposta imune adaptativa.

1.5 Papel da resposta imunitária adaptativa na leishmaniose tegumentar

É geralmente aceito que a proteção contra as leishmanias está associada à imunidade celular (ROSTAMIAN et al., 2019; SACKS et al., 2002). No entanto, a resposta humoral é uma parte importante da imunidade contra patógenos. Essas respostas são mediadas por anticorpos que desempenham várias funções, como opsonização, citotoxicidade e liberação de mediadores inflamatórios (ROSTAMIAN et al., 2019). Os linfócitos B são responsáveis pela geração de anticorpos antígeno-específicos e, por serem células apresentadoras de antígenos (APCs) também podem desempenhar um papel na ativação dos linfócitos T (GABRIEL et al., 2019). O papel da resposta humoral no contexto das leishmanioses ainda é desafiador, pois há tanto relatos de que linfócitos B podem ter efeitos prejudiciais, quanto efeitos benéficos em infecções pela *Leishmania* (GABRIEL et al., 2019; GONCALVES et al., 2020; ROSTAMIAN et al., 2019). Alguns estudos em modelos murinos sugerem que os linfócitos B podem estar envolvidos na exacerbação das infecções por *Leishmania*, incluindo doenças cutâneas causadas por *Leishmania (L.) tropica*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) major*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.)*

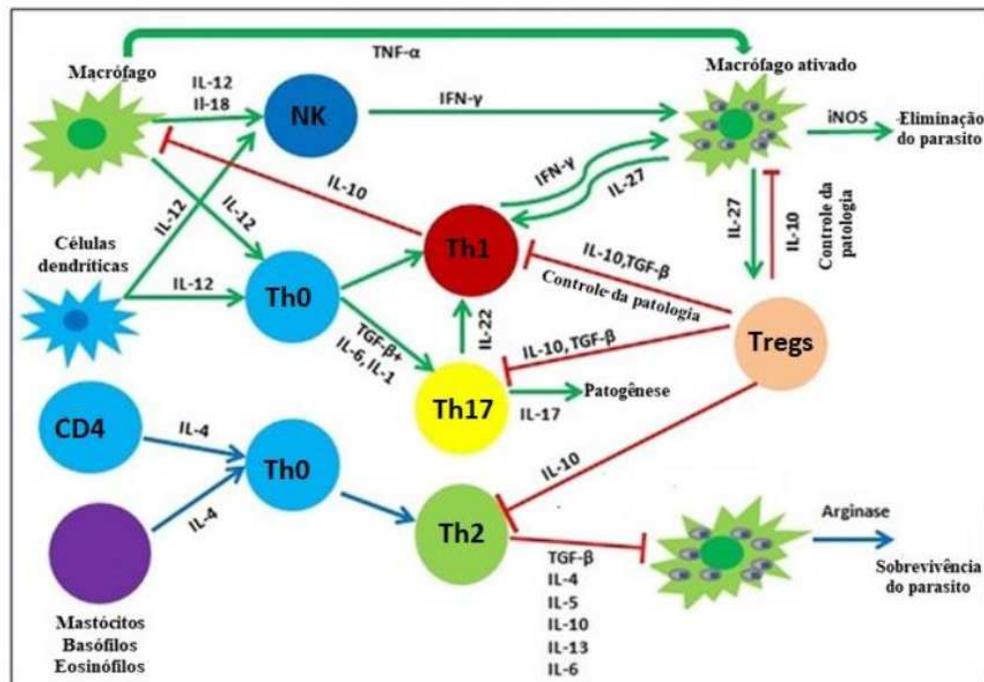
amazonensis. Entretanto, mecanismo subjacente ainda é desconhecido (FIRMINO-CRUZ et al., 2020; GONÇALVES et al., 2019). Um ensaio da infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos JhD, que não produzem linfócitos B, mostrou que os anticorpos estão relacionados à exacerbação da infecção e que os linfócitos B podem estar relacionados ao aumento da patologia. Neste estudo, os camundongos apresentaram desenvolvimento mais lento da infecção e lesões de tamanhos menores que os camundongos BALB/c (WANASEN et al., 2008). Além disso, tem sido relatado que anticorpos anti-*Leishmania* contribuem para a progressão da leishmaniose através da produção de IL-10 a partir de macrófagos (FIRMINO-CRUZ et al., 2020). Em humanos já foi demonstrado que as manifestações clínicas associadas a leishmaniose tegumentar são amplamente influenciadas pela amplitude da resposta imune do hospedeiro contra a infecção pela *Leishmania* e essas respostas podem ser protetoras ou patológicas. Por um lado, os pacientes podem desenvolver uma forte imunidade celular, controlando a proliferação do parasito, enquanto, por outro, uma resposta predominantemente baseada na imunidade humoral (altos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*) pode promover intensa proliferação das leishmanias (DOS SANTOS et al., 2019; GONÇALVES et al., 2019). Em contraste, o papel benéfico da resposta humoral na infecção pela *Leishmania* em seres humanos também foi descrito em alguns estudos. Foi demonstrado que o isotipo IgG2a está associado com controle da leishmaniose, enquanto o isotipo IgG1 está associado com a progressão da doença (ROSTAMIAN et al., 2019).

Diferentemente da imunidade humoral, o papel da imunidade celular contra as leishmanias já é mais amplamente estabelecido. De maneira geral, a resposta imunitária adaptativa contra as leishmanias é fortemente marcada pela expansão e diferenciação de linfócitos T CD4⁺. A maior parte dos conhecimentos acerca da imunidade adaptativa na leishmaniose tegumentar são provenientes dos estudos de infecções em modelos murinos infectados com *L. (L.) major* (SACKS et al., 2002; SCORZA et al., 2017; SCOTT et al., 1988). Baseado nesses estudos, foi amplamente difundido o conceito de que a população de linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1) estão associados a resistência contra os parasitos e está associada ao desenvolvimento de potente resposta imune celular, enquanto a população de linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2) está relacionada com a suscetibilidade à infecção pela *Leishmania*, e ao desenvolvimento da imunidade humoral e produção de anticorpos contra os parasitos (BACELLAR, 2002; DOS SANTOS, et al., 201 ; OSERO et al., 2020; SACKS et al., 2002).

O ambiente de citocinas criado pelos linfócitos T CD4 auxiliares tipo 1 (Th1) é caracterizado por uma resposta pró-inflamatória vigorosa e um microambiente rico nas

citocinas $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-12 , IL-18 e IL-23 . Em função disso, ocorre aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) pelos macrófagos infectados. Há ainda fagocitose aumentada, que em conjunto com as demais modificações imunológicas induzidas pelos linfócitos Th1, leva a destruição dos parasitos e ao controle da infecção (GABRIEL et al 2019; DOS SANTOS., et al 2019). Por outro lado, durante a infecção pelas leishmanias, o microambiente anti-inflamatório criado pelos linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2) torna-se rico nas citocinas IL-4 , IL-13 , IL-10 e fator de transformação do crescimento beta ($\text{TGF-}\beta$). Tal microambiente acarreta atividade aumentada de arginase nos macrófagos infectados, biossíntese de poliaminas e regulação negativa mediada pela IL-21 de iNOS e $\text{TNF-}\alpha$, favorecendo a proliferação intracelular dos parasitos e a progressão da doença (Figura 6) (GHORBANI et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2019; MASPI et al., 2016; OSERO et al., 2020).

Figura 6 - Vias imunológicas na leishmaniose tegumentar



Após a entrada do parasito, as APCs (macrófagos e células dendríticas) são estimuladas a produzir citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12 . Essas citocinas promovem a diferenciação Th1 e a produção de $\text{IFN-}\gamma$ leva à ativação de macrófagos e morte dos parasitos pela produção de NO . Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias como a IL-4 produzida por diferentes células imunológicas, promovem a diferenciação Th2 que leva à regulação positiva da biossíntese poliaminas pela arginase, que inibe a atividade leishmanicida de macrófagos e permite a sobrevivência prolongada dos parasitos. Na presença

de TGF- β , IL-6, IL-1 β existe diferenciação Th17 e produção de IL-17, uma citocina inflamatória que medeia patogênese e desenvolvimento de lesões na leishmaniose. Os linfócitos T reguladores (Treg) são responsáveis pela produção de citocinas, como IL-10 e/ou TGF- β , que contribuem para a progressão ou remissão da doença dependendo da espécie de *Leishmania*. **Fonte:** Adaptado de MASPI et al., 2016.

O papel de outras subpopulações de linfócitos T na patogênese das leishmanioses, como linfócitos T citotóxicos (TCD8⁺), linfócitos Th17 e linfócitos T reguladores (Treg) também tem sido descrito. Estudos tem demonstrado que os linfócitos T CD8⁺ podem cooperar para a defesa contra a infecção pela *Leishmania*. Na ativação inicial dos linfócitos Th1, os linfócitos TCD8⁺ produzem IFN- γ nos linfonodos e ativam as células dendríticas para que produzam interleucina-12, uma citocina necessária a diferenciação dos linfócitos Th1 e supressão dos linfócitos Th2 (ROSSI & FASEL, 2018; SCOTT & NOVAIS, 2016). Em modelo murino experimental também foi observado que linfócitos T CD8⁺ foram necessários para promover o desenvolvimento de linfócitos Th1 após um inóculo infeccioso baixo (ROSSI & FASEL, 2018). Por outro lado, os linfócitos T CD8⁺ podem desempenhar também um papel patogênico. Já foi observado que linfócitos T CD8⁺ que respondem aos antígenos de *Leishmania* promovem citotoxicidade mediada por grânulos na pele e induzem a morte das células-alvo. As células mortas liberaram parasitos e padrões moleculares associados à danos (DAMPs) que acarretaram na disseminação dos parasitos e inflamação severa (ROSSI & FASEL, 2018). Outro aspecto que também já foi demonstrado é que a proporção de linfócitos TCD8⁺ aumenta em pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* conforme a doença progride de lesões sem ulceração para lesões ulceradas, sugerindo um possível papel de tais linfócitos na patogenia da doença (ROSSI & FASEL, 2018; SCOTT & NOVAIS, 2016).

Outro aspecto que também tem sido investigado é o papel dos linfócitos Th17. Tem sido sugerido que esses linfócitos participam da regulação do balanço de citocinas inflamatórias, modulando a imunidade adaptativa, secretando citocinas que contribuem para o recrutamento de células inflamatórias (GHORBANI et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2019). O interesse nos linfócitos Th17 permanece focado principalmente na sua capacidade de produzir IL-17, embora tal citocina também seja produzida por outras células, como linfócitos T CD8⁺ e neutrófilos (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017). A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que age sobre uma variedade de células, tais como fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, estimulando a produção de mediadores inflamatórios, incluindo IL-1 β , IL-6, TNF- α e quimiocinas que colaboram para potencializar a reação inflamatória (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017; KOSTKA et al., 2000). A indução de mediadores inflamatórios

pela IL-17, também contribui para o recrutamento de neutrófilos, e tal propriedade tem sido considerada benéfica nos estágios iniciais da infecção experimental pela *Leishmania* (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017). No entanto, foi observado progressão das lesões cutâneas relacionada ao recrutamento de neutrófilos mediado por IL-17 em camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) major* e a ausência de IL-17 nesses animais determinou uma evolução mais branda da doença (KOSTKA et al., 2009). De forma semelhante, os níveis de IL-17 se correlacionam positivamente com a resposta inflamatória na pele de pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa (SCOTT & NOVAIS., 2016).

O papel dos linfócitos T reguladores (Treg) no contexto das leishmanioses também tem sido investigado. Tais células produzem citocinas como a IL-10 e/ou TGF- β , que foram relacionadas a manutenção da latência dos parasitos, resistência ao tratamento anti-*Leishmania* e recidiva da doença, tanto em modelos murinos quanto em seres humanos. (MASPI et al., 2016; ROSSI & FASEL, 2018).

Em pacientes com leishmaniose tegumentar tem sido demonstrado que a resposta de linfócitos T varia em função da forma clínica apresentada. Em indivíduos com leishmaniose cutânea localizada (LCL) há resposta vigorosa que pode variar de predominantemente do tipo 1 a uma resposta mista do tipo 1 e do tipo 2 (SCORZA et al., 2017). Já os pacientes com leishmaniose mucocutânea (LMC) parecem apresentar resposta do tipo 1 exacerbada, já que foi observado alta produção de TNF- α e IFN- γ em culturas de células mononucleares derivadas de pacientes após estimulação com antígeno de *Leishmania* (SCORZA et al., 2017). Essa resposta é fracamente regulada pela IL-10 e o TGF- β , que são citocinas supressoras das funções dos linfócitos e dos macrófagos, fazendo com que uma resposta Th1, considerada protetora contra as leishmanias, seja patogênica no contexto da LMC (BACELLAR et al., 2002). Também tem sido hipotetizado que os linfócitos Th17 tenham um papel patogênico na LMC, já que lesões de pacientes com essa forma clínica de leishmaniose apresentaram maior expressão de IL-17 do que lesões de pacientes com LCL (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017; SCOTT & NOVAIS, 2016). Assim, acredita-se que na LMC, a proporção de citocinas inflamatórias para regulatórias é distorcida em direção ao polo inflamatório e que essa resposta inflamatória desregulada em face da atividade regulatória ineficiente conduza à destruição tecidual observada na LMC. Diferentemente, os pacientes com leishmaniose cutânea difusa (LCD) apresentam lesões com redução significativa do número de células produtoras de IFN- γ e IL-12. Além disso, já foi observado também que os pacientes com LCD têm menos células NK circulantes e lesionais do que os pacientes com LCL, e as células NK secretam menos IFN-

γ e TNF- α , (SCORZA et al, 2017), que como mencionado previamente, são citocinas que desempenham um importante papel no controle da infecção parasitária. Essa falta de resposta de defesa apropriada contra as leishmanias tem sido considerada a causa da alta carga parasitária apresentada pelos pacientes portadores de LCD.

1.6 Tratamento convencional da leishmaniose tegumentar

Para interromper a replicação parasitária e a inflamação resultante que ocasiona destruição tecidual, os pacientes com leishmaniose são submetidos à terapêutica antiparasitária. Depois de confirmado o diagnóstico da infecção pela *Leishmania*, o paciente inicia o tratamento da doença, que objetiva a destruição dos parasitos intracelulares e extracelulares. De acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde, o tratamento de primeira escolha para a leishmaniose tegumentar são os antimoniais pentavalentes (Sb⁵⁺), que são comercializados na forma de antimoniato de meglumina (MA) e o estibogluconato de sódio (SSG). O antimônio é um metalóide que gera vários efeitos biológicos nas células e tecidos e seu uso terapêutico é utilizado há séculos (BEBERT et al., 2018; FRÉZARD et al., 2009; MINODIER et al., 2007, BRASIL, 2017). Desde a década de 40, o antimoniato de meglumina (MA) continua sendo o único antimonial disponível para o tratamento de primeira ou segunda linha contra todas as formas de leishmaniose tegumentar no Brasil. Atualmente, antimoniato de meglumina é comercializado no Brasil exclusivamente pela Sanofi-Aventis Farmacêutica sob o nome comercial Glucantime® e está disponível em todo o Sistema Único de Saúde (SUS) (CARVALHO et al., 2019; BRASIL, 2017). O regime terapêutico padrão para adultos e crianças depende da espécie de *Leishmania* e das características clínicas da leishmaniose tegumentar, variando de 10 a 20 mg (Sb⁵⁺) /kg/dia, administrado durante 20-30 dias consecutivos, por via intravenosa ou intramuscular, com tratamento repetido se necessário, o que atribui custo elevado para a terapia (CARVALHO et al., 2019). Além do protocolo anteriormente mencionado, em 2010, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou a inclusão de tratamentos locais e tópicos de antimoniato de meglumina entre as alternativas terapêuticas aceitáveis para leishmaniose tegumentar nas Américas, sendo essa aplicação restrita para a forma clínica da leishmaniose cutânea localizada. No Brasil a aplicação de MA intralesional é recomendada de uma a três aplicações, por via subcutânea, utilizando aproximadamente, 5 ml por sessão, com intervalo de 15 em 15 dias. (BRASIL, 2017; BRITO et al., 2019). Embora os antimoniais sejam razoavelmente eficazes com taxas de cura clínica tipicamente na faixa de 60–90% (CARVALHO et al., 2019), apresentam várias limitações,

incluindo efeitos colaterais graves e resistência dos parasitos ao medicamento (CARVALHO et al, 2019; FRÉZARD et al, 2009; GHORBARNI et al., 2018). O tratamento terapêutico com antimônio costuma ser acompanhada por dor local durante as injeções intramusculares e por efeitos colaterais sistêmicos, exigindo supervisão médica muito cuidadosa. Os efeitos colaterais típicos incluem náusea, vômito, fraqueza, mialgia, cólica abdominal, diarreia, erupções cutâneas, até severas alterações cardíacas, renais, hepáticas e pancreáticas, que podem colocar em risco a vida dos pacientes. No tratamento intralesional pode ocorrer dor no local da lesão e os mesmos efeitos adversos do tratamento sistêmico, porém de grau leve a moderado (BRASIL,2017; FRÉZARD et al., 2009; PONTE-SUCRE et al., 2017).

Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo MA, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B, miltefosina e as pentamidinas. (BRASIL, 2017; GALVIS et al., 2020). No Brasil, o desoxicolato de anfotericina B e anfotericina B lipossomal são consideradas como droga de primeira escolha no tratamento de gestantes e paciente coinfectados com vírus da imunodeficiência humana, e de segunda escolha quando há impossibilidade do uso do antimonial pentavalente em pacientes com histórico de doenças cardíacas, renais e resistentes ao tratamento pelo MA. Os efeitos adversos mais frequentes são febre, cefaleia, tremores, cianose, hipotensão, hipomagnesemia, distúrbio de comportamento, calafrios, náuseas, vômitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão. Outros efeitos adversos importantes são anorexia, comprometimento da função renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas. Quando há necessidade de uso sequencial do desoxicolato de anfotericina B após antimonio de meglumina, recomenda-se que o desoxicolato de anfotericina B seja iniciado somente após 14 dias do término do tratamento com o antimonio, para evitar toxicidade cardíaca grave. Já a recomendação do uso de anfotericina B lipossomal é baseada na prática clínica com a leishmaniose visceral, que tem utilizado dose variável de 18 a 40 mg/kg, possui efeitos adversos semelhantes aos observados com a desoxicolato de anfotericina B, mas com menor frequência e intensidade (BRASIL.,2017). No entanto, o custo desse medicamento pode ser uma limitação em países em desenvolvimento (CARVALHO.,et al 2019; GALVIS et al., 2020).

As pentamidinas vêm sendo utilizadas como drogas de segunda escolha no tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano (CARVALHO et al., 2019; CHAKRAVARTY et al., 2019). As reações adversas mais frequentes são dor, induração e abscessos estéreis, se aplicação intramuscular, além de náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaleia, hipotensão, lipotímias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia. O diabetes mellitus pode se manifestar a partir da administração da dose total de

2 g. O efeito diabetogênico é dose dependente. Devido ao medicamento ter ação tóxica aguda sobre as células beta-pancreática, pode haver hipoglicemia durante o tratamento e diabetes mellitus tardio (BRASIL., 2017). Recomenda-se a administração de 2,5 mg/kg/dia, por via oral, dividida em 2 a 3 doses por dia, até o limite de 150 mg/dia (3 cápsulas/dia).

Outra forma alternativa para o tratamento da leishmaniose tegumentar é a miltefosina, medicamento indicado para câncer, porém, é reportado em literatura efetividade em algumas espécies de *Leishmania*, especialmente *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis* (CHAKRAVARTY et al., 2019; BRASIL,2018). No Brasil recomenda-se a administração de 2,5 mg/kg/dia, por via oral, dividida em 2 a 3 doses por dia, até o limite de 150 mg/dia (3 cápsulas/dia), o medicamento é contraindicado em pacientes que apresentem danos graves e pré-existentes da função hepática ou renal (BRASIL,2018).

Alguns esquemas terapêuticos alternativos também tem sido utilizados para os casos refratários ou com contraindicações aos esquemas tradicionais, tais como: associação do antimonial pentavalente e pentoxifilina, ou antimonial pentavalente e alopurinol, antimonial pentavalente e sulfato de aminosidina, antimonial pentavalente e sulfato de paramomicina, antimonial pentavalente com fonte de terapia térmica, com diferentes métodos incluindo radiofrequência, ultrassom, infravermelho, termoterapia de cristalização exotérmica e microondas (CHAKRAVARTY et al., 2019; BRASIL, 2017; SIADAT et al., 2021).

Além das problemáticas de toxicidade citadas anteriormente, o aparecimento de resistência aos medicamentos é outro problema importante no tratamento desta doença. Outras condições também resultam em falha terapêutica como baixa adesão ao tratamento devido aos efeitos colaterais e tratamento prolongado, mutações genéticas dos parasitos que reduzem a resposta aos medicamentos, suscetibilidade distinta aos medicamentos das diferentes espécies de *Leishmania*, estado imunológico do hospedeiro, que pode estar imunossuprimido em função de coinfeções e desnutrição, e mudanças ambientais que favoreçam a seleção ou disseminação de parasitos resistentes (HALDAR et al, 2011; GHORBARNI et al., 2018; PONTE-SUCRE et al., 2017). Além disso, pobre resposta terapêutica pode ser observada também devido a outros fatores tais como redução do acúmulo de drogas dentro do parasito, seja pelo aumento do efluxo da droga ou diminuição da captação celular da droga ou inativação do agente terapêutico ativo (ALVEN & ADERIBIGBE, 2020). Os medicamentos de segunda linha também podem determinar efeitos colaterais graves e pela necessidade de administração parenteral e toxicidade pode resultar em dificuldade de adesão e, conseqüentemente, em falhas no tratamento (FRÉZARD et al., 2009). Todas essas evidências representam um grande desafio

para o tratamento da leishmaniose tegumentar e indicam a necessidade de alternativas terapêuticas com menor toxicidade e maior eficácia contra os parasitos.

1.8 Nanopartículas como alternativa para o tratamento da leishmaniose tegumentar

Na busca por novas alternativas terapêuticas, a nanotecnologia tem permitido a elaboração de diversos sistemas visando o tratamento de doenças causadas por protozoários, principalmente como dispositivos carreadores para fármacos antiparasitários (VOLPEDO et al., 2019). Nesse contexto, as leishmanioses são consideradas doenças particularmente interessantes para serem tratadas com nanocarreadores, já que os parasitos infectam células altamente fagocíticas, que poderiam interiorizar as nanopartículas carregadas de drogas, o que facilitaria a destruição dos patógenos intracelulares (SALEEM et al., 2019). Diversos estudos mostraram que nanopartículas contendo drogas anti-*Leishmania* são fagocitadas pelos macrófagos e a droga é, posteriormente, liberada nos fagolisossomos contendo as formas amastigotas, melhorando assim o efeito antiparasitário dos medicamentos, reduzindo os efeitos colaterais e a toxicidade relacionada ao tratamento (CARVALHO et al., 2019; JEBALI et al., 2013; KHATAMI et al., 2017). As nanopartículas (NPs) são definidas como materiais manufaturados contendo partículas em um estado livre ou como um agregado, em que pelo menos 50% das partículas têm uma ou mais dimensões na faixa de 1–100 nm (KHATAMI et al., 2017; VOLPEDO et al., 2019). Pelas suas dimensões, as nanopartículas não apenas têm a capacidade de circular amplamente por todo o corpo, mas também podem entrar na célula e controlar a distribuição da droga no corpo, bem como transportar a droga especificamente para o local de ação (NAFARI et al., 2020). Entre os nanocarreadores mais utilizados estão as nanopartículas inorgânicas de metal e óxido de metal e as orgânicas de lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas e nanomateriais à base de carbono (ABDAL et al., 2017; SALEEM et al., 2019; VOLPEDO et al., 2019).

O uso da anfotericina B lipossomal (AmBisome; United Medical, São Paulo, SP, Brasil) como tratamento de segunda linha para a leishmaniose tegumentar americana representa um dos primeiros exemplos de aplicação eficiente de um nanocarreador orgânico (CARVALHO et al., 2019). Embora o produto esteja disponível no Brasil, ele apresenta duas desvantagens importantes: deve ser aplicado exclusivamente por via intravenosa em ambiente hospitalar e o tratamento completo apresenta custo elevado para o Sistema Único de Saúde (CARVALHO et al., 2019). Devido a isso, tem sido realizados diversos estudos relacionando o uso de nanopartículas para liberação de antimoniato de meglumina por via oral. Em 2003, foi demonstrado que um complexo 1:1 de antimonial pentavalente com betaciclodestrina

administrada por via oral a camundongos BALB/c foi tão efetiva quanto a administração parenteral de antimoníato de meglumina (DEMICHELI et al., 2004). Também foi observado que a administração de um complexo de antimonial pentavalente com n-octanoil-N-metilglucamida (SbL8) na proporção 1:3 foi extremamente efetiva na supressão de *L. (L.) infantum* em modelo murino. Uma formulação de SbL8 em água e propileno glicol dada em doses repetidas a camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* reduziu significativamente a carga parasitária nas lesões cutâneas dos animais quando comparado com o antimonial administrado por via parenteral (LANZA et al., 2016). A atividade antiparasitária de nanopartículas de antimonial pentavalente também foi estudada por Franco e colaboradores que testaram formulações de hidrossóis nanohíbridos em hamsters Sírios com lesões experimentalmente induzidas por *L. (L.) amazonensis*. O tratamento intralesional com os hidrossóis reduziu as lesões mais eficientemente que a solução de antimoníato de meglumina isoladamente. Os mesmos pesquisadores também relataram que nanopartículas contendo baixas doses de antimonial pentavalente penetraram diretamente nas células aumentando a concentração local da droga, um fator importante para prevenir resistência parasitária e toxicidade pela droga (FRANCO et al., 2016). Em 2017, Abamor e colaboradores usaram nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) combinado com antimoníato de meglumina (MA) em concentrações não tóxicas e os resultados mostraram que a combinação de TiO₂ e antimoníato de meglumina foram altamente eficazes contra promastigotas e amastigotas de *L. (L.) tropica*, reduzindo a atividade metabólica dos parasitos em até 20 vezes, enquanto a aplicação de MA sozinha não mostrou qualquer efeito inibitório. Além disso, as formulações de nanopartículas de TiO₂ e antimoníato de meglumina também foram capazes de induzir a morte celular programada dos parasitos, estimularam a produção de NO pelos macrófagos e curaram lesões cutâneas de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) tropica* com sucesso (ABAMOR et al., 2017).

Além da aplicação das nanopartículas para o carreamento de drogas, outras abordagens têm sido investigadas utilizando nanopartículas de metal e óxido de metal. Sazgarnia e colaboradores mostraram redução da viabilidade de promastigotas de *L. (L.) major* incubadas por 2 horas com nanopartículas de ouro (AuNPs) seguida da irradiação com microondas na frequência de 2450 Hz (SAZGARNIA et al., 2013). Estes autores também demonstraram redução da carga parasitária em células J774 infectadas com *L. (L.) major* e incubadas com nanopartículas de ouro (AuNPs) após irradiação nas condições previamente citadas (SAZGARNIA et al., 2013). Jebali e Kazemi também observaram que a incubação de

promastigotas com nanopartículas de prata (AgNPs) e ouro (AuNPs), bem como com nanopartículas dióxido de titânio (TiO₂), óxido de zinco (ZnO) e óxido de magnésio (MgO) seguido da irradiação por 1 hora com luz ultravioleta (200-300 nm, 8 watts) e infravermelha (800-1400 nm, 8 watts) ocasionou diminuição da capacidade proliferativa, bem como da infectividade de promastigotas de *L. (L.) major* (JEBALI & KAZEMI, 2013). Neste mesmo estudo, também foi verificado redução do índice de infecção em macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major* incubados com nanopartículas de ouro, prata, TiO₂, ZnO e MgO após 1 hora de irradiação com luz ultravioleta e infravermelha nos comprimentos de onda anteriormente especificados (JEBALI & KAZEMI, 2013). Ainda foi observada redução da viabilidade de promastigotas de *L. (L.) tropica* após a incubação com nanocompósitos de óxido de zinco (ZnO) na presença de fonte de luz (NAZIR et al., 2019). Em 2014, um estudo também mostrou que macrófagos humanos, infectados com *L. (L.) tropica*, tratados com 0,1 µg/mL de nanopartículas de ZnO modificadas com prata (Ag) e com posterior exposição por 15 minutos a luz solar apresentaram viabilidade reduzida das amastigotas intracelulares (NADHMAN et al., 2014).

Além de contribuírem para a diminuição da viabilidade parasitária por atuarem como termossensibilizantes na hipertermia ou fotossensibilizantes na terapia fotodinâmica, as nanopartículas de metal e de óxido de metal também tem demonstrado ação anti-*Leishmania* direta. Em 2018, foi observado que o tratamento de macrófagos murinos infectados com *L. (L.) amazonensis* com nanopartículas biogênicas de prata (AgNp-bio) durante 24 horas diminuiu o percentual de células infectadas, bem como a média de parasitos por célula. Essa diminuição foi acompanhada pela redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) pelas células infectadas (FANTI et al., 2018). Também já foi verificado que nanopartículas de prata e ácido tânico (AgNPs-TA) inibiu o crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (LOPES et al., 2018). Bafghi e colaboradores também mostraram que a incubação de promastigotas de *L. (L.) major* com nanopartículas de óxido de magnésio (MgO) e óxido de magnésio coberto com glicose (MONPCG) por 24, 48 e 72 horas reduziu a viabilidade dos parasitos. Esse decréscimo foi seguido pela redução da expressão do gene *GP63* e *CPB* (BAFGHI et al., 2015). Ainda foi observado que o tratamento por 24 horas com nanopartículas de prata (AgNPs) diminuiu o índice de infecção de células J774 infectadas com *L. (L.) tropica* (ALLAHVERDIYEV et al., 2011). As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) também reduziram a viabilidade de promastigotas de *L. (L.) major*. Essa morte aumentada dos parasitos foi relacionada a indução do apoptose das leishmanias pelas nanopartículas de ZnO

(DELAVARI et al., 2014). Após 24 e 48 horas de incubação com as nanopartículas de ZnO também houve redução do número médio de amastigotas de *L. (L.) major* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (DELAVARI et al., 2014).

1.7 As nanopartículas de óxido de ferro no contexto da leishmaniose tegumentar

Os efeitos de nanopartículas de óxido de ferro sobre espécies causadoras de leishmaniose tegumentar também têm sido investigados. O óxido de ferro ocorre abundantemente na natureza e apresenta diferentes formas e propriedades magnéticas. As principais formas são a magnetita (Fe_3O_4), a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e a hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (CAMPOS et al., 2015). Em laboratório foram desenvolvidos muitos métodos para se obter óxidos de ferro em escalas nanométricas para aplicação em distintas áreas tecnológicas. Os métodos de produção comumente utilizados incluem co-precipitação, síntese sol-gel, microemulsão e decomposição termal (SHENG-NAN et al., 2014; CAMPOS et al., 2015). Cada técnica apresenta vantagens e desvantagens e permite a produção de nanopartículas com tamanhos variando entre 4 a 200 nm (ALI et al., 2016). As nanopartículas de óxido de ferro contendo magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) são as mais comumente empregadas em aplicações biomédicas devido a suas propriedades superparamagnéticas, biocompatibilidade, baixo custo e baixa toxicidade (CAMPOS et al., 2015; KHATAMI et al., 2017; SEDDIGHI et al., 2017).

As nanopartículas de óxido de ferro tendem a aglomerar devido à alta atração magnética entre as partículas, a força de van der Waals e a alta energia de superfície. Consequentemente, o sistema reticuloendotelial ingere e elimina as nanopartículas aglomeradas. Contudo, a entrada de grande quantidade de ferro no meio intracelular é tóxica para as células (ALI et al., 2016). Tais problemas podem ser evitados pelo recobrimento das nanopartículas de óxido de ferro tornando-as mais hidrofílicas, compatíveis com os bioambientes e funcionalizadas. Diversas coberturas têm sido empregadas com as nanopartículas de óxido de ferro tais como ouro (Au), dióxido de silício (SiO_2), óxido de tântalo (TaO_x), cobertura de carbono, surfactantes como o oleato de sódio, carboximetilcelulose de sódio e dodecilamina, bem como polímeros, como poli(ácido D, L-láctico-co-glicólico), poli(N-isopropilacrilamida), polietilenoglicol, poli(vinilpirrolidona), poli(etileno-co-vinil acetato), dextranos, dendrímeros, entre outros. O tipo de cobertura empregado nas nanopartículas de óxido de ferro variará em função de sua aplicação biológica (SHENG-NAN et al., 2014; ALI et al., 2016).

Para verificar o efeito de nanopartículas de óxido de ferro sobre as leishmanias, Berry e colaboradores submeteram amastigotas axênicas de *L. (L.) mexicana* ao tratamento com 0,2

mg/mL de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) seguido da hipertermia pela aplicação de campo magnético alternante de 30 mT, frequência de 452 KHz, por 40 min e verificaram diminuição da viabilidade dos parasitos (BERRY et al., 2018). Também foi observada diminuição da viabilidade de promastigotas de *L. (L.) major* quando incubadas com nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) por 72 horas, com um IC50 de 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (KATHAMI et al., 2017). Em 2017, Mendonça averiguou o efeito leishmanicida de nanopartículas de maghemita, revestidas com substâncias atóxicas e biocompatíveis (ácido glicurônico e frutose), associadas à hipertermia por ondas curtas. Os ensaios *in vitro* indicaram um efeito leishmanicida quando as nanopartículas puras ou revestidas foram expostas ao campo magnético alternado de ondas-curtas (60nm) por 30 minutos, o que gerou hipertermia e conseqüente morte de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MENDONÇA., 2017). O tratamento por 72 horas com nanopartículas de maghemita (Fe_2O_3) também foram capazes de reduzir a viabilidade de promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (L.) tropica*, com uma IC50 de 17,2 and 16,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada forma parasitária (KHALIL et al., 2017). Hassan e colaboradores também mostraram que nanopartículas de maghemita (Fe_2O_3) sintetizadas com extratos floral de *Callistemon viminalis* apresentaram toxicidade para promastigotas e amastigotas de *L. (L.) tropica*, reduzindo sua viabilidade (HASSAN et al., 2018).

Foi verificado ainda que o tratamento de células J774-A1 infectadas por *L. (L.) major* com nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) cobertas ou não com piroctana olamina (PO) por dois dias diminuiu significativamente o índice de infecção dos macrófagos e essa diminuição foi seguida do aumento da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos. Neste mesmo trabalho, os autores verificaram que o tratamento com nanopartículas de magnetita coberta ou não por PO diminuiu o tamanho de lesões cutâneas, bem como a carga parasitária em tais lesões em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major* (ALBALAWI et al., 2021).

Assim, em conjunto, os estudos com nanopartículas de óxido de ferro apontam que tais nanopartículas apresentam o potencial para serem empregadas no tratamento da leishmaniose tegumentar. Nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina têm sido utilizadas para recuperação de DNA (Medina-lhamas et al., 2014). Contudo, o seu potencial antiparasitário ainda não havia sido investigado. Considerando que nanopartículas óxido de ferro, dentre as quais encontram-se as de maghemita, tem apresentado capacidade leishmanicida, foi hipotetizado que as nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina também seriam capazes de induzir a morte das leishmanias. Esse aspecto aliado a necessidade anteriormente mencionada da ampliação do arsenal terapêutico contra as

leishmanias e de novas alternativas com menor toxicidade para o tratamento dos portadores de leishmaniose levou a realização deste trabalho com o objetivo de avaliar o efeito *in vitro* de concentrações não citotóxicas de nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) encapsuladas com polianilina sobre a infecção de macrófagos infectados com espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar. Paralelamente, foi investigado se tal nanopartículas seriam capazes de modular a capacidade pró-inflamatória e microbicida de macrófagos por meio da dosagem dos níveis de óxido nítrico (NO) e de citocinas (IL-1, IL-8, IL-6, TNF- α , IL-12p70 e IL-10) em sobrenadante de cultura. Foram avaliados ainda o efeito do tratamento com as nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) encapsuladas com polianilina sobre a viabilidade das amastigotas intracelulares, bem como foi quantificado o percentual de macrófagos interagindo com tais nanopartículas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento *in vitro* com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre macrófagos infectados com espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar.

2.2 Objetivos específicos

- a) Analisar o efeito *in vitro* do tratamento com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre o índice de infecção de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*;
- b) Determinar o efeito *in vitro* do tratamento com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*;
- c) Verificar o efeito *in vitro* do tratamento com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre a produção de citocinas por macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*;

d) Mensurar o efeito *in vitro* do tratamento com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre a aderência de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*;

e) Investigar o efeito *in vitro* do tratamento com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre a viabilidade de parasitos intracelulares obtidos a partir de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*.

f) Quantificar o efeito *in vitro* do tratamento com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre a interiorização e/ou adesão de nanopartículas à macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*;

avaliar

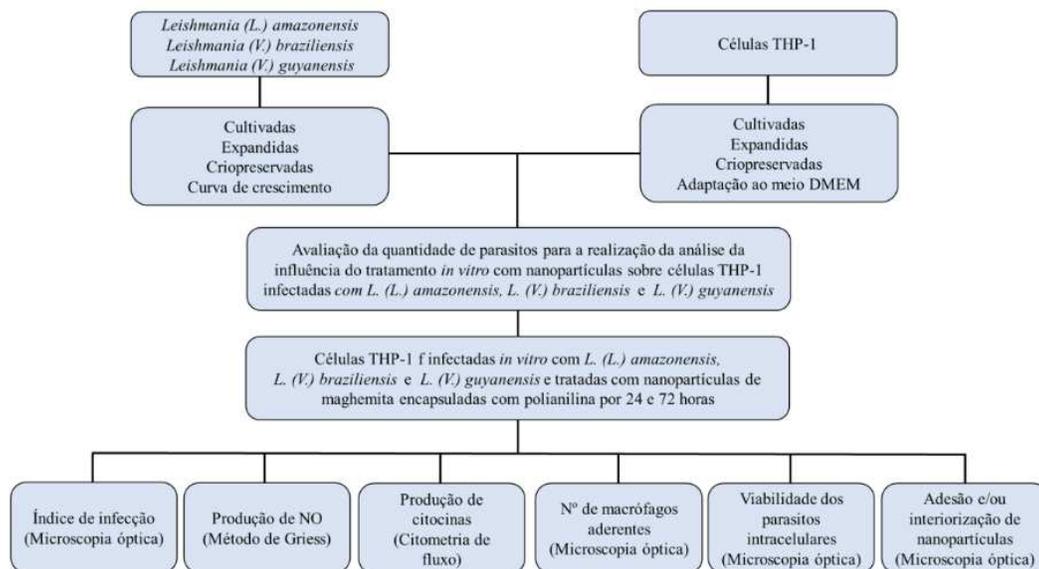
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Este estudo seguiu as normas éticas em pesquisa preconizadas pela legislação brasileira. Foi desenvolvido pelo Grupo de Imunologia Celular e Molecular, do Instituto René Rachou - Fiocruz/Minas. Nesta pesquisa foi avaliado o efeito do tratamento *in vitro* com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre macrófagos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis*. Inicialmente, os parasitos e as células THP-1 foram cultivados, expandidos e criopreservados. Em seguida, foi realizada a determinação do crescimento máximo das promastigotas por meio da curva de crescimento. Paralelamente, as células THP-1 foram adaptadas para crescerem em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM). Logo após, foi efetuado um ensaio preliminar para estabelecer a melhor quantidade de parasitos para a análise da influência do tratamento *in vitro* com nanopartículas sobre células THP-1 infectadas com as distintas espécies de *Leishmania*. Após esta etapa, foram executados os ensaios destinados a alcançar os objetivos propostos neste estudo. Para isto, as células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos pela adição de 12-miristato 7-acetato de forbol (PMA) ao meio de cultura. Logo após, as células foram infectadas

com as referidas espécies de *Leishmania* e tratadas com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina por 24 e 72 horas. Após o tratamento, os sobrenadantes de cultura foram coletados e o índice de infecção, bem como o número de macrófagos aderentes às lamínulas e o percentual de células apresentando interiorização e/ou aderência as nanopartículas foram avaliados por microscopia óptica. Nos sobrenadantes de cultura foram mensurados os níveis de óxido nítrico (NO) e de citocinas. Os níveis de NO foram determinados pelo método de Griess. Já os níveis de citocinas foram avaliados por citometria de fluxo. Também foi analisada a viabilidade dos parasitos intracelulares por microscopia óptica. O diagrama geral do estudo encontra-se descrito na Figura 7.

Figura 7- Delineamento experimental do estudo



Fonte: elaborada pelo autor

3.2 Nanopartículas

A produção das nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina foi efetuada no Laboratório de Polímeros não Convencionais - LPNC, do Departamento de Física, da Universidade Federal de Pernambuco, conforme o método de co-precipitação descrito por Medina-Ihama et al., 2014. Para utilização nos ensaios *in vitro*, as nanopartículas foram suspensas em água tipo I na concentração de 3 mg/mL e submetidas ao procedimento de autoclavagem, a 121°C, 1 atm, por 18 minutos.

3.3 Parasitos

Foram utilizadas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) obtidas do banco de criopreservação do Grupo de Imunologia Celular e Molecular/FIOCRUZ-MG e promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) e *Leishmania (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), obtidas do banco de criopreservação do Grupo Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias/FIOCRUZ-MG. Os parasitos foram cultivados em garrafas de cultura de 25 cm² (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) e incubados em estufa B.O.D (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA), a 26°C em meio Schneider (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) contendo 20% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Massachusetts, EUA) inativado pelo calor e 40 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) (ALVES EAR, 2013; ALVES et al., 2015). Quando o crescimento das promastigotas atingiu o nível máximo, os parasitos foram lavados com salina tamponada com fosfato (PBS) 1x, pH 7,2 e centrifugados a 700 xg, por 10 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os parasitos foram suspensos em meio Schneider contendo 20% de SFB, 40 µg/mL de gentamicina e 7,5% de glicerol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Logo após, os parasitos diluídos no meio de criopreservação foram distribuídos em criotubos de 0,5 mL e congelados a -80°C, por 24 horas. Após isto, os criotubos foram transferidos para botijões de nitrogênio líquido com a finalidade da criação de um estoque de parasitos para a realização dos ensaios de infecção das células THP-1.

3.4 Descongelamento dos parasitos

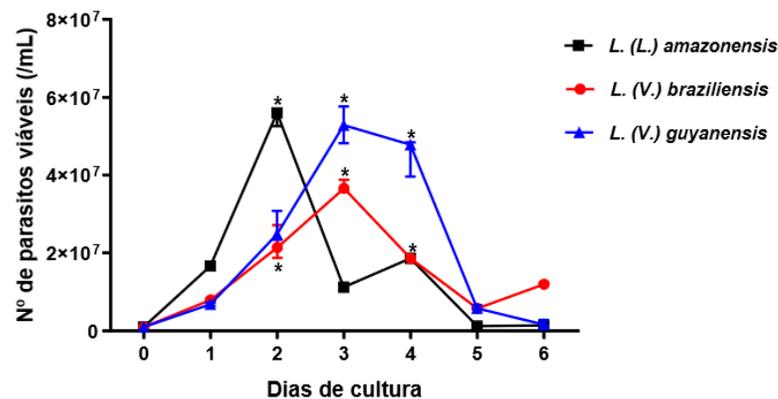
Para a realização dos ensaios em que foram utilizadas leishmanias, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e colocados em banho-maria a 37 °C para descongelamento rápido dos parasitos. Em seguida, as promastigotas foram suspensas em meio Schneider contendo 20% de SFB inativado pelo calor e 40 µg/mL de gentamicina e mantidas nas

condições de cultura descritas no item 3.3. Após 6 horas, uma alíquota dos parasitos foi diluída (1:20) em PBS 1x, pH 7,2 e o número de promastigotas móveis foi contado em câmara de Neubauer utilizando microscópio óptico (Leica, Wetzlar, Alemanha) e em aumento de 400x. Logo após, os parasitos foram lavados com PBS 1x, pH 7,2 e centrifugados a 700 xg, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os parasitos suspensos em meio Schneider contendo 20% de SFB inativado pelo calor e 40 µg/mL de gentamicina de modo que o meio de cultura contivesse 1×10^6 promastigotas por mL. Posteriormente, cerca de 5 mL de meio de cultura contendo os parasitos foram distribuídos em garrafas de cultura de 25cm² (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) e as garrafas foram mantidas em estufa B.O.D (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA), a 26°C por dois dias para a espécie *L. (L.) amazonensis* e por três dias para as espécies *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis*. Após os tempos de incubação mencionados, os parasitos foram utilizados para os ensaios de infecção das células THP-1.

3.5 Curva de crescimento das formas promastigotas

A curva de crescimento foi realizada para determinar o tempo que as promastigotas levavam para atingir o crescimento máximo. Para tal, culturas em triplicatas das referidas espécies de *Leishmania* foram mantidas nas condições de cultura descritas no item 3.3. Cada curva foi iniciada com 1×10^6 promastigotas por mL de meio Schneider contendo 20% de SFB inativado pelo calor e 40 µg/mL de gentamicina. Diariamente, uma alíquota de 10 µL foi retirada das culturas e diluída (1:20) em PBS 1x, pH 7,2 e o número de parasitos móveis por mL de meio de cultura foi quantificado durante 6 dias, em câmara de Neubauer, utilizando microscópio óptico (Leica, Wetzlar, Alemanha) e em aumento de 400x. O crescimento máximo foi alcançado em 2 dias para a espécie *Leishmania (L.) amazonensis*, e em 3 dias para as espécies *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis* (figura 8).

Figura 8 - Curvas de crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis*



Aproximadamente 1×10^6 parasitos móveis por mL foram suspensos em meio Schneider contendo 20% de SFB e $40 \mu\text{g/mL}$ de gentamicina e incubados a 26°C . O número de promastigotas móveis foi contado, em câmara de Neubauer, uma vez por dia durante seis dias. Os dados estão apresentados como mediana com intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn. (*) $p < 0,05$. **Fonte:** elaborada pelo autor

3.6 Obtenção e criopreservação das células THP-1

A linhagem de monócitos humanos THP-1 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil). As células foram inicialmente cultivadas nas condições preconizadas pelo Banco de Células (<http://bcry.org.br/celula/Thp1-Peripheral-Blood-Leukemia-Human>). Resumidamente, as células THP-1 foram colocadas em garrafas de cultura de 75 cm^2 (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) contendo meio RPMI 1640 (Gibco, Massachusetts, EUA) suplementado com L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sódio 1 mM, 4500 mg/L de glicose, 1500 mg /L de bicarbonato de sódio, 10% de SFB (Gibco, Massachusetts, EUA) inativado pelo calor e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, Massachusetts, EUA) e incubadas em ambiente umidificado, a 37°C e 5 % de CO_2 . Após a expansão, o número de células viáveis foi contado após diluição (1:20) em azul de tripan (Gibco, Massachusetts, EUA) usando câmara de Neubauer. O número de células THP-1 viáveis por mL de meio de cultura foi obtido multiplicando-se o número médio de células viáveis nos 4 quadrantes de leucócitos por 20 (fator de diluição) e, subsequentemente, por 10^4 (fator de correção para mL). Após a contagem, as células THP-1 foram lavadas com PBS 1x, pH 7,2 e centrifugadas a 900 rpm, por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas ($2 \times 10^6/\text{mL}$) em SFB inativado pelo calor contendo 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Logo em seguida, as células em meio de criopreservação foram transferidas para criotubos de 0,5 mL

e armazenadas a -80°C , por 24 horas. Posteriormente, os criotubos foram colocados em botijões de nitrogênio líquido com a finalidade da criação de um estoque de células para a realização da adaptação ao meio DMEM.

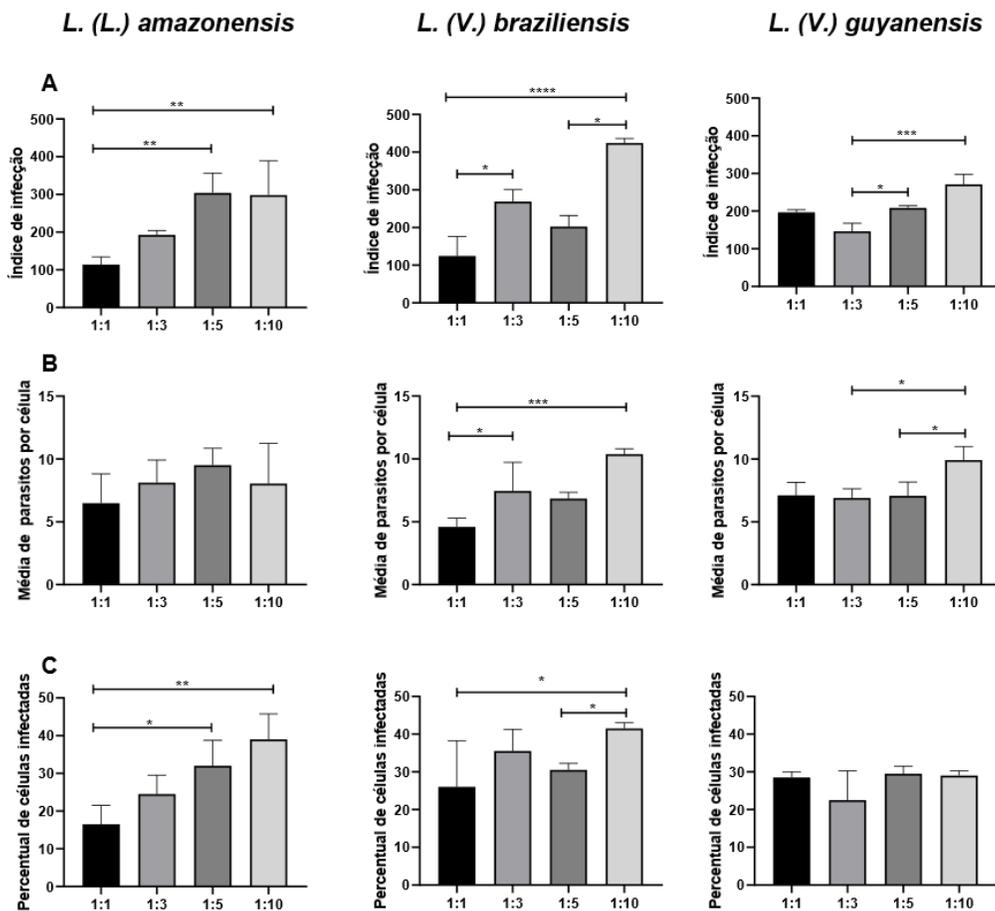
3.7 Cultivo e manutenção das células THP-1

As células THP-1 criopreservadas foram descongeladas e gradualmente adaptadas para crescer em meio DMEM (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Gibco, Massachusetts, EUA) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco). Para a realização da adaptação foram realizadas quatro passagens. Na primeira passagem, as células cultivadas em meio original (descrito no tópico 4.7) foram divididas na proporção de 1:2 em duas garrafas de cultura 75 cm^2 para a obtenção de uma garrafa de cultura contendo o meio de cultura original (garrafa controle) e uma garrafa de cultura contendo 75% do meio original e 25% de DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos. Na segunda passagem, 50% das células em adaptação foram transferidas para uma nova garrafa de cultura 75 cm^2 contendo 50% do meio original e 50% do DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos. Na terceira passagem, 50% das células em adaptação foram transferidas para uma nova garrafa de cultura 75 cm^2 contendo 12,5% do meio original e 87,5% de DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos. Na quarta e última passagem, as células em adaptação foram transferidas para uma garrafa de cultura contendo 100% DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos. Durante o processo de adaptação, foi realizada a comparação da taxa de crescimento e da morfologia entre as culturas originais e em adaptação e nenhuma alteração nos parâmetros avaliados foi observada. As células adaptadas ao meio DMEM contendo 10% de SFB foram criopreservadas nas mesmas condições descritas no tópico 3.6. Quando necessário, as células foram descongeladas rapidamente e suspensas (6×10^5 células/mL) em meio DMEM contendo 10% de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina. Posteriormente, foram colocadas em garrafas de cultura de 75 cm^2 e incubadas em ambiente umidificado, a 37°C e 5% de CO_2 . Semanalmente foi realizada a quantificação do número de células no meio de cultura, bem como a análise da viabilidade celular seguida da transferência para um novo meio de cultura e as células THP-1 foram utilizadas para os ensaios de infecção quando o meio continha aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células por mL.

3.8 Avaliação da influência da proporção célula/parasitos sobre o índice de infecção

Com a finalidade de estabelecer a melhor quantidade de parasitos para a realização da análise da influência do tratamento *in vitro* com as nanopartículas sobre os macrófagos infectados com leishmanias, as células THP-1 foram descongeladas e expandidas conforme descrito no tópico 3.7. Após se multiplicarem até cerca de $1,5 \times 10^6$ de células por mL de cultura, foram induzidas a se tornarem semelhantes a macrófagos e aderentes pela adição de 12-miristato 7-acetato de forbol (PMA) ao meio de cultura. Resumidamente, células THP-1 (3×10^5 células) em 500 μ L meio DMEM contendo 10% de SFB e 320 nM de PMA, foram distribuídas em triplicata em placas de 24 poços (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) contendo lamínulas circulares de 13 mm (Kasvi, Paraná, Brasil), e incubadas a 37°C, em atmosfera umidificada e 5% de CO₂ (PONTE-SUCRE et al 2017). Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS 1x, pH 7,2, a 37°C e os poços foram preenchidos com 1,0 mL de meio DMEM sem PMA. Em seguida, as células aderentes foram incubadas por 48 horas, a 37°C, em atmosfera umidificada e 5% de CO₂. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com meio DMEM contendo promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* em distintas proporções (1:1, 1:3, 1:5 e 1:10) por 6 horas, a 37°C, em atmosfera umidificada e 5% de CO₂. Finalizado o tempo de incubação, os parasitos não internalizados foram removidos pela lavagem com PBS 1x, pH 7,2, a 37°C e os poços foram novamente preenchidos com 1,0 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina. Após 24 horas, em ambiente umidificado, a 37°C e 5% de CO₂, os poços foram lavados com PBS 1x, pH 7,2, a 37°C e em seguida as células foram coradas com kit de coloração hematológica (Instant-Prov; Newprov, Paraná, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante (<https://silo.tips/download/instant-prov-conjunto-de-corantes-para-coloraao-diferencial-rapida-em-hematologi>). A seguir, as lamínulas circulares foram cuidadosamente removidas dos poços com auxílio de uma pinça e montadas sobre lâminas de vidro de microscopia com resina sintética (Entellan®; Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram avaliadas 200 células utilizando microscópio óptico (Olympus CBA, Tóquio, Japão) e em aumento de 1000x. Após as análises, o índice de infecção foi calculado multiplicando-se a média de parasitos por macrófago pelo percentual de macrófagos infectados. Na figura 9 encontra-se o resultado da avaliação da influência da proporção célula/parasitos sobre o índice de infecção. Como o maior índice de infecção para as três espécies de *Leishmania* foi conseguido utilizando a proporção 1:10, ficou estabelecido que os ensaios com as nanopartículas seriam realizados com esta proporção de célula/parasitos.

Figura 9- Influência da proporção célula/parasitos sobre o índice de infecção em células THP-1.



Linha A: Índice de infecção (\bar{X} parasitos por macrófago x % macrófagos infectados). Linha B: Média de parasitos por célula (n° total de parasitos/ n° total de macrófagos infectados). Linha C: Percentual de células infectadas (n° total de macrófagos infectados x 100 / n° total de macrófagos contados). Os dados estão apresentados como mediana com intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn. (*) p <0,05; (**) p <0,01; (***) p <0,001; (****) p <0,0001. **Fonte:** elaborada pelo autor

3.9 Determinação do índice de infecção

Células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos pela incubação com 320 nM de PMA como descrito no item 3.8. Logo em seguida, foram incubadas com meio DMEM contendo ou não 3×10^6 promastigotas por mL das referidas espécies de *Leishmania* por 6 horas, a 37°C, em ambiente umidificado e 5% de CO₂. Após o período de incubação, foram lavadas com PBS 1x, pH 7,2, a 37°C e os poços preenchidos com meio DMEM sem parasitos contendo ou não 0,06

mg/mL (concentração não citotóxica para as células THP-1 que foi determinada em ensaios prévios para a realização de outro projeto) utilizando nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 e 72 horas, a 37°C, em atmosfera umidificada e 5% de CO₂. Logo após, os sobrenadantes de cultura foram coletados para determinação dos níveis de óxido nítrico e de citocinas. Após a coleta do sobrenadante, as células foram coradas com kit de coloração hematológica (Instant-Prov; Newprov, Paraná, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante (<https://silo.tips/download/instant-prov-conjunto-de-corantes-para-coloracao-diferencial-rapida-em-hematologi>). A seguir, as lâminas circulares foram cuidadosamente removidas dos poços com auxílio de uma pinça e montadas sobre lâminas de vidro de microscopia com resina sintética (Entellan®; Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram avaliadas 200 células utilizando microscópio óptico (Olympus CBA, Tóquio, Japão) e em aumento de 1000x. Após as análises, o índice de infecção foi calculado multiplicando-se a média de parasitos por macrófago pelo percentual de macrófagos infectados.

3.10 Determinação dos níveis de óxido nítrico

Os níveis de óxido nítrico (NO) foram quantificados nos sobrenadantes obtidos das culturas utilizadas para a avaliação do índice de infecção conforme descrito no item 3.9. Também foram utilizados sobrenadantes de cultura de células incubadas apenas com DMEM contendo ou não nanopartículas obtidas nas mesmas condições descritas para as células destinadas à análise do índice de infecção. Os níveis de NO foram avaliados indiretamente por meio da mensuração dos níveis de nitrito (NO₂⁻) utilizando o método de Griess, como descrito por GREEN et al., 1981. Resumidamente, 100 µL de cada amostra, em triplicata, foram adicionados a placas de 96 poços, de fundo chato (Biofil, Guangzhou, China) e incubados com volume igual de reagente de Griess [1% de sulfanilamida e 0,1% de N-(1-naftil) etilenodiamina di-hidroclorato em 2,5% de ácido fosfórico H₃PO₄]. Após 10 minutos, a absorbância foi avaliada no leitor de microplacas SpectraMax 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA) utilizando comprimento de onda de 540 nm. Para determinação da concentração de NO₂⁻ contida em cada poço, foi feita, paralelamente, uma curva padrão com nitrito de sódio (NaNO₂) diluído em meio de cultura nas concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,12 µM e 1,56 µM. Os resultados foram expressos em µM.

3.11 Dosagem dos níveis de citocinas

Os sobrenadantes obtidos como descrito no item 3.9 foram armazenados a -80°C até o momento da dosagem dos níveis de citocinas e foram descongelados apenas uma vez. Os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-12p70 e IL-10 nos sobrenadantes de cultura foram quantificados utilizando o BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit (BD Biosciences, Califórnia, EUA) com adaptações das instruções do fabricante (<https://wwwbdbiosciences.com/ds/pm/others/23-11112.pdf>). Resumidamente, após o descongelamento em gelo, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos, a 10.000 rpm e em temperatura ambiente. Em seguida, 25 μL /poço das amostras foi transferido para placa de 96 poços com fundo em U (Falcon, New York, EUA), e as placas foram armazenadas a temperatura de 2 a 8°C por aproximadamente 12 horas. Após esse período, foram adicionados 15 μL do mix de beads preparado a partir dos reagentes Human TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-12p70 e IL-10 Capture Beads e, posteriormente, 17 μL de Human Inflammatory Cytokine PE Detection Reagent. Logo após, as placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas por 3 horas, a temperatura ambiente, sob agitação no agitador de microplacas NI-1154 (Nova instruments, São Paulo, Brasil). Após período de incubação, foram adicionados 160 μL de Wash Buffer em todos os poços e as placas centrifugadas por 10 minutos, a 400 xg, 18°C . Finalmente, o sobrenadante foi descartado e as beads ressuspensas em 200 μL de Wash Buffer. Os dados foram adquiridos utilizando o citômetro de fluxo BD FACSVersé (BD Biosciences, Califórnia, EUA) e os dados foram analisados usando o software BD FCAP V3.0 (BD Biosciences). Para a determinação da concentração de TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-12p70 e IL-10 contida em cada sobrenadante, foi feita, paralelamente, uma curva padrão com citocinas liofilizadas utilizando o reagente Human Inflammatory Cytokine Standards diluído em Solução G (Assay Diluent) nas concentrações de 5000 pg/mL, 2500 pg/mL, 1250 pg/mL, 625 pg/mL, 312 pg/mL, 156 pg/mL, 78 pg/mL, 39 pg/mL, 19 pg/mL. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.12 Análise do número de células aderidas às lamínulas

Para excluir a influência nos resultados de possíveis efeitos deletérios da infecção pela *Leishmania* e/ou das nanopartículas sobre as células THP-1 foi determinado o número de células aderidas às lamínulas. Tal análise foi efetuada com as lamínulas confeccionadas para a avaliação do índice de infecção. Além disso, também foram produzidas lamínulas com células incubadas apenas com DMEM contendo ou não nanopartículas empregando-se as mesmas condições de cultura descritas anteriormente para a obtenção das lamínulas destinadas a análise

do índice de infecção. Foram contadas as células em 10% da área das lamínulas utilizando microscópio óptico (Olympus CBA, Tóquio, Japão) e com aumento de 400x. O número total de células THP-1 em cada lamínula foi calculado multiplicando-se o número de células contido em 10% da área da lamínula por 10 (ALVES, 2013, ALVES et al., 2015).

3.13 Análise da viabilidade dos parasitos intracelulares

A análise da viabilidade dos parasitos intracelulares foi realizada como descrito por KHOURI et al., 2009. Resumidamente, células THP-1 infectadas e tratadas ou não com as nanopartículas obtidas como descrito no item 3.9 foram lavadas com PBS 1x, pH 7,2, a 37°C. Logo em seguida, os poços foram preenchidos com meio Schneider (1 mL/poço) suplementado com 20% de SFB. Posteriormente, as células foram incubadas a 26°C e a cada 24 horas foi determinado o número de promastigotas que proliferaram a partir das amastigotas intracelulares que estavam viáveis. Diariamente, uma alíquota de 10 µL foi diluída (1:20) em PBS, 1x, pH 7,2 e o número de promastigotas móveis foi quantificado utilizando câmara de Neubauer, utilizando microscópio óptico (Olympus CBA, Tóquio, Japão) e com aumento de 400x. Para as células infectadas e tratadas por 24 horas com as nanopartículas, a quantificação do número de promastigotas móveis foi realizada por 10 dias. Já para as células infectadas e tratadas com as nanopartículas por 72 horas, a quantificação do número de promastigotas móveis foi realizada por 14 dias. Os resultados obtidos foram expressos como número de promastigotas por µL de meio Schneider.

3.14 Avaliação do percentual de células THP-1 com nanopartículas interiorizadas/aderidas

Para analisar o nível de interação das células THP-1 com as nanopartículas foi determinado o percentual de células que apresentavam interiorização e/ou adesão as nanopartículas. Esse ensaio foi adaptado a partir dos ensaios de fagocitose descritos por CARNEIRO et al., 2012. Para esta avaliação foram empregadas as lamínulas utilizadas para a análise do número de células aderidas às lamínulas. Durante a análise foram contadas 200 células, em microscópio óptico (Olympus CBA, Tóquio, Japão) e com aumento de 1000x. Com os dados obtidos foi determinado o percentual de células contendo nanopartículas interiorizadas/aderidas

3.15 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e cada ensaio foi realizado seis vezes. Para a aplicação dos testes estatísticos, a distribuição dos dados foi previamente avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Para comparar duas amostras relacionadas com distribuição normal foi utilizado o teste t pareado. Para comparar duas amostras relacionadas com distribuição não normal foi utilizado o teste de Wilcoxon. Para comparar múltiplas amostras com distribuição normal foi utilizado o ANOVA seguido do teste de Tukey. Para comparar múltiplas amostras com distribuição não normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn. O Prism 8[®] software package (GraphPad Software, California, USA) foi utilizado para a realização das análises estatísticas. As diferenças foram consideradas significativas quando a probabilidade bicaudal da sua ocorrência devido ao acaso (erro tipo I) foi menor que 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Influência do tratamento *in vitro* com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre o índice de infecção em células THP-1 infectadas com *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*

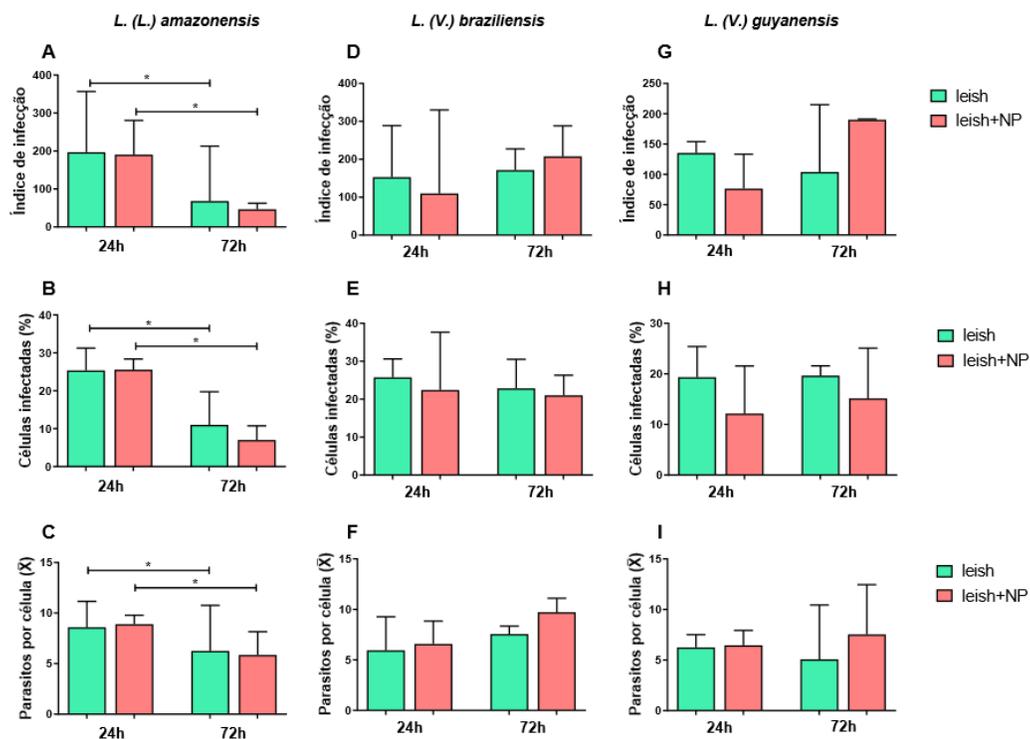
Quando analisamos os dados dos tempos 24 e 72 horas separadamente, observamos que o tratamento com nanopartículas não alterou o índice de infecção nas células THP-1 infectadas com *L. (L.) amazonensis* (figura 10A), bem como nas infectadas com *L. (V.) braziliensis* (figura 10D) e *L. (V.) guyanensis* (figura 10G). Isto deveu-se ao fato de o tratamento com as nanopartículas não ter modificado o percentual de células infectadas com *L. (L.) amazonensis* (figura 10B), *L. (V.) braziliensis* (figura 10E) e *L. (V.) guyanensis* (figura 10H). Também se relacionou com o fato de o tratamento com as nanopartículas não ter alterado a média de parasitos por célula nos ensaios com *L. (L.) amazonensis* (figura 10C), bem como nos ensaios com *L. (V.) braziliensis* (figura 10F) e *L. (V.) guyanensis* (figura 10I).

Já quando os tempos 24 e 72 horas foram comparados entre si, verificamos decréscimo no índice de infecção (figura 10A; $p = 0,031$, teste de Wilcoxon) no tempo 72 horas em relação ao tempo 24 horas nas células infectadas com *L. (L.) amazonensis*. Esse efeito foi independente do tratamento com as nanopartículas, já que tanto as células tratadas quanto as não tratadas com nanopartículas apresentaram redução no índice de infecção no tempo 72 horas em relação ao

tempo 24 horas. Tanto nas células tratadas quanto nas não tratadas com as nanopartículas, essa diferença no índice de infecção entre os distintos tempos de tratamento deveu-se a diminuição no percentual de células infectadas (figura 10B; $p=0,031$, teste de Wilcoxon), bem como da média de parasitos por célula (figura 10C; $p=0,031$, teste de Wilcoxon). Em contraste, o tempo de tratamento não modificou o índice de infecção das células THP-1 infectadas com *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* tratadas ou não com as nanopartículas.

Assim, observamos que o tratamento com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina não alterou o índice de infecção em células THP-1 infectadas com as distintas espécies de *Leishmania*. Verificamos também que ocorreu diminuição, tempo dependente, do índice de infecção em todas as culturas infectadas com *L. (L.) amazonensis*, mas tal redução não foi observada nas culturas infectadas com *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*. A diminuição no índice de infecção nas culturas infectadas com *L. (L.) amazonensis* deveu-se tanto à redução do percentual de células infectadas, bem como a diminuição da média de parasitos por célula.

Figura 10 - Índice de infecção em células THP-1 infectadas com *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* após incubação *in vitro* com 0,06 mg/mL de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina.



Em A, D e G: Índice de infecção (\bar{X} parasitos x % macrófagos infectados). Em B, E e F: Percentual de células infectadas (n° total de macrófagos infectados x 100 / n° total de macrófagos contados). Em C, F e I: Média de parasitos por célula (n° total de parasitos / n° total de macrófagos infectados). Os dados estão apresentados como mediana com intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Wilcoxon. leish = células infectadas com leishmanias, leish+NP = células infectadas com leishmanias e tratadas com nanopartículas. (*) $p < 0,05$. **Fonte:** elaborada pelo autor

4.2 Influência do tratamento *in vitro* com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre a produção de óxido nítrico por células THP-1 infectadas com *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*

Após a análise dos resultados, observamos que, no tempo 24 horas, não houve alteração nos níveis de NO nos sobrenadantes de cultura das células THP-1 infectadas com *L. (L.) amazonensis* (figura 11A), *L. (V.) braziliensis* (figura 11B) e *L. (V.) guyanensis* (figura 11C) e tratadas com nanopartículas em comparação com os níveis de NO nos sobrenadantes das demais culturas avaliadas.

Já no tempo 72 horas, houve aumento nos níveis de NO nos sobrenadantes de cultura das células THP-1 infectadas com *L. (V.) braziliensis* e tratadas com nanopartículas em comparação com os níveis de NO nos sobrenadantes das células tratadas apenas com as nanopartículas

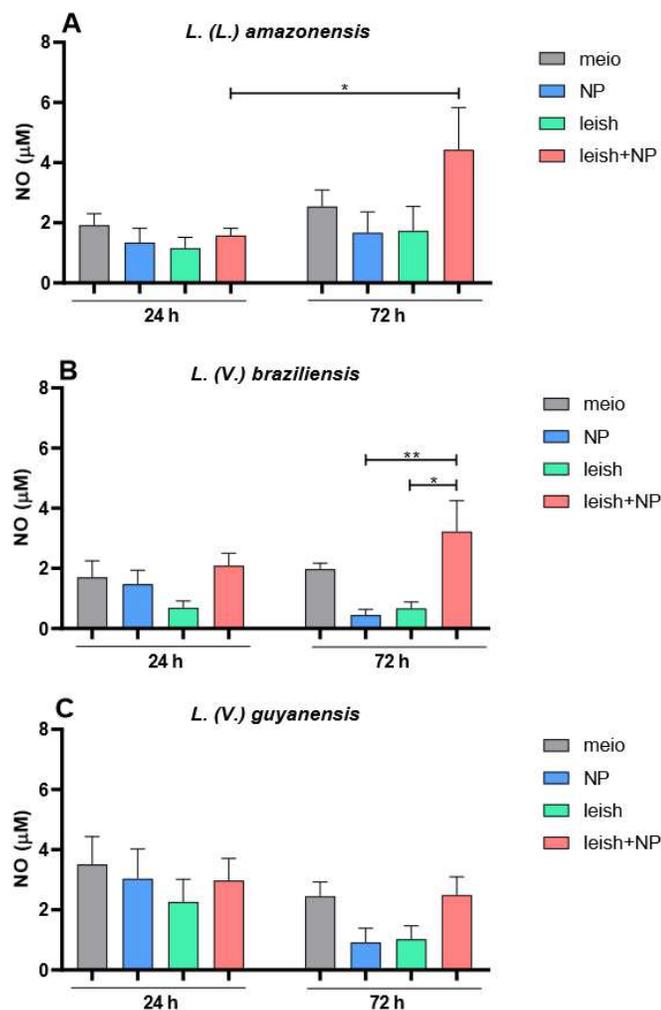
(figura 11B; $p=0,008$, ANOVA seguido do teste de Tukey) ou apenas infectadas com as leishmanias (figura 11B; $p=0,015$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Tal elevação não foi observada quando se comparou os níveis de NO nos sobrenadantes de cultura das células THP-1 infectadas com *L. (L.) braziliensis* e tratadas com nanopartículas com os níveis de NO nos sobrenadantes das células incubadas apenas com meio de cultura (figura 14B).

Diferentemente, no tempo 72 horas, não houve alteração nos níveis de NO nos sobrenadantes de cultura das células THP-1 infectadas com *L. (L.) amazonensis* (figura 11A) e *L. (V.) guyanensis* (figura 11C) e tratadas com nanopartículas em comparação com os níveis de NO nos sobrenadantes das demais culturas estudadas. Verificamos ainda que, tanto no tempo 24 quanto 72 horas, os sobrenadantes de cultura das células THP-1 tratadas apenas com as nanopartículas, bem como das células exclusivamente infectadas com as leishmanias apresentaram níveis de NO semelhantes aos das células incubadas apenas com o meio de cultura.

Quando os resultados dos tempos 24 e 72 horas foram comparados entre si, observamos níveis aumentados de NO nos sobrenadantes de cultura das células infectadas com *L. (L.) amazonensis* e tratadas com nanopartículas do tempo 72 horas em comparação com os sobrenadantes das células infectadas com *L. (L.) amazonensis* e tratadas com nanopartículas do tempo 24 horas (figura 11A; $p=0,041$, teste t pareado). Nas demais condições de cultura estudadas, os níveis de NO nos sobrenadantes de cultura do tempo 72 horas foram semelhantes aos níveis de NO nos sobrenadantes de cultura do tempo 24 horas.

Portanto, concluímos que o tratamento com as nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina promoveu aumento nos níveis de NO nas culturas de células THP-1 infectadas com *L. (L.) braziliensis*. As nanopartículas também ocasionaram aumento, tempo dependente, dos níveis de NO nas culturas infectadas com *L. (L.) amazonensis*. Contudo, tal tratamento não alterou os níveis de NO nas culturas infectadas com *L. (V.) guyanensis*. Por fim, também vimos que os níveis de NO nas culturas não foram alterados pelo tratamento com as nanopartículas isoladamente, bem como apenas pela infecção com as distintas espécies de *Leishmania*.

Figura 11. Produção de óxido nítrico por células THP-1 infectadas com *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* após tratamento *in vitro* com 0,06 mg/mL de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina.



Em A: *L. (L.) amazonensis*. Em B: *L. (V.) braziliensis*. Em C: *L. (V.) guyanensis*. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. A análise estatística foi realizada pelo ANOVA seguido do teste de Tukey, para comparação de mais do que dois grupos, e teste t pareado para comparação de dois grupos. meio = células controle incubadas apenas com meio de cultura, NP = células tratadas com nanopartículas, leish = células infectadas com leishmanias, leish+NP = células infectadas com leishmanias e tratadas com nanopartículas. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. **Fonte:** elaborada pelo autor

4.3 Influência do tratamento *in vitro* com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre a produção de citocinas por células THP-1 infectadas com *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*

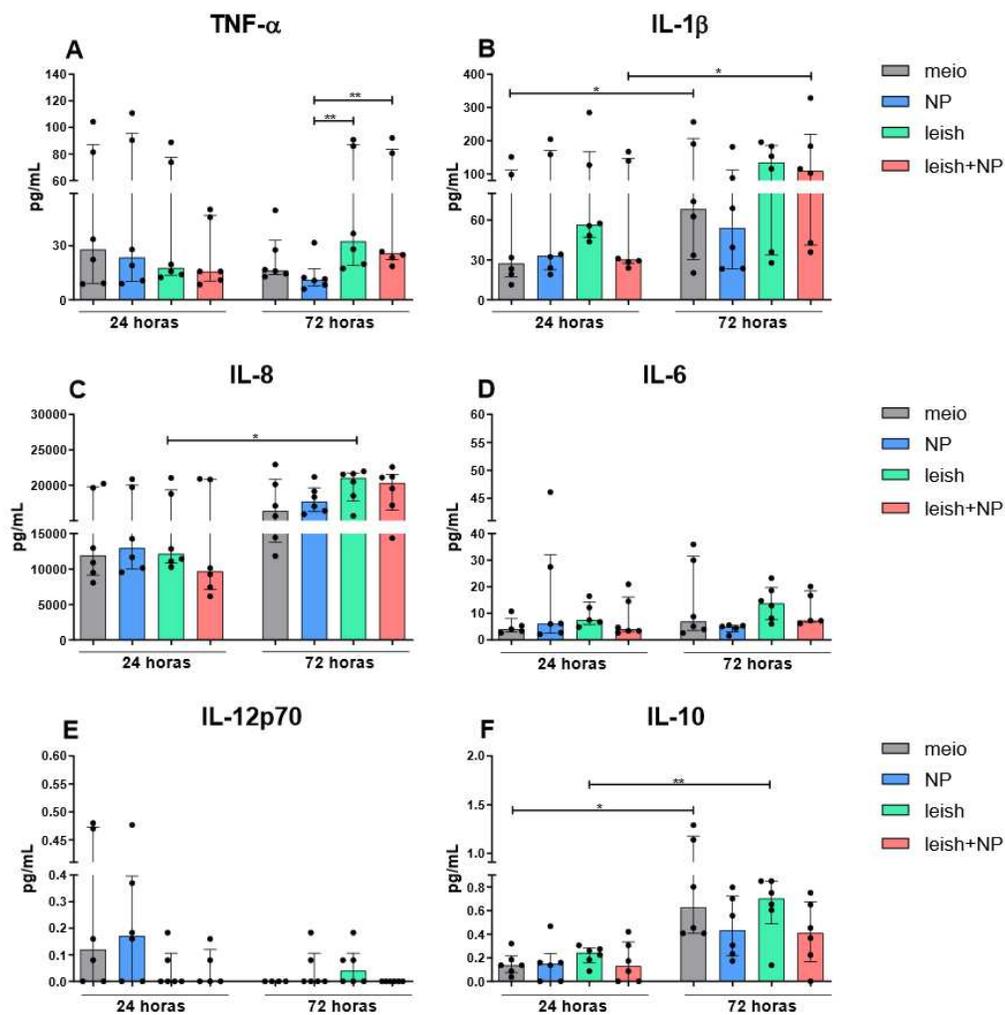
Nos experimentos envolvendo *L. (L.) amazonensis*, verificamos que, no tempo 24 horas, não houve alteração nos níveis de nenhuma citocina nos sobrenadantes de cultura das células infectadas e tratadas com nanopartículas (figura 12) em comparação com as demais condições de cultura analisadas. No tempo 24 horas, o tratamento ou a infecção isolada (figura 12) também não alterou os níveis de citocinas nos sobrenadantes de cultura das células THP-1.

Já no tempo 72 horas, houve aumento nos níveis de TNF- α nos sobrenadantes de cultura das células THP-1 infectadas e tratadas (figura 12A; $p=0,006$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn) ou não (figura 12A; $p=0,004$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn) com nanopartículas em comparação com os níveis de TNF- α nos sobrenadantes de cultura das células tratadas apenas com as nanopartículas. Contudo, tal elevação não foi observada ao se comparar os sobrenadantes de cultura das células infectadas e tratadas com nanopartículas com os sobrenadantes das células incubadas apenas com meio de cultura. Além disso, no tempo 72 horas, o tratamento ou a infecção isolada (figura 12) não alterou os níveis de TNF- α nos sobrenadantes de cultura das células THP-1. No tempo 72 horas, também não foram observadas diferenças nos níveis de IL-1 β (figura 12B), IL-8 (figura 12C), IL-6 (figura 12D), IL-12p70 (figura 12E) e IL-10 (figura 12F) nos sobrenadantes provenientes das diferentes condições de cultura analisadas.

Quando os resultados dos tempos 24 e 72 horas foram comparados entre si, observamos que as células infectadas e tratadas com nanopartículas apresentaram níveis aumentados de IL-1 β (figura 12B; $p=0,031$, teste de Wilcoxon) no sobrenadante de cultura do tempo 72 horas em relação ao tempo 24 horas. Já as células apenas infectadas apresentaram níveis aumentados de IL-8 (figura 12C; $p=0,022$, teste de Wilcoxon) e IL-10 (figura 12F; $p=0,0004$, teste de Wilcoxon) nos sobrenadantes de cultura do tempo 72 horas em comparação com o tempo 24 horas. Diferentemente, as células tratadas apenas com nanopartículas apresentaram níveis de citocinas semelhantes nos distintos tempos de incubação. Por outro lado, as células incubadas apenas com meio de cultura apresentaram níveis aumentados de IL-1 β (figura 12B; $p=0,031$, teste de Wilcoxon) e IL-10 (figura 12F; $p=0,024$, teste de Wilcoxon) nos sobrenadantes de cultura do tempo 72 horas em relação ao tempo 24 horas. O tempo de incubação não afetou os

níveis das demais citocinas nos sobrenadantes provenientes das diferentes condições de cultura avaliadas.

Figura 12 - Produção de citocinas por células THP-1 infectadas com *Leishmania (L.) amazonensis* após tratamento *in vitro* com 0,06 mg/mL de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina.

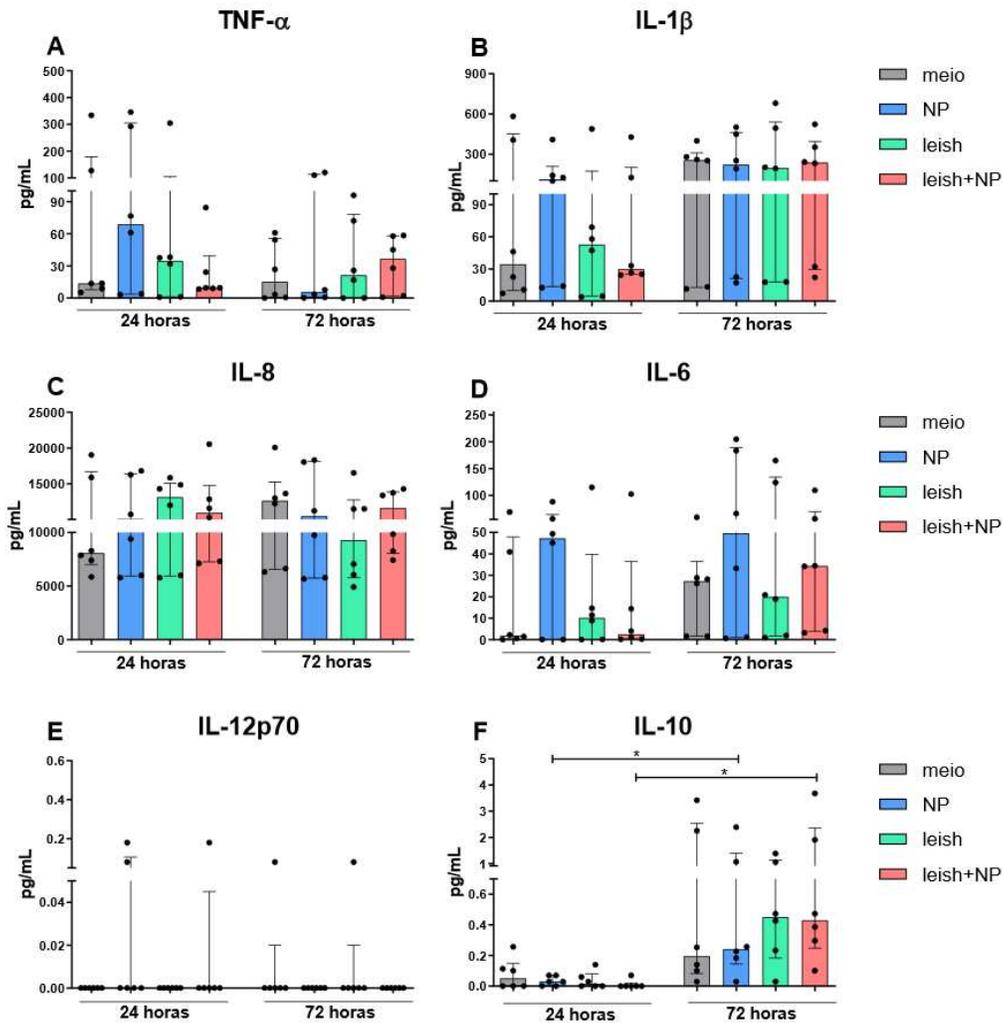


Em A: TNF-α. Em B: IL-1β. Em C: IL-8. Em D: IL-6. Em E: IL-12p70. Em F: IL-10. Os dados estão apresentados como mediana com intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn, para comparação de mais do que dois grupos com distribuição não normal e ANOVA seguido do teste de Tukey, para comparação de mais do que dois grupos com distribuição normal. Além disso, foi empregado o teste de Wilcoxon, para comparação de dois grupos com distribuição não normal, e teste t pareado para comparação de dois grupos com distribuição normal. (*) p < 0,05, (**) p < 0,01 e (***) p < 0,001. **Fonte:** elaborada pelo autor

Já nos experimentos envolvendo *L. (V.) braziliensis*, verificamos que, tanto no tempo 24 horas quanto no tempo 72 horas, não houve alteração nos níveis de nenhuma citocina analisada nos sobrenadantes de cultura das células infectadas e tratadas com nanopartículas (figura 13) em comparação com as demais condições de cultura estudadas. O tratamento ou a infecção isolada (figura 13) também não alterou os níveis de citocinas nos sobrenadantes de cultura das células THP-1 em nenhum dos tempos avaliados.

Além disso, quando os dados dos tempos 24 e 72 horas foram comparados entre si, observamos que as células infectadas e tratadas com nanopartículas apresentaram níveis aumentados de IL-10 (figura 13F; $p=0,031$, teste de Wilcoxon) nos sobrenadantes de cultura do tempo 72 horas em comparação com o tempo 24 horas. Similarmente, as células tratadas apenas com nanopartículas (Figura 13F; $p=0,031$, teste de Wilcoxon) também apresentaram níveis elevados de IL-10 no sobrenadante de cultura do tempo 72 horas em relação ao tempo 24 horas. Diferentemente, as células apenas infectadas ou incubadas com meio de cultura apresentaram níveis de IL-10 semelhantes entre os distintos tempos de incubação. Os níveis das demais citocinas nos sobrenadantes não foram influenciados pelo tempo de incubação em nenhuma das condições de cultura avaliadas.

Figura 13 - Produção de citocinas por células THP-1 infectadas com *Leishmania (V.) braziliensis* após incubação *in vitro* com 0,06 mg/mL de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina.



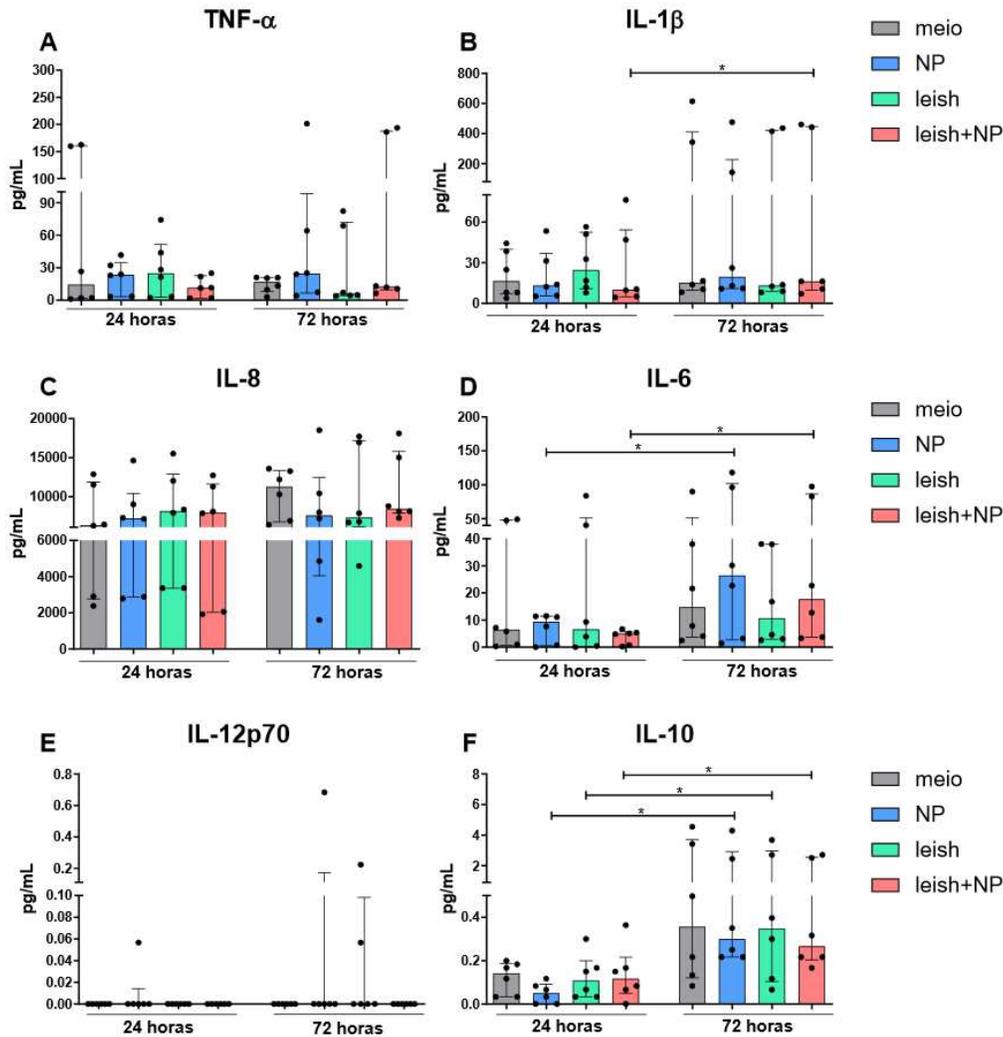
Em A: TNF- α . Em B: IL-1 β . Em C: IL-8. Em D: IL-6. Em E: IL-12p70. Em F: IL-10. Os dados estão apresentados como a mediana com intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn, para comparação de mais do que dois grupos, e teste de Wilcoxon, para comparação de dois grupos. meio = células controle incubadas apenas com meio de cultura, NP = células tratadas com nanopartículas, leish = células infectadas com leishmanias, leish+NP = células infectadas com leishmanias e tratadas com nanopartículas. (*) p < 0,05. **Fonte:** elaborada pelo autor

E por fim, nos experimentos envolvendo *Leishmania (V.) guyanensis*, observamos que, tanto no tempo 24 horas quanto no tempo 72 horas, não houve alteração nos níveis de nenhuma

citocina analisada nos sobrenadantes de cultura das células infectadas e tratadas com nanopartículas (figura 14) em comparação com as demais condições de cultura estudadas. O tratamento ou a infecção isolada (figura 14) também não alterou os níveis de citocinas nos sobrenadantes de cultura das células THP-1 em nenhum dos tempos avaliados.

Quando os resultados dos tempos 24 e 72 horas foram comparados entre si, observamos que as células infectadas e tratadas com nanopartículas apresentaram níveis aumentados de IL-1 β (figura 14B; $p=0,031$, teste de Wilcoxon), IL-6 (figura 14D; $p=0,031$, teste de Wilcoxon) e IL-10 (figura 14F; $p=0,031$, teste de Wilcoxon) nos sobrenadantes de cultura do tempo 72 horas em relação ao tempo 24 horas. Já as células apenas infectadas apresentaram níveis aumentados IL-10 (figura 14F; $p=0,031$, teste de Wilcoxon) nos sobrenadantes de cultura do tempo 72 horas em comparação com o tempo 24 horas. Por sua vez, as células tratadas apenas com nanopartículas apresentaram níveis aumentados de IL-6 (figura 14D; $p=0,031$, teste de Wilcoxon) e IL-10 (figura 14E; $p=0,031$, teste de Wilcoxon). E as células tratadas incubadas apenas com o meio de cultura apresentaram níveis de citocinas semelhantes entre os distintos tempos de incubação.

Figura 14- Produção de citocinas por células THP-1 infectadas com *Leishmania (V.) guyanensis* após incubação *in vitro* com 0,06 mg/mL de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina.



Em A: TNF- α . Em B: IL-1 β . Em C: IL-8. Em D: IL-6. Em E: IL-12p70. Em F: IL-10. Os dados estão apresentados como mediana com intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn, para comparação de mais do que dois grupos, e teste de Wilcoxon, para comparação de dois grupos. meio = células controle incubadas apenas com meio de cultura, NP = células tratadas com nanopartículas, leish = células infectadas com leishmanias, leish+NP = células infectadas com leishmanias e tratadas com nanopartículas. (*) $p < 0,05$. **Fonte:** elaborada pelo autor

Sendo assim após a análise dos dados de citocinas, concluímos que quando as células foram infectadas e tratadas com nanopartículas houve aumento da produção de IL-1 β , no caso dos ensaios com *L. (L.) amazonensis*, aumento da produção de IL-10, no caso dos ensaios com

L. (V.) braziliensis e aumento da produção de IL-1 β , IL-6 e IL-10, no caso dos ensaios com *L. (V.) guyanensis*. Já quando as células foram apenas infectadas com as leishmanias houve aumento da produção de IL-8 e IL-10, no caso dos ensaios com *L. (L.) amazonensis*, não houve modificação da produção de citocinas, nos ensaios envolvendo *L. (V.) braziliensis* e ocorreu aumento da produção de IL-10, no caso dos ensaios com *L. (V.) guyanensis*. Por outro lado, quando as células foram tratadas apenas com as nanopartículas, houve aumento da produção de IL-6 e IL-10. E por fim, quando as células foram incubadas apenas com o meio de cultura houve aumento da produção de IL-1 β e IL-10. O resumo dos resultados das citocinas encontra-se na tabela 1.

Tabela 1- Influência do tratamento *in vitro* com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-12p70 e IL-10 por células THP-1 infectadas com *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*.

<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>			
Citocina	24 horas	72 horas	24 horas x 72 horas
TNF- α	S/A	S/A	S/A
IL-1 β	S/A	S/A	Aumentado
IL-8	S/A	S/A	S/A
IL-6	S/A	S/A	S/A
IL-12p70	S/A	S/A	S/A
IL-10	S/A	S/A	S/A
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>			
Citocina	24 horas	72 horas	24 horas x 72 horas
TNF- α	S/A	S/A	S/A
IL-1 β	S/A	S/A	S/A
IL-8	S/A	S/A	S/A
IL-6	S/A	S/A	S/A
IL-12p70	S/A	S/A	S/A
IL-10	S/A	S/A	Aumentado
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>			
Citocina	24 horas	72 horas	24 horas x 72 horas
TNF- α	S/A	S/A	S/A
IL-1 β	S/A	S/A	Aumentado
IL-8	S/A	S/A	S/A
IL-6	S/A	S/A	Aumentado
IL-12p70	S/A	S/A	S/A

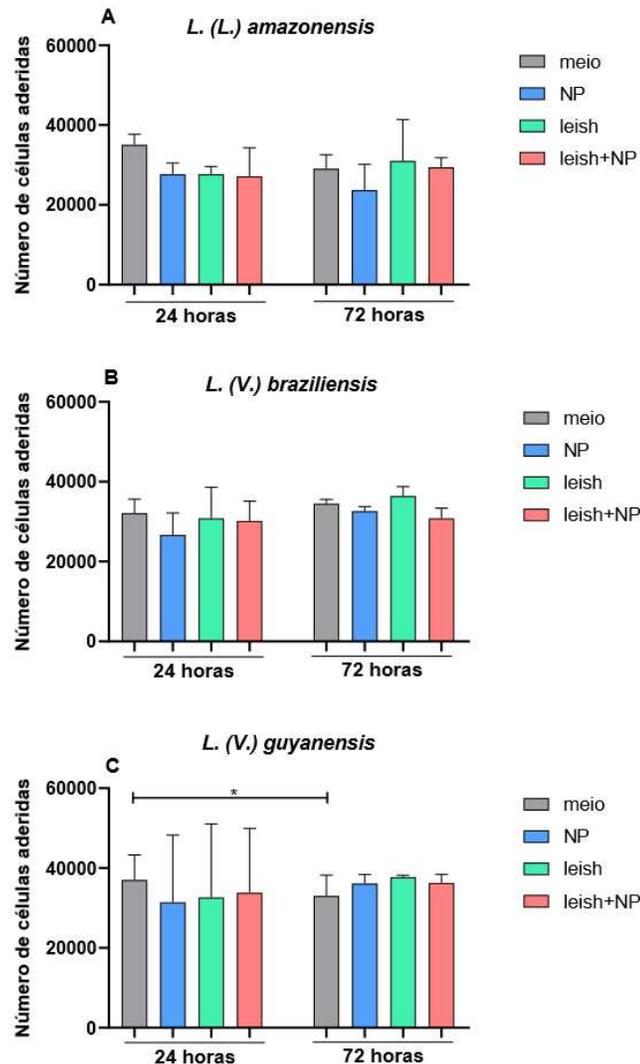
IL-10	S/A	S/A	Aumentado
--------------	-----	-----	-----------

S/A – Sem alteração. **Fonte:** elaborada pelo autor

4.4 Influência do tratamento *in vitro* de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina sobre a aderência de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*

Verificamos que o tratamento com nanopartículas e/ou a infecção pelas leishmanias não alterou o número de células THP-1 aderidas às lamínulas em nenhum dos tempos avaliados. Também não houve diferenças quando os diferentes tempos de incubação foram comparados entre si, com exceção das células controle incubadas apenas com meio de cultura, cujo quantitativo no tempo de 72 horas estava reduzido em relação ao tempo de 24 horas nos ensaios envolvendo *L. (V.) guyanensis* (figura 15C; $p=0,031$, teste de Wilcoxon).

Figura 15 - Quantidade de células THP-1 aderidas às laminulas após infecção com *L. (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* e tratamento *in vitro* com 0,06 mg/mL de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina.

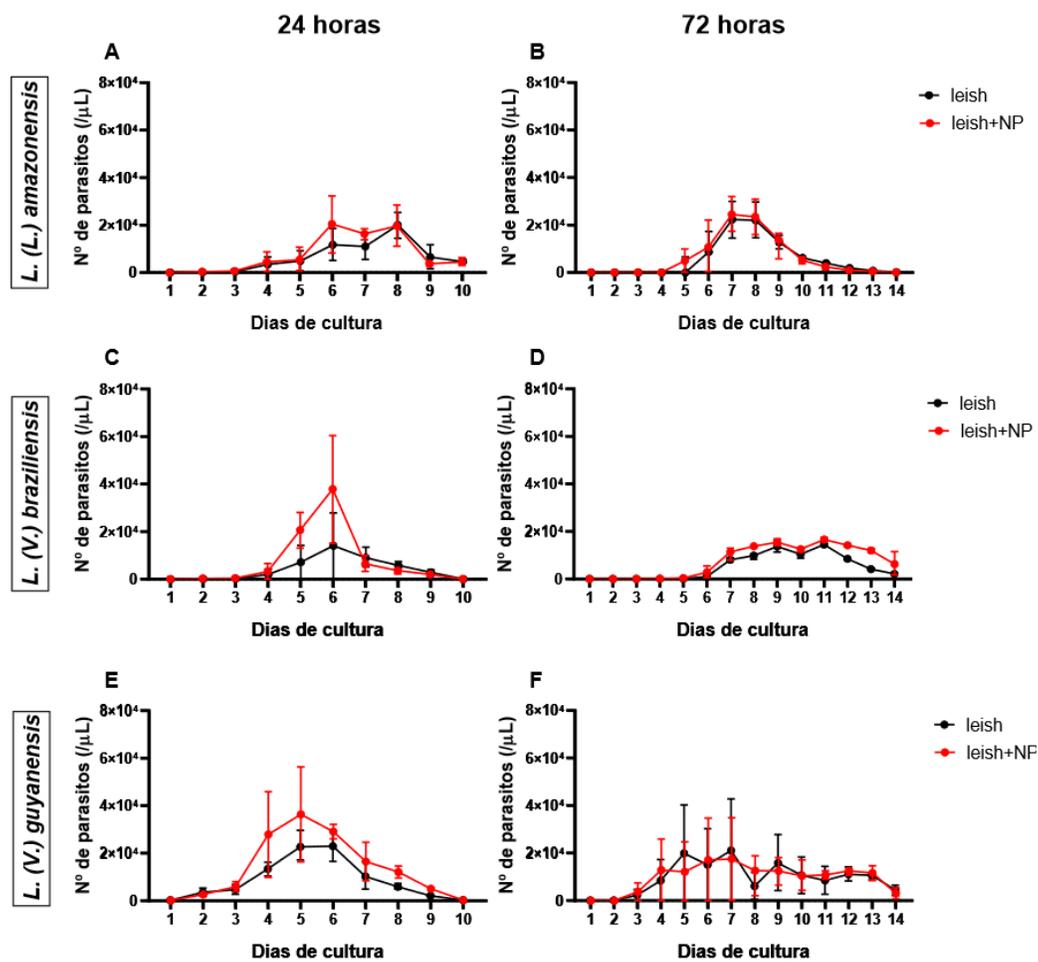


Em A: Número de células aderidas após infecção com *L. (L.) amazonensis*. Em B: Número de células aderidas após infecção com *Leishmania (V.) braziliensis*. Em C: Número de células aderidas após infecção com *L. (V.) guyanensis*. Os dados estão apresentados como mediana com intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn, para comparação de mais do que dois grupos, e teste de Wilcoxon, para comparação de dois grupos. meio = células controladas apenas com meio de cultura, NP = células tratadas com nanopartículas, leish = células infectadas com leishmanias, leish+NP = células infectadas com leishmanias e tratadas com nanopartículas. (*) $p < 0,05$. **Fonte:** elaborada pelo autor

4.5 Análise da viabilidade de parasitos intracelulares após o tratamento *in vitro* de células THP-1 infectadas com *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina

O tratamento com as nanopartículas não alterou a viabilidade dos parasitos intracelulares obtidos a partir das células THP-1 infectadas tanto com *L. (L.) amazonensis*, quanto com *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* em nenhum dos tempos avaliados (figura 16).

Figura 16 - Viabilidade de parasitos intracelulares após o tratamento *in vitro* de células THP-1 infectadas com *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* com 0,06 mg/mL de nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina.



Em A e B: *Leishmania (L.) amazonensis*. Em C e D: *Leishmania (V.) braziliensis*. Em E e F: *Leishmania (V.) guyanensis*. Os dados representam a mediana com intervalo interquartil. A análise estatística foi

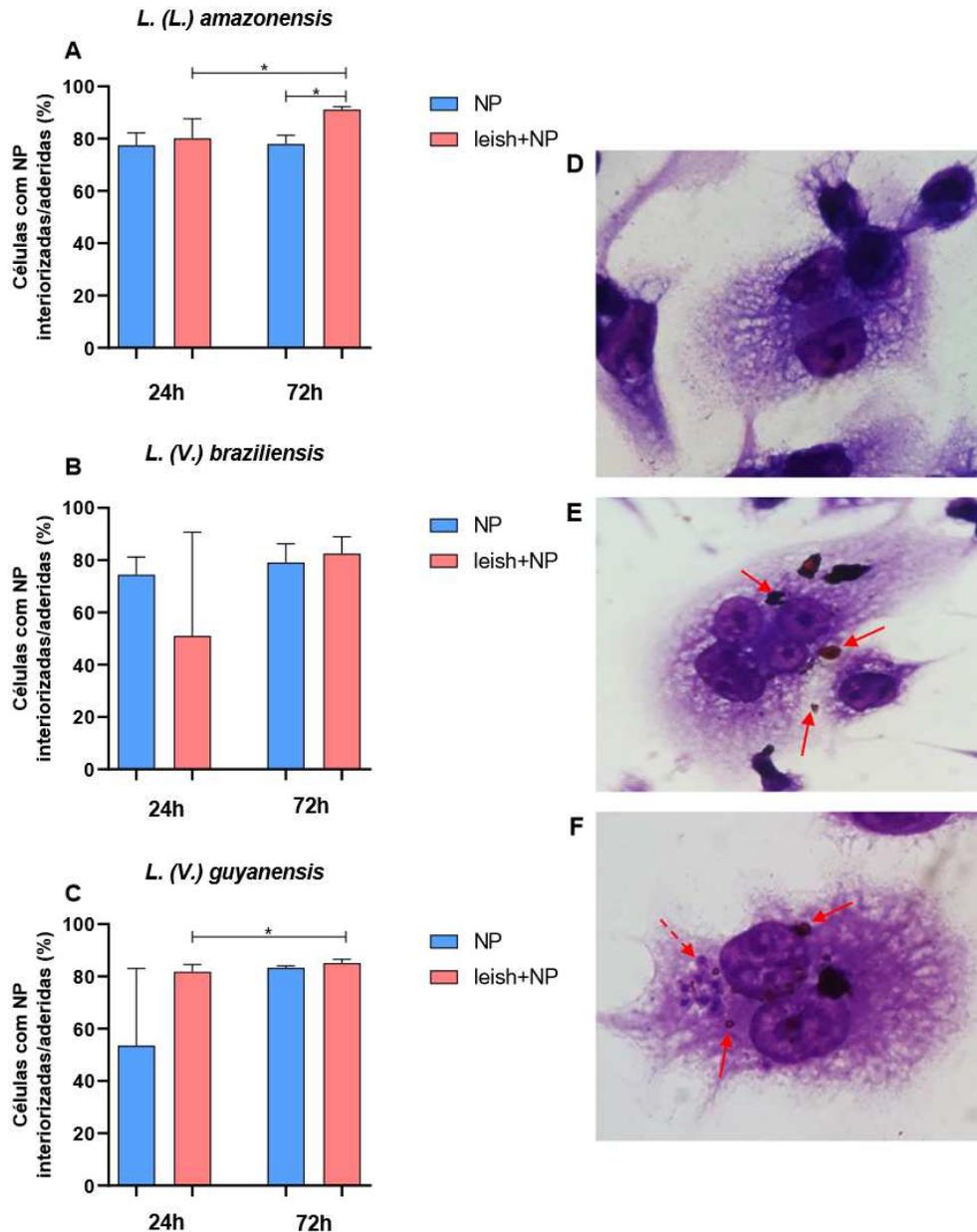
realizada utilizando o teste de Wilcoxon. leish = células THP-1 infectadas com leishmanias e leish+NP = células THP-1 infectadas com leishmanias e tratadas com nanopartículas. **Fonte:** elaborada pelo autor

4.6 Influência da infecção pelas leishmanias sobre o percentual de células THP-1 contendo nanopartículas interiorizadas/aderidas

Quando os tempos 24 e 72 horas foram avaliados em separado, nossos dados mostraram que a infecção com *L. (L.) amazonensis* promoveu aumento do percentual de células THP-1 contendo nanopartículas interiorizadas/aderidas no tempo 72 horas (figura 17A; $p=0,031$, teste de Wilcoxon), enquanto as infecções com *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* não apresentaram essa capacidade. Diferentemente, não foram encontradas diferenças no percentual de células contendo nanopartículas interiorizadas/aderidas no tempo 24 horas.

Ao compararmos os tempos 24 e 72 horas entre si, verificamos que as infecções com *L. (L.) amazonensis* (figura 17A; $p=0,031$, teste de Wilcoxon) e *L. (V.) guyanensis* (figura 17C; $p=0,031$, teste de Wilcoxon) ocasionaram aumento tempo dependente do percentual de células THP-1 contendo nanopartículas interiorizadas/aderidas, o que não foi observado quando as células estavam infectadas com *L. (V.) braziliensis*.

Figura 17 - Percentual de células THP-1 contendo nanopartículas interiorizadas/aderidas. Em A: *Leishmania (L.) amazonensis*. Em B: *Leishmania (V.) braziliensis*. Em C: *Leishmania (V.) guyanensis*.

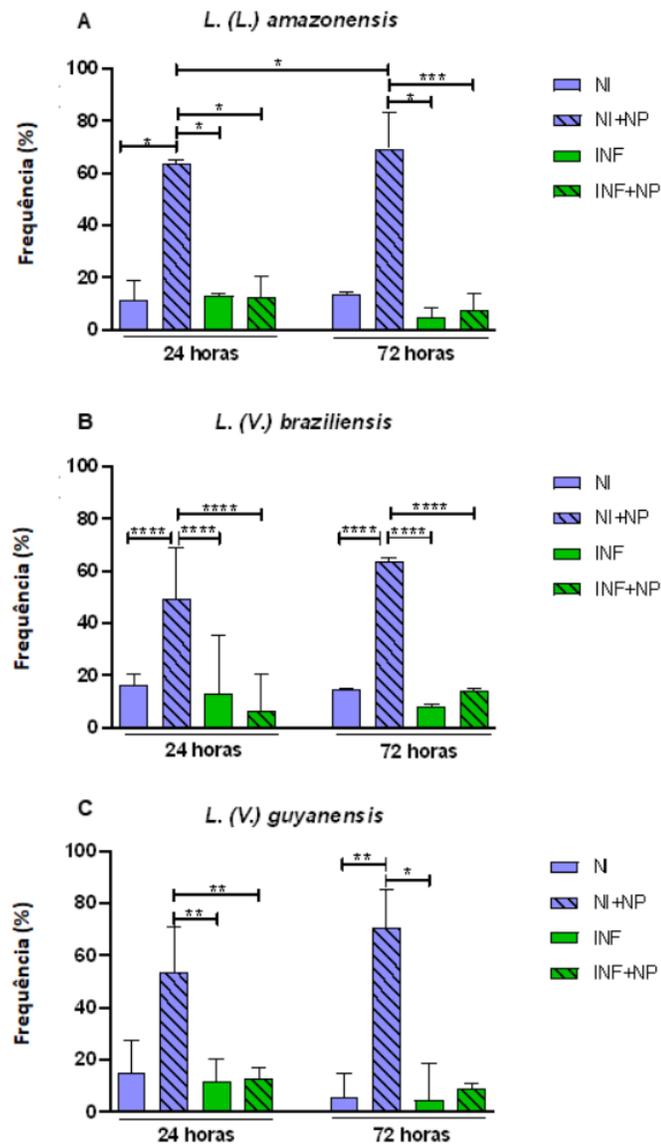


Os dados estão apresentados como mediana com intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Wilcoxon. NP = células tratadas com nanopartículas, leish+NP = células infectadas com leishmanias e tratadas com nanopartículas. (*) $p < 0,05$. Em D: Imagem representativa de célula não infectada e sem interação com nanopartículas. Em E: Imagem representativa de célula não infectada interagindo com nanopartículas (seta vermelha contínua). Em F: Imagem representativa de célula infectada com leishmania (seta vermelha pontilhada) interagindo com nanopartículas (seta vermelha

contínua). Em E e F: As nanopartículas podem ser vistas como estruturas com tamanhos variados de coloração amarronzada. **Fonte:** elaborada pelo autor

Além da análise anteriormente descrita, quantificamos também o percentual de células infectadas ou não contendo nanopartículas interiorizadas/aderidas nos diferentes tempos de incubação apenas nas lamínulas cujas células THP-1 foram infectadas e tratadas com nanopartículas. Observamos que, para as três espécies de *Leishmania*, houve maior percentual de células não infectadas com nanopartículas interiorizadas/aderidas em comparação com as células infectadas, tanto no tempo 24 horas (Figura 18; $p < 0,05$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn) quanto no tempo 72 horas (Figura 18; $p < 0,05$, Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn). Quando os diferentes tempos de incubação foram comparados entre si, verificamos que nos ensaios contendo *L. (L.) amazonensis* houve aumento no percentual de células não infectadas com nanopartículas interiorizadas/aderidas no tempo 72 horas em comparação ao tempo 24 horas (figura 18A; $p = 0,031$, teste de Wilcoxon). Tal modificação não foi observada nos ensaios contendo *L. (V.) braziliensis* (figura 18B) e *L. (V.) guyanensis* (figura 18C).

Figura 18 - Percentual de células THP-1 infectadas ou não apresentando nanopartículas interiorizadas/aderidas. Em A: *Leishmania (L.) amazonensis*.



Em B: *Leishmania (V.) braziliensis*. Em C: *Leishmania (V.) guyanensis*. Os dados estão apresentados como mediana com intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn para comparação de mais do que dois grupos, e teste de Wilcoxon, para comparação de dois grupos. NI = células THP-1 não infectadas, NI+NP = células THP-1 não infectadas contendo nanopartículas, INF = células THP-1 infectadas, e INF+NP = células THP-1 infectadas contendo nanopartículas. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$. **Fonte:** elaborada pelo autor

Assim, a análise do percentual de células THP-1 contendo nanopartículas interiorizadas/aderidas permitiu concluir que as infecções com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.)*

guyanensis aumentaram a interação das células THP-1 com as nanopartículas. Contudo, nesses ensaios, assim como naqueles envolvendo *L. (V.) braziliensis*, a maior parte das células em contato com as nanopartículas não estavam infectadas pelos parasitos.

5. DISCUSSÃO

Para avaliar o possível efeito antiparasitário de nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) encapsuladas com polianilina sobre macrófagos infectados com espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar, diferenciamos células THP-1 em macrófagos pela incubação com 320 nM de PMA e as infectamos com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*. Após a infecção, as células foram incubadas com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina (0,06 mg/mL) por 24 e 72 horas e o índice de infecção foi analisado. Foi empregada uma concentração não citotóxica de nanopartículas, que foi determinada para a execução de outro projeto envolvendo nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina e células THP-1. Como resultado, observamos que o tratamento com as nanopartículas não alterou o índice de infecção das células THP-1 em nenhum dos tempos analisados (figura 10). Os nossos resultados foram diferentes dos obtidos em estudos que têm investigado o efeito anti-*Leishmania* de nanopartículas de óxido de ferro (KATHAMI et al., 2017; KHALIL et al., 2017; HASSAN et al., 2018; ALBALAWI et al., 2018), já que tais estudos em conjunto tem apontado que as nanopartículas de óxido de ferro induzem a morte dos parasitos, bem como reduzem a carga parasitária *in vitro* e *in vivo* em células infectadas com leishmanias. Tal diferença entre o nosso estudo e trabalhos prévios pode ter sido ocasionada por distintos fatores como: a) concentração de nanopartículas utilizada (não citotóxica *versus* citotóxica), b) forma parasitária empregada (promastigotas *versus* amastigotas), c) espécie de *Leishmania* utilizada (leishmanias do velho mundo *versus* leishmanias do novo mundo), d) localização do parasito (extracelular *versus* intracelular), d) tipo de nanopartícula de óxido de ferro empregada (magnetita *versus* maghemita), e e) diferenças no recobrimento das nanopartículas (polianilina *versus* piroctana olamina).

Como a produção de moléculas microbicidas são importantes no contexto de defesa contra as leishmanias, paralelamente a avaliação do índice de infecção, mensuramos os níveis de óxido nítrico nos sobrenadantes de cultura das células infectadas e incubadas ou não com as nanopartículas e observamos que, a infecção isolada com as três espécies de *Leishmania* não alterou os níveis basais de óxido nítrico produzidos pelas células THP-1. Contudo, na presença

das nanopartículas e no tempo 72 horas, houve maior produção de óxido nítrico por células THP-1 infectadas com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, mas não com *L. (V.) guyanensis* (Figura 11). Verificamos ainda que as nanopartículas isoladamente não foram capazes de modificar a produção basal de óxido nítrico pelas células THP-1. Assim como em nosso estudo, Albalawi e colaboradores (2021) demonstraram que o tratamento com nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) cobertas ou não com piroctana olamina (PO), um sal etanolamina derivado do hidroxâmico piroctana, aumentou os níveis de óxido nítrico em sobrenadante de cultura de células J774-A1 infectadas com *L. (L.) major*. É amplamente conhecido que o óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de nitrogênio (RNS) essencial para a defesa contra as leishmanias (HORTA et al., 2012) e já foi demonstrado que a sua ausência, fornece uma vantagem aos parasitos, que se replicam de forma descontrolada nas células hospedeiras (OLEKHNOVITCH & BOUSSO, 2015). Assim, nossos resultados apontam que o tratamento com as nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina modulam positivamente um importante mecanismo microbicida dos macrófagos contra as leishmanias.

Em leucócitos, a produção de óxido nítrico é mediada pela sintase do óxido nítrico induzível (iNOS). Esta enzima promove a metabolização da L-arginina para gerar L-citrulina e óxido nítrico (HORTA et al., 2012). Contudo, as leishmanias afetam a síntese de proteínas, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas pelos macrófagos, bem como prejudicando sua reatividade aos sinais indutores da expressão de iNOS por interferirem com as vias do NF- κ B e STAT. Estas estratégias impedem a expressão de iNOS no sítio de infecção e promovem a persistência dos parasitos (OLEKHNOVITCH & BOUSSO, 2015). Possivelmente, tais mecanismos de evasão colaboraram para não ter ocorrido modificação da produção de óxido nítrico pelas células THP-1 após a infecção com as distintas espécies de *Leishmania*. Por outro lado, não explicam as razões pelas quais as células THP-1 se tornaram mais hábeis em produzir óxido nítrico na presença simultânea dos patógenos e das nanopartículas.

Já foi demonstrado que a produção de óxido nítrico pode ser disparada pela ligação a receptores tipo Toll. Dos receptores expressos nas membranas celulares, o TLR2, TLR3, TLR4 e TLR5 estão envolvidos em sinalização que leva a produção de óxido nítrico via ativação de MyD88. Dos TLRs expressos na membrana endossomal, a sinalização via TLR9/21 e TLR3 também induz a produção de óxido nítrico (ABDUL-CADER et al., 2016). Em 2018, Wolf-Grosse e colaboradores mostraram que nanopartículas de óxido de ferro aumentaram de um modo dose-dependente a produção de citocinas em macrófagos humanos por meio da ativação

dos receptores TLR2/6, TLR4 e TLR8 (WOLF-GROSSE et al., 2018). Já foi observado também que macrófagos reconhecem LPG de *Leishmania* e antígenos específicos de amastigotas via TLR2. A interação do LPG com o TLR2 deflagrou a produção de TNF- α , IL-12, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (GUPTA et al., 2013). Foi verificado ainda que o reconhecimento de glicoesfingofosfolípido (GSPL) e do complexo proteoglicolípido (P8GLC) de *Leishmania* via TLR4 promove uma forte resposta antiparasitária mediada por TNF- α (GUPTA et al., 2013). Portanto, é possível que em nosso estudo, a produção aumentada de óxido nítrico observada nas culturas que continham *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* possa ter sido ocasionada pela ligação concomitante de antígenos parasitários e nanopartículas a receptores tipo Toll presentes nas membranas celulares ou nos compartimentos endossomais das células THP-1. De fato, tem sido demonstrado que macrófagos requerem mais de um sinal para produzirem óxido nítrico. Por exemplo, já foi observado que a combinação LPS (lipopolissacarídeo), um ligante de TLR4, com IFN- γ foi mais efetiva em estimular a produção de óxido nítrico em linhagem de macrófago murino do que o LPS sozinho (ABDUL-CADER et al., 2016). Similarmente, estimulação prévia com IFN- γ ou infecção viral é necessária para deflagrar a produção de óxido nítrico induzida pelo LPS em macrófagos de aves (ABDUL-CADER et al., 2016).

Alguns estudos têm mostrado que a produção de óxido nítrico por células do sistema monocítico/macrofágico é diversamente afetada pelas distintas espécies de *Leishmania*. Em 2006, KAVOOSI e colaboradores mostraram que LPG de *L. (L.) major* estimulou a produção de óxido nítrico por células J774.1A de um modo dose dependente. Já a infecção com *L. (L.) tropica* reduziu a produção de óxido nítrico por células J774 estimuladas com LPS/IFN- γ , enquanto a infecção pela *L. (L.) major* não exerceu tal efeito supressor (MAKSOURI et al., 2020). Também já foi demonstrado que o LPG de *L. (L.) amazonensis*, bem como os próprios parasitos estimularam, via TLR4, a produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos C57BL/6 (NOGUEIRA et al., 2015). Por outro lado, em 2015, ALVES e colaboradores mostraram que a infecção *in vitro* com *L. (L.) amazonensis* não disparou a produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos BALB/c. Foi verificado ainda que macrófagos previamente estimulados com IFN- γ e incubados com LPG de *L. (V.) braziliensis* apresentaram produção de óxido nítrico mais elevada do que aquelas incubadas com LPG de *L. (L.) infantum* (IBRAIM et al., 2013). Em 2020, um estudo também mostrou que a produção intracelular de óxido nítrico por monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) e pró-inflamatórios (CD14⁺⁺CD16⁺) foi mais elevada na presença de *L. (L.) infantum* do que de *L. (V.) braziliensis* (RIBEIRO et al.,

2020). Portanto, o fato das espécies de *Leishmania* utilizadas em nosso estudo terem alterado de modo distinto a produção de óxido nítrico pelas células incubadas com as nanopartículas pode ter relação com a capacidade de cada parasito modular distintamente a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, que somada às modificações induzidas pelas nanopartículas pode ter resultado na produção aumentada de óxido nítrico nas culturas contendo *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, mas não *L. (V.) guyanensis*.

Além do óxido nítrico, citocinas desempenham importantes papéis na resistência contra as leishmanias. Tais moléculas têm sido relacionadas também com suscetibilidade aumentada aos parasitos, bem como com o desenvolvimento de dano tecidual ao longo da doença (GABRIEL et al. 2019; DOS SANTOS et al., 2019; MASPI et al., 2016). O TNF- α é uma citocina produzida principalmente por macrófagos e que desempenha um papel crucial na depuração das leishmanias, exercendo seu papel por meio do aumento da atividade metabólica dos macrófagos e da síntese de óxido nítrico (GHORBANI et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2019). Contudo, tem sido relacionado com resposta inflamatória exacerbada em pacientes com LMC (SCORZA et al., 2017). Já a IL-1 β foi relacionada à resistência do hospedeiro à infecção pela *Leishmania* por induzir produção de óxido nítrico, que restringiu a replicação dos parasitos (LIMA-JUNIOR et al., 2013). Por outro lado, a IL-1 β também mostrou capacidade de exacerbar a doença causada por *L. (L.) major* em camundongos C57BL/6 (CHARMOY et al., 2016). A IL-8 é secretada por macrófagos residentes em resposta a infecção pelas leishmanias e desempenha um papel fundamental nos estágios iniciais da infecção por induzir o recrutamento e ativação de neutrófilos no sítio de infecção (MASPI, 2016). Outra molécula importante no contexto das leishmanioses é a IL-6, que é uma citocina com função pró-inflamatória. A IL-6 é produzida por diversas células como macrófagos, células dendríticas e células T. Atua como um fator de crescimento para células B e juntamente com o TGF- β estimula o desenvolvimento de linfócitos Th17, que são células secretoras de IL-17 (MASPI et al., 2016; OSERO et al., 2020), uma citocina que tem sido relacionada com a exacerbação de lesões cutâneas causadas por espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar (KOSTKA et al., 2009; SCOTT & NOVAIS., 2016). Já a IL-12 estimula a diferenciação de linfócitos Th1, que por meio da liberação de IFN- γ e TNF- α controlam a multiplicação dos parasitos (MASPI et al., 2016; OSERO et al., 2020). Na ausência de IL-12, camundongos tornam-se suscetíveis à infecção por *L. (L.) major* por apresentarem resposta polarizada para a produção de citocinas Th2 (MASPI et al., 2016; OSERO et al., 2020). Por sua vez, a IL-10 bloqueia diretamente o macrófago e a produção de IL-12 por células dendríticas, prejudicando

a proliferação de linfócitos Th1 e a produção de IFN- γ (OSERO et al., 2020). Tais efeitos mediados pela IL-10 têm sido relacionados com aumento da suscetibilidade à infecção parasitária e a persistência dos parasitos no sítio de infecção (BELKAID et al., 2017).

Em virtude dos importantes papéis desempenhados pelo TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-12p70 e IL-10 no contexto da infecção pelas leishmanias, quantificamos também seus níveis em sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados *in vitro* com *L. (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, após o tratamento com nanopartículas. Quando os tempos 24 horas e 72 horas foram avaliados em separado, os dados mostraram que o tratamento não alterou os níveis de nenhuma citocina tanto nos sobrenadantes de cultura das células infectadas com *L. (L.) amazonensis* (figura 12) quanto nos sobrenadantes das células infectadas com *L. (V.) braziliensis* (figura 13) e *L. (V.) guyanensis* (figura 14). Entretanto, ao compararmos o tempo 24 horas e 72 horas entre si, observamos que as células infectadas e tratadas com nanopartículas aumentaram a produção de IL-1 β , nos ensaios com *L. (L.) amazonensis* (figura 12), de IL-10, nos ensaios com *L. (V.) braziliensis* (figura 13) e de IL-1 β , IL-6 e IL-10, nos ensaios com *L. (V.) guyanensis* (figura 14). Ainda verificamos que as células apenas infectadas aumentaram a produção de IL-8 e IL-10, nos ensaios com *L. (L.) amazonensis*, e de IL-10, nos ensaios com *L. (V.) guyanensis*. Além disso, as células tratadas apenas com nanopartículas aumentaram a produção de IL-6 e IL-10. E por fim, as células incubadas apenas com meio de cultura aumentaram a produção de IL-1 β e IL-10. Portanto, os nossos dados mostraram que as células infectadas com *L. (L.) amazonensis* e incubadas com as nanopartículas mantiveram a capacidade de produzir IL-1 β e produziram menores níveis de IL-10. Já as células infectadas com *L. (L.) braziliensis* e tratadas com as nanopartículas apresentaram produção aumentada de IL-10, enquanto as células infectadas com *L. (L.) guyanensis* e tratadas com nanopartículas produziram maior quantidade de IL-1 β e IL-6, indicando que as nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina são capazes de modular positivamente diferentes citocinas envolvidas na imunidade e imunopatogenia das leishmanioses.

Após a revisão da literatura, observamos que o nosso estudo foi o primeiro a analisar a influência do tratamento com nanopartículas de óxido de ferro sobre a produção de citocinas por macrófagos infectados com leishmanias. Entretanto, assim como em nosso trabalho, alguns estudos também têm mostrado que nanopartículas de óxido de ferro são capazes de aumentar a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias por macrófagos em outros contextos. Em 2014, ANDUJAR e colaboradores investigaram o efeito da exposição ocupacional a nanopartículas

de metal em pulmões de soldadores e observaram que houve secreção aumentada de TNF- α , IL-1 β e IL-6 após incubação de células THP-1 com nanopartículas de maghemita (Fe₂O₃). Também foi verificado aumento da produção de TNF- α por células RAW264.7 co-incubadas com células de câncer de mama e ferumoxytol (Feraheme®), uma nanopartícula de magnetita (Fe₃O₄) coberta com carboximetildextran utilizada para o tratamento de anemia nos Estados Unidos (ZAGANEH et al., 2016). Em outro estudo de câncer, foi verificado que células RAW264.7 co-incubadas com células de fibrossarcoma humano (HT1080) e nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs) apresentaram expressão gênica aumentada para TNF- α (ZHANG et al., 2020). O tratamento com SPIONs também induziu aumento na expressão de numerosas citocinas em macrófagos derivados de medula óssea, incluindo IL-1 β , IL12p40/70, TNF- α , IL-2 e IL-10, além das quimiocinas SDF-1 α and MCP-1 (JIN et al., 2019). Em contraste, também já foi verificado um efeito supressor das nanopartículas de óxido de ferro, pois células J774.A1 estimuladas com LPS e tratadas com nanopartículas de maghemita (Fe₂O₃) apresentaram menor produção de TNF- α e IL-6 do que as células não tratadas com as nanopartículas (DALZON et al., 2020). VILLEGAS e colaboradores (2019) também descobriram que nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ácido poliacrílico não alteraram a viabilidade de macrófagos derivados de monócitos, mas inibiram a secreção de citocinas como IL-1 β , IL-6 e IL-10. Além disso, também já foi observado ausência de efeito modulador pelas nanopartículas de óxido de ferro já que VOGT e colaboradores, em 2015, não observaram liberação de TNF- α em macrófagos primários humanos expostos a SPIONs recobertas com dextran ou sílica.

Não avaliamos ainda os mecanismos pelos quais as nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina aumentaram a produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 pelos macrófagos infectados com leishmanias. Um estudo conduzido em 2016 mostrou que nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄) cobertas com carboximetildextran promoveram a repolarização de macrófagos associados a células tumorais para um fenótipo M1 (ZAGANEH et al, 2016). Macrófagos M1 são caracterizados pela capacidade de liberar citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF α) e quimioatraentes (CXCL3, -8, -10) e desempenham um papel essencial na eliminação de patógenos, células danificadas ou transformadas e no recrutamento de outras células do sistema imunológico para o sítio de infecção (DUKHINOVA et al., 2020). Foi demonstrado que nanopartículas de óxido de ferro disparam sinalização pró-inflamatória em macrófagos por meio da ativação dos TLRs 2/6, 4 e 8 (DUKHINOVA et al., 2020; MULENS-ARIAS et al., 2020). A ativação dos TLRs conduz a sinalização específica em

macrófagos que estimula a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO) e ativação do inflamassoma para matar os patógenos, a apresentação de antígenos por meio da elevação da expressão dos complexos de histocompatibilidade tipo I e II (MHC I, II), CD80, CD86, a liberação de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas que atraem outras subpopulações de leucócitos para o local da infecção (DUKHINOVA et al., 2020). O efeito das nanopartículas de óxidos de metais em macrófagos também envolve a regulação da transcrição gênica. Em macrófagos tratados com nanopartículas de óxidos de metal foi detectada a ativação de STAT1 e NF- κ B, que são fatores de transcrição abundantes em macrófagos M1 (DUKHINOVA et al., 2020). Também já foi observado que SPIONs usadas clinicamente induziram autofagia em macrófagos especificamente por meio da ativação de TLR4, seguida por fosforilação de p38 e translocação de Nrf2 para os núcleos das células. Tal translocação foi acompanhada pela produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (IL-1 β , IL-12p40/70, TNF- α , IL-2, IL-10) e quimiocinas (SDF-1, MCP-1) pelos macrófagos expostos as SPIONs (JIN et al., 2019). Portanto, considerando esses achados, é possível que as nanopartículas utilizadas em nosso estudo tenham modulado a produção de citocinas pela ativação de receptores tipo Toll existentes nas membranas celulares ou compartimentos endossomais das células THP-1. Tal ativação pode ter disparado vias de sinalização intracelulares relacionadas a produção de citocinas que culminou com maior produção de IL-1 β , IL-6 e IL-10 nos tempos mais tardios de tratamento.

Alguns estudos tem mostrado que as distintas espécies de *Leishmania* afetam a produção de citocinas pelos fagócitos de modo diferenciado. Em 2018, foi observado que monócitos humanos infectados por *L. (L.) infantum* produziram menor quantidade de TNF- α e apresentaram razão TNF- α /IL-10 menor do que as células infectadas por *L. (V.) braziliensis* (VIANA et al., 2018). Já Ribeiro et al. (2018) verificaram que *L. (L.) infantum* induziu um perfil de citocinas pró-inflamatórias caracterizado por níveis mais elevados de TNF- α em sobrenadante de cultura do que *L. (V.) braziliensis*. Também foi observado que macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c produziram maior quantidade de TNF- α quando estimulados com LPG de *L. (V.) braziliensis* do que com LPG de *L. (L.) infantum* (IBRAIM et al., 2013). Em 2014, foi verificado ainda que a infecção de macrófagos peritoneais provenientes de camundongos BALB/c com *L. (L.) amazonensis* não alterou a produção de TNF- α e IL-12, mas a produção destas citocinas foi aumentada pela infecção com *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) shawi*. Neste mesmo estudo, a produção de TGF- β foi mais elevada quando os macrófagos foram infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) shawi* do que quando infectados com *L. (V.)*

braziliensis (RAMOS et al., 2014). Portanto, o fato das espécies de *Leishmania* empregadas em nosso trabalho terem alterado de modo distinto a produção de citocinas pelas células incubadas com as nanopartículas pode estar associado com a capacidade de cada parasito modular de modo diverso a produção citocinas em macrófagos, que somada as mudanças promovidas pela incubação simultânea com as nanopartículas pode ter ocasionado os diferentes perfis de citocinas observados nas culturas contendo *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*.

No intuito de excluir a possibilidade de que os dados fossem influenciados pela destruição dos macrófagos pelas leishmanias e/ou por efeito tóxico das nanopartículas sobre os macrófagos, avaliamos o número de células aderidas às lamínulas e observamos que tanto a infecção pelas distintas espécies de *Leishmania*, quanto o tratamento com as nanopartículas não alterou o número de células que permaneceram nas lamínulas ao final dos tempos de incubação (figura 15). Além deste ensaio, também avaliamos a viabilidade dos parasitos intracelulares indiretamente por meio da avaliação do número de promastigotas que proliferaram a partir das amastigotas intracelulares. Como resultado, verificamos que os parasitos permaneceram viáveis em todas as culturas analisadas (figura 16). Nossos resultados divergiram da literatura já que estudos prévios têm demonstrado toxicidade das nanopartículas de óxido de ferro para promastigotas e amastigotas de *Leishmania* (KATHAMI et al., 2017; KHALIL et al., 2017; HASSAN et al., 2018), que determinou inclusive diminuição da carga parasitária e do tamanho de lesões cutâneas em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major* (ALBALAWI et al., 2021). A viabilidade aumentada dos parasitos pode ter sido devido ao fato de que, embora em nosso estudo tenhamos observado modulação positiva da produção de óxido nítrico, bem como de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) pelas células infectadas com as leishmanias e tratadas com as nanopartículas, as concentrações de óxido nítrico nas culturas ainda foram baixas para exercerem ação antiparasitária. De fato, um estudo publicado recentemente mostrou que houve diminuição da viabilidade de amastigotas de *L. (L.) tropica* e *L. (L.) major* após a exposição a concentrações elevadas de NO, sendo que o IC50 para de *L. (L.) tropica* foi 51 μ M e para *L. (L.) major* foi >100 μ M (MAKSOURI et al., 2017). Outro aspecto que também justificaria seria a incapacidade de as nanopartículas penetrarem nas células parasitadas e exercerem toxicidade sobre os parasitos intracelulares. Então, para entender como as células THP-1 estavam interagindo com as nanopartículas, quantificamos o percentual de células que apresentavam nanopartículas interiorizadas/aderidas e verificamos que houve aumento no percentual de células interagindo com as nanopartículas após a infecção com *L. (L.)*

amazonensis e *L. (V.) guyanensis* (figura 17). Contudo, ao refinarmos a análise observamos que em todos os ensaios as células não infectadas apresentaram maior interação com as nanopartículas do que as células infectadas (figura 18).

Não analisamos ainda os mecanismos pelos quais as células infectadas foram menos hábeis em interagir com as nanopartículas. Uma possibilidade é que a infecção pelas leishmanias tenha diminuído a capacidade das células englobarem as nanopartículas. Sabe-se que a endocitose de nanopartículas de óxido de ferro é um processo complexo que envolve várias vias. Tal complexidade se deve a distintos fatores como tamanho, carga, tipo de cobertura e identidade biológica que determinarão a via de interiorização que será utilizada pelas células (MULENS-ARIAS et al., 2020). Em mamíferos, a endocitose ocorre por meio das seguintes vias: (1) pinocitose, um processo que envolve o englobamento em vesículas com até 150 nm, (2) macropinocitose, um mecanismo que envolve a internalização em vesículas com mais do que 250 nm, (3) endocitose dependente de clatrina/caveolina, uma via que acarreta o englobamento em vesículas que variam de 60 a 120 nm, 4) endocitose independente de clatrina/caveolina, cujo englobamento acontece em vesículas com aproximadamente 90 nm, e (4) fagocitose, um mecanismo que determina a ingestão de partículas grandes como microrganismos e debris celulares em vesículas com mais do que 250 nm (ZHU et al., 2013; CANTON, 2018; MULENS-ARIAS et al., 2020). Em estudos prévios foi observado que a endocitose de nanopartículas de óxido de ferro em macrófagos ocorre por meio de fagocitose, macropinocitose e endocitose mediada por clatrina/caveolina (MULENS-ARIAS et al., 2020). Para que essas formas de endocitose aconteçam é necessário um citoesqueleto de actina intacto em células de mamíferos (SAMAJ et al., 2004). Em 2016, um estudo mostrou que a infecção com *L. (L.) amazonensis* altera a dinâmica de polimerização dos filamentos de actina em macrófagos. Nesse modelo, as células infectadas apresentaram padrão acentuadamente alterado, com múltiplas regiões de polimerização de actina que alternavam em localização, enquanto as não infectadas apresentaram ondas estáveis de polimerização que se organizavam em ponto específico das células. A análise da forma também mostrou maior polimerização de actina no sentido circular nas células infectadas, enquanto nas não infectadas houve maior polimerização no sentido excêntrico (de MENEZES et al., 2016). Portanto, é possível que em nossos ensaios as células infectadas tenham apresentado maior dificuldade em interiorizar as nanopartículas pelo fato de apresentarem alterações na capacidade de remodelamento do citoesqueleto de actina que levou a uma menor capacidade de realizar endocitose das nanopartículas.

Na endocitose, a detecção dos alvos a serem interiorizados é em grande parte mediada por receptores. Ainda não se conhece amplamente quais receptores são utilizados pelos macrófagos para detectarem/interiorizarem as nanopartículas de óxido de ferro. Os trabalhos disponíveis até o momento mostram que tais nanopartículas podem ser detectadas/interiorizadas pelos macrófagos por meio de distintos receptores como os receptores tipo Toll 4 (TLR4), Toll 2/6 (TLR 2/6), Toll 8 (TLR8), Scavenger classe A (SR-A) e receptor para complemento (CR) (WANG et al., 2017; WOLF-GROSSE et al., 2018; MULENS-ARIAS et al., 2020). Portanto, uma redução induzida pelas leishmanias da expressão de receptores responsáveis pela detecção/interiorização das nanopartículas pode também ter contribuído para que as células parasitadas apresentassem menor eficiência no englobamento das nanopartículas.

No caso de macrófagos, muitas vezes a detecção e interiorização é precedida pela migração direcional das células até o alvo por meio de um processo estritamente regulado denominado quimiotaxia (WU, 2005). Essa migração segue as seguintes etapas: (1) formação de um pseudópode líder, (2) adesão a matriz extracelular; (3) translocação do corpo celular, (4) liberação da borda traseira, e (5) retração e reciclagem de membrana e receptores da parte traseira para a frente da célula (WEISNER et al., 2014). Alguns estudos tem mostrado que a infecção pelas leishmanias altera a capacidade quimiotática dos macrófagos. Já foi observado que a infecção por *L. (L.) mexicana* diminuiu a capacidade quimiotática de macrófagos (BRAY et al., 1983). Em 2016, Menezes e colaboradores também demonstraram que macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* apresentaram migração diminuída em resposta ao MCP-1, uma quimiocina que regula migração e infiltração de monócitos e macrófagos (de MENEZES et al., 2016). Portanto, outro aspecto que também pode ter colaborado para que nos nossos ensaios as células infectadas tenham apresentado menor habilidade para englobar as nanopartículas é uma possível redução da capacidade quimiotática dos macrófagos induzida pela infecção.

Finalmente, tomados em conjunto, os nossos dados mostraram que o tratamento com as nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina não alterou o índice de infecção dos macrófagos, bem como não modificou a viabilidade dos parasitos intracelulares. Essa ausência de efeito antiparasitário foi seguida da incapacidade de as nanopartículas penetrarem nas células parasitadas, tendo ocorrido um menor percentual de células interagindo com as nanopartículas na presença da infecção. Contudo, as nanopartículas ainda foram capazes de modular positivamente a produção de óxido nítrico e, bem como das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10. Porém, os níveis produzidos foram insuficientes para alterar a carga parasitária, bem como a

viabilidade dos parasitos intracelulares. Embora a ineficiência do tratamento em reduzir a carga parasitária possa ser ter sido ocasionada pela incapacidade de as nanopartículas induzirem potentes mecanismos microbicidas nos macrófagos, a impossibilidade de interagirem ou ingressarem nas células parasitadas pode ter sido a principal causa da ausência de ação antiparasitária por parte de tais nanocompósitos. Para confirmarmos essa possibilidade precisaremos ainda verificar se as nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina exercem efeito leishmanicida direto sobre promastigotas e amastigotas axênicas das espécies de *Leishmania* utilizadas em nosso estudo. O fato de as nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina terem apresentado dificuldade em interagir com as células parasitadas aponta a necessidade do desenvolvimento de nanopartículas de óxido de ferro com maior capacidade de penetração nas células parasitadas. Uma possibilidade seria efetuar o recobrimento das nanopartículas com moléculas (complemento, manose, imunoglobulinas e outras) que medeiam sua entrada nas células parasitadas por vias endocíticas preservadas durante a infecção com leishmanias. Para melhor orientar o desenvolvimento de tais nanopartículas seriam necessários estudos prévios para compreender como a infecção pelas leishmanias afeta as vias endocíticas dos macrófagos. Outro aspecto relevante a ser comentado é que nosso estudo foi conduzido utilizando ensaios *in vitro*, que representam um contexto simplificado em relação a complexidade de células que estão envolvidas na resposta imunológica ao longo da infecção natural pelas leishmanias. Há alguns anos, foi demonstrado em modelo murino que nanopartículas de óxido de ferro são interiorizadas via complemento por diversas células como monócitos, neutrófilos e linfócitos após injeção intravenosa (INTURI et al., 2015). Portanto, a realização de ensaios *in vivo* utilizando animais infectados com leishmanias poderá conduzir a um desfecho diferente do que foi obtido em nosso estudo. Embora não tenhamos demonstrado ação antiparasitária por parte das nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina, nosso trabalho permitiu avançar no conhecimento da interação entre nanopartículas de óxido de ferro no contexto da infecção pelas leishmanias e ainda pensar novas possibilidades de estudo empregando tais nanopartículas no contexto das leishmanioses.

6. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, concluiu-se que o tratamento de macrófagos infectados com nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina não diminuiu a carga parasitária, bem como a viabilidade das leishmanias intracelulares. Além disso, o tratamento

com as nanopartículas modulou positivamente a produção de óxido nítrico e de citocinas (IL-1 β , IL-6 e IL-10) pelas células parasitadas. Porém, tal modulação foi insuficiente para alterar a carga parasitária dos macrófagos, assim como a viabilidade das amastigotas intracelulares. Paralelamente, houve um percentual reduzido de células parasitadas interagindo com as nanopartículas, o que colaborou adicionalmente para a manutenção da carga parasitária, bem como da viabilidade dos parasitos intracelulares. Portanto, os dados obtidos sugerem que as nanopartículas de maghemita encapsuladas com polianilina não exercem atividade anti-*Leishmania*, tanto por não modularem acentuadamente os mecanismos microbicidas dos macrófagos, como também por encontrarem dificuldade de exercer ação antiparasitária direta devido à baixa capacidade de penetração nas células parasitadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAMOR, Emrah Sefik et al. Meglumine antimoniate-TiO₂@ Ag nanoparticle combinations reduce toxicity of the drug while enhancing its antileishmanial effect. **Acta tropica**, v. 169, p. 30-42, 2017.
- ABDAL DAYEM, Ahmed et al. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 120, 2017.
- ABDUL-CADER, Mohamed Sarjoon; AMARASINGHE, Aruna; ABDUL-CAREEM, Mohamed Faizal. Activation of toll-like receptor signaling pathways leading to nitric oxide-mediated antiviral responses. **Archives of virology**, v. 161, n. 8, p. 2075-2086, 2016.
- ALI, Attarad et al. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. **Nanotechnology, science and applications**, v. 9, p. 49, 2016
- ANDUJAR, Pascal et al. Role of metal oxide nanoparticles in histopathological changes observed in the lung of welders. **Particle and fibre toxicology**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2014.
- ADEREM, Alan; UNDERHILL, David M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual review of immunology**, v. 17, n. 1, p. 593-623, 1999.
- ALBALAWI, Aishah E. et al. Fe₃O₄@ piroctone olamine magnetic nanoparticles: Synthesize and therapeutic potential in cutaneous leishmaniasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 139, p. 111566, 2021.
- ALLAHVERDIYEV, Adil M. et al. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. **International journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2705, 2011.

- ALVEN, Sibusiso; ADERIBIGBE, Blessing Atim. Nanoparticles Formulations of Artemisinin and Derivatives as Potential Therapeutics for the Treatment of Cancer, Leishmaniasis and Malaria. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 748, 2020.
- ALVES, Érica Alessandra Rocha. Influência do tratamento com inibidores da protease do Vírus da Imunodeficiência Humana sobre funções dos macrófagos peritoneais murinos incubados in vitro com *Leishmania (L.) amazonensis*. 2013. xix, 136 f. Tese (Doutorado em Medicina)—Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- ALVES, Érica Alessandra Rocha et al. Anti-HIV drugs, lopinavir/ritonavir and atazanavir, modulate innate immune response triggered by *Leishmania* in macrophages: The role of NF- κ B and PPAR- γ . **International immunopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 314-324, 2015.
- ALVARENGA, Daniele Luísa Ribeiro et al. HIV aspartyl protease inhibitors modify the percentage of activated leukocytes, as well as serum levels of IL-17A and NO during experimental leishmaniasis. **International immunopharmacology**, v. 60, p. 179-188, 2018.
- ANVERSA, Laís et al. Human leishmaniasis in Brazil: a general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018.
- BACELLAR, Olívia et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, 2002.
- BAFGHI, Ali Fatahi et al. Magnesium oxide nanoparticles coated with glucose can silence important genes of *Leishmania major* at sub-toxic concentrations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 300-304, 2015.
- BERBERT, Taisa Rocha Navasconi et al. Pentavalent antimonials combined with other therapeutic alternatives for the treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Dermatology research and practice**, v. 2018, 2018.
- BENNIS, Issam et al. Psychosocial burden of localised cutaneous Leishmaniasis: a scoping review. **BMC Public Health**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2018.
- BERRY, Sarah L. et al. Nanoparticle-mediated magnetic hyperthermia is an effective method for killing the human-infective protozoan parasite *Leishmania mexicana* in vitro. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.
- BELKAID, Yasmine et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **The Journal of experimental medicine**, v. 194, n. 10, p. 1497-1506, 2001.
- BRASIL. Ministério da saúde. Leishmaniose Tegumentar (LT): o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Disponível em <http://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar> . Acesso em: 23 de janeiro de 2021
- BRASIL. Ministério da saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde: Brasília, 2017. (Disponível em: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf) [05 de fevereiro de 2021]. Acesso em: 23 de janeiro de 2021
- BRASIL. Ministério da saúde. Situação epidemiológica da leishmaniose tegumentar. 2019. Disponível em <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/25/LT-Gr--ficos-e-Mapas.pdf>. Acesso em: 23 de janeiro de 2021

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Coordenação-Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial, 2018. Nota informativa Nº 13/2020-CGZV/DEIDT/SVS/MS. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/17/nota-informativa-miltefosina.pdf> Acesso em: 30 de julho de 2021.

BRAY, R. S. et al. The effect of parasitization by *Leishmania mexicana mexicana* on macrophage function in vitro. **Acta tropica**, v. 40, n. 1, p. 29-38, 1983. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018 Sep 15;392(10151):951-970.

BRITO, Nayara C. et al. Intralesional infiltration versus parenteral use of meglumine antimoniate for treatment of cutaneous leishmaniasis: A cost-effectiveness analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 12, p. e0007856, 2019.

CAMPOS, Eunice Aparecida et al. Synthesis, characterization and applications of iron oxide nanoparticles-a short review. **Journal of Aerospace Technology and Management**, v. 7, n. 3, p. 267-276, 2015

CANTON, Johnathan. Macropinocytosis: new insights into its underappreciated role in innate immune cell surveillance. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2286, 2018.

CARNEIRO, Valéria Martins Araújo et al. Decreased phagocytic function in neutrophils and monocytes from peripheral blood in periodontal disease. **Journal of Applied Oral Science**, v. 20, n. 5, p. 503-509, 2012.

CARVALHO, Sílvia H. et al. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 4, p. 380-391, 2019.

CHARMOY, Melanie et al. The Nlrp3 inflammasome, IL-1 β , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **European journal of immunology**, v. 46, n. 4, p. 897-911, 2016.

CHAKRAVARTY, Jaya; SUNDAR, Shyam. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251-1265, 2019.

CUNNINGHAM, Anna C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and molecular pathology**, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.

DALZON, Bastien et al. Influences of Nanoparticles Characteristics on the Cellular Responses: The Example of Iron Oxide and Macrophages. **Nanomaterials**, v. 10, n. 2, p. 266, 2020.

DELAVARI, Mahdi et al. In vitro study on cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on promastigote and amastigote forms of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). **Iranian journal of parasitology**, v. 9, n. 1, p. 6, 2014.

DE MENEZES, Juliana Perrone Bezerra et al. *Leishmania* infection inhibits macrophage motility by altering F-actin dynamics and the expression of adhesion complex proteins. **Cellular microbiology**, v. 19, n. 3, p. e12668, 2017.

DEMICHELI, Cynthia et al. Oral delivery of meglumine antimoniate- β -cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 100-103, 2004.

DOS SANTOS MEIRA, Camila; GEDAMU, Lashitew. Protective or detrimental? Understanding the role of host immunity in leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 695, 2019.

DUKHINOVA, Marina S. et al. Metal oxide nanoparticles in therapeutic regulation of macrophage functions. **Nanomaterials**, v. 9, n. 11, p. 1631, 2019.

FANTI, Jacqueline Rodrigues et al. Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania amazonensis* promastigote and amastigote death in vitro. **Acta tropica**, v. 178, p. 46-54, 2018.

FEIJÓ, Daniel et al. Dendritic cells and *Leishmania* infection: adding layers of complexity to a complex disease. **Journal of immunology research**, v. 2016, 2016.

FIRMINO-CRUZ, Luan et al. How to B (e)-1 Important Cell During *Leishmania* Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 424, 2020.

FRANCO, Antonia MR et al. Nanoscaled hydrated antimony (V) oxide as a new approach to first-line antileishmanial drugs. **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 6771, 2016.

FRÉZARD, Frédéric; DEMICHELI, Cynthia; RIBEIRO, Raul R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.

GABRIEL, Áurea et al. Cutaneous leishmaniasis: the complexity of host's effective immune response against a polymorphic parasitic disease. **Journal of immunology research**, v. 2019, 2019.

GALVIS, María Claudia Rodríguez et al. Effectiveness and safety of amphotericin B deoxycholate, amphotericin B colloidal dispersion, and liposomal amphotericin B as third-line treatments for cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a retrospective study. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 102, n. 2, p. 274, 2020.

GREEN, Laura C. et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 12, p. 7764-7768, 1981.

GHORBANI, Masoud; FARHOUDI, Ramin. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. **Drug design, development and therapy**, v. 12, p. 25, 2018.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, Suênia da C. et al. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1437, 2017.

GONCALVES, Ricardo; CHRISTENSEN, Stephen M.; MOSSER, David M. Humoral immunity in leishmaniasis—Prevention or promotion of parasite growth?. **Cytokine**: X, v. 2, n. 4, p. 100046, 2020.

GOSSAGE, Sharon M.; ROGERS, Matthew E.; BATES, Paul A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International journal for parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027-1034, 2003.

GUPTA, Gaurav; OGHUMU, Steve; SATOSKAR, Abhay R. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. **Advances in applied microbiology**, v. 82, p. 155-184, 2013.

GUREL, Mehmet Salih; TEKIN, Burak; UZUN, Soner. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. **Clinics in dermatology**, v. 38, n. 2, p. 140-151, 2020.

HALDAR, Arun Kumar; SEN, Pradip; ROY, Syamal. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Molecular biology international**, v. 2011, 2011.

HASSAN, Dilawar et al. Biosynthesis of pure hematite phase magnetic iron oxide nanoparticles using floral extracts of *Callistemon viminalis* (bottlebrush): their physical properties and novel biological applications. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. sup1, p. 693-707, 2018.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. **Lancet**. 1999 Oct 2;354(9185):1191-9.

HONG, Ahyun et al. One health approach to leishmaniasis: Understanding the disease dynamics through diagnostic tools. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 809, 2020.

HORTA, Maria Fátima et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. **Journal of parasitology research**, v. 2012, 2012.

IBRAIM, Izabela Coimbra et al. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2013.

JOHNSON, Erin E. et al. Role of ferroportin in macrophage-mediated immunity. **Infection and immunity**, v. 78, n. 12, p. 5099-5106, 2010.

INTURI, Swetha et al. Papel modulador do revestimento de superfície de nanoworms de óxido de ferro superparamagnético na opsonização do complemento e captação de leucócitos. **ACS nano**, v. 9, n. 11, pág. 10758-10768, 2015.

JEBALI, Ali; KAZEMI, Bahram. Nano-based antileishmanial agents: a toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 6, p. 1896-1904, 2013.

JEBALI, Ali et al. Lectin coated MgO nanoparticle: its toxicity, antileishmanial activity, and macrophage activation. **Drug and chemical toxicology**, v. 37, n. 4, p. 400-409, 2014.

JIN, Rongrong et al. Iron oxide nanoparticles promote macrophage autophagy and inflammatory response through activation of toll-like Receptor-4 signaling. **Biomaterials**, v. 203, p. 23-30, 2019.

KHALIL, Ali Talha et al. Biosynthesis of iron oxide (Fe₂O₃) nanoparticles via aqueous extracts of *Sageretia thea* (Osbeck.) and their pharmacognostic properties. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 10, n. 4, p. 186-201, 2017.

KAMHAWI, Shaden. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

KAVOOSI, Gholamreza et al. Production of nitric oxide by murine macrophages induced by lipophosphoglycan of *Leishmania major*. **The Korean journal of parasitology**, v. 44, n. 1, p. 35, 2006.

KHATAMI, Mehrdad et al. Leishmanicidal activity of biogenic Fe₃O₄ nanoparticles. **Scientia pharmaceutica**, v. 85, n. 4, p. 36, 2017.

- KOSTKA, Susanna Lopez et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 5, p. 3039-3046, 2009.
- KHOURI, Ricardo et al. IFN- β harms the death of the superoxide-dependent parasite in human macrophages: evidence of a deleterious role for SOD1 in cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 4, p. 2525-2531, 2009.
- LANZA, Juliane S. et al. Polarity-sensitive nanocarrier for oral delivery of Sb (V) and treatment of cutaneous leishmaniasis. **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 2305, 2016.
- LIMA-JUNIOR, Djalma S. et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nature medicine**, v. 19, n. 7, p. 909-915, 2013.
- LOPES, Lourdes et al. Silver and gold nanoparticles from tannic acid: synthesis, characterization and evaluation of antileishmanial and cytotoxic activities. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2679-2689, 2018.
- LORÍA-CERVERA, Elsy Nalleli; ANDRADE-NARVAEZ, Fernando. The role of monocytes/macrophages in Leishmania infection: a glance at the human response. **Acta tropica**, v. 207, p. 105456, 2020.
- MAKSOURI, Hasnaa et al. Moroccan strains of Leishmania major and Leishmania tropica differentially impact on nitric oxide production by macrophages. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2017.
- Manual das células THP-1. Fonte: <http://bcrj.org.br/celula/Thp1-Peripheral-Blood-Leukemia-Human>. Acesso em 04 de fevereiro de 2021.
- Manual de instrução do kit de coloração hematológica Instant-Prov. Fonte: <https://silo.tips/download/instant-prov-conjunto-de-corantes-para-coloracao-diferencial-rapida-em-hematologi>. Acesso em 04.02.2021.
- Manual de instrução do BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit Instruction. Fonte: <https://www.bdbiosciences.com/ds/pm/others/23-11112.pdf>. Acesso em: 04 de fevereiro de 2021.
- MASPI, Nahid; ABDOLI, Amir; GHAFARIFAR, Fathemeh. Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and global health**, v. 110, n. 6, p. 247-260, 2016.
- MCGWIRE, B. Satoskar; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.
- MEDINA-LLAMAS, Juan Carlos et al. Use of magnetic polyaniline/maghemite nanocomposite for DNA retrieval from aqueous solutions. **Journal of colloid and interface science**, v. 434, p. 167-174, 2014.
- MENDONÇA, Ayrles Silva Gonçalves Barbosa et al. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de Óxido de Ferro para o tratamento de leishmaniose cutânea via hipertermia por ondas curtas. 2017.
- MINODIER, Philippe; PAROLA, Philippe. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel medicine and infectious disease**, v. 5, n. 3, p. 150-158, 2007.

- MULENS-ARIAS, Vladimir; ROJAS, José Manuel; BARBER, Domingo F. The intrinsic biological identities of iron oxide nanoparticles and their coatings: Unexplored territory for combinatorial therapies. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, p. 837, 2020.
- NADHMAN, Akhtar et al. PEGylated silver doped zinc oxide nanoparticles as novel photosensitizers for photodynamic therapy against Leishmania. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 77, p. 230-238, 2014.
- NAFARI, Amir et al. Nanoparticles: New agents toward treatment of leishmaniasis. **Parasite epidemiology and control**, p. e00156, 2020.
- NAIRZ, Manfred et al. Iron and innate antimicrobial immunity—Depriving the pathogen, defending the host. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 48, p. 118-133, 2018.
- NAZIR, Samina et al. Antileishmanial activity and cytotoxicity of ZnO-based nanoformulations. **International journal of nanomedicine**, v. 14, p. 7809, 2019.
- NOGUEIRA, Paula M. et al. Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* strains display immunomodulatory properties via TLR4 and do not affect sand fly infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004848, 2016.
- OLIVIER, Martin; GREGORY, David J.; FORGET, Geneviève. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 2, p. 293-305, 2005.
- OLEKHNOVITCH, Romain; BOUSSO, Philippe. Induction, propagation, and activity of host nitric oxide: lessons from *Leishmania* infection. **Trends in parasitology**, v. 31, n. 12, p. 653-664, 2015.
- OSERO, Bernard Ong'ondo et al. Unravelling the unsolved paradoxes of cytokine families in host resistance and susceptibility to *Leishmania* infection. **Cytokine**: X, p. 100043, 2020.
- PODINOVSKAIA, Maria; DESCOTEAUX, Albert. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111-129, 2015.
- PONTE-SUCRE, Alicia et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 2017.
- RAMOS, Patricia Karla Santos et al. In vitro cytokines profile and ultrastructural changes of microglia and macrophages following interaction with *Leishmania*. **Parasitology**, v. 141, n. 8, p. 1052-1063, 2014.
- REITHINGER, Richard et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.
- RIBEIRO, Christiana Vargas et al. *Leishmania infantum* induces high phagocytic capacity and intracellular nitric oxide production by human proinflammatory monocyte. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, 2020.
- ROSSI, Matteo; FASEL, Nicolas. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions!. **International immunology**, v. 30, n. 3, p. 103-111, 2018.
- TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research** 6, 750. 2017.

- ROSTAMIAN, Mosayeb; AKYA, Alisha; NIKNAM, Hamid M. Heterogeneity of humoral immune response to *Leishmania tropica* in an experimental model. **Parasitology research**, v. 118, n. 4, p. 1231-1237, 2019.
- SACKS, David; NOBEN-TRAUTH, Nancy. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.
- SALEEM, Kiran et al. Applications of nanomaterials in leishmaniasis: a focus on recent advances and challenges. **Nanomaterials**, v. 9, n. 12, p. 1749, 2019.
- ŠAMAJ, Jozef et al. Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. **Plant physiology**, v. 135, n. 3, p. 1150-1161, 2004.
- SAZGARNIA, Ameneh et al. Antiparasitic effects of gold nanoparticles with microwave radiation on promastigotes and amastigotes of *Leishmania major*. **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, n. 1, p. 79-86, 2013.
- SEDDIGHI, Nazanin Sadat; SALARI, Samira; IZADI, Ali Raza. Evaluation of antifungal effect of iron-oxide nanoparticles against different *Candida* species. **Iet Nanobiotechnology**, v. 11, n. 7, p. 883-888, 2017.
- SHENG-NAN, Sun et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. **Chinese Physics B**, v. 23, n. 3, p. 037503, 2014.
- SCORZA, Breanna M.; CARVALHO, Edgar M.; WILSON, Mary E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, 2017.
- SCOTT, Phillip et al. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **The Journal of experimental medicine**, v. 168, n. 5, p. 1675-1684, 1988.
- SCOTT, Phillip; NOVAIS, Fernanda O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016.
- SIADAT, Amir Hossein et al. Heat therapy for cutaneous leishmaniasis: A literature Review. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 26, n. 1, p. 15, 2021.
- STEVERDING, Dietmar. The history of leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2017.
- SUNDAR, Shyam; SINGH, Om Prakash. Molecular diagnosis of visceral leishmaniasis. **Molecular diagnosis & therapy**, v. 22, n. 4, p. 443-457, 2018.
- SUNTER, Jack; GULL, Keith. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, 2017.
- UENO, Norikiyo; WILSON, Mary E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012.
- UNDERHILL, David M.; OZINSKY, Adrian. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 1, p. 825-852, 2002.

- VALE-COSTA, Silvia et al. Iron overload favors the elimination of *Leishmania infantum* from mouse tissues through interaction with reactive oxygen and nitrogen species. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 2, p. e2061, 2013.
- VAN GRIENSVEN, Johan; DIRO, Ermias. Visceral leishmaniasis: recent advances in diagnostics and treatment regimens. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 1, p. 79-99, 2019.
- VIANA, Agostinho Gonçalves et al. Infection of human monocytes with *Leishmania infantum* strains induces a downmodulated response when compared with infection with *Leishmania braziliensis*. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1896, 2018.
- VILLEGAS, Manuela Giraldo et al. Poly (acrylic acid) -Coated Iron Oxide Nanoparticles interact with mononuclear phagocytes and decrease platelet aggregation. **Cellular immunology**, v. 338, p. 51-62, 2019.
- VOGT, Carmen et al. Proteomics analysis reveals distinct corona composition on magnetic nanoparticles with different surface coatings: implications for interactions with primary human macrophages. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0129008, 2015.
- VOLPEDO, Greta et al. Nanoparticulate drug delivery systems for the treatment of neglected tropical protozoan diseases. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, 2019.
- WANASEN, Nanchaya; XIN, Lijun; SOONG, Lynn. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. **International journal for parasitology**, v. 38, n. 3-4, p. 417-429, 2008.
- WANG, Guankui et al. Feraheme (ferumoxytol) is recognized by proinflammatory and anti-inflammatory macrophages via scavenger receptor type AI/II. **Molecular pharmaceuticals**, v. 16, n. 10, p. 4274-4281, 2019.
- Wiesner, Christiane et al. Macrophage migration and matrix degradation in 2D and 3D settings. **Cell Adhesion & Migration**, v. 8, n. 3, p. 179-191, 2014.
- WOLF-GROSSE, Susann et al. Iron oxide nanoparticles enhance Toll-like receptor-induced cytokines in a particle size- and actin-dependent manner in human blood. **Nanomedicine**, v. 13, n. 14, p. 1773-1785, 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Facts sheets detail Leishmaniasis.2020. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 01 de março de 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis | Epidemiology. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em: 23 de janeiro de 2020
- WU, D. Signaling mechanisms for regulation of chemotaxis. **Cell Research** 2005; 15(1):52-56
- ZAGANEH et al. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. **Nat Nanotechnol** 2016; 11(11): 986–994.

ZHANG, Wenyue et al. Differently Charged Super-Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles Preferentially Induced M1-Like Phenotype of Macrophages. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 537, 2020.

ZHU, Motao et al. Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. **Accounts of chemical research**, v. 46, n. 3, p. 622-631, 2013.