



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

KEVEN DA SILVA SANTOS

***Leishmania braziliensis* RESISTENTE AO GLUCANTIME MODULA A RESPOSTA
DE MACRÓFAGOS DE PERFIL M1 IN VITRO**

FORTALEZA

2025

KEVEN DA SILVA SANTOS

Leishmania braziliensis RESISTENTE AO GLUCANTIME MODULA A RESPOSTA DE
MACRÓFAGOS DE PERFIL M1 IN VITRO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do grau de Bacharelado em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S2351 Santos, Keven da Silva.
Leishmania braziliensis resistente ao Glucantime modula a resposta de macrófagos de perfil M1 in vitro /
Keven da Silva Santos. – 2025.
39 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2025.
Orientação: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira.

1. Leishmaniose. 2. Mediadores inflamatórios. 3. Antimoniato de meglumina. I. Título.

CDD 570

KEVEN DA SILVA SANTOS

Leishmania braziliensis RESISTENTE AO GLUCANTIME MODULA A RESPOSTA DE
MACRÓFAGOS DE PERFIL M1 IN VITRO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 27/02/2025.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Jania Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Erika Freitas Mota
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Naya Lúcia de Castro Rodrigues

Ao meu avô, Luis do Carmo (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Francisco Edilson e Gelma Maria, por me darem todo o apoio material e emocional para seguir nessa jornada, espero que eu possa lhes pagar em dobro toda a dedicação e esforço que tiveram para me propiciar ser quem sou hoje.

À minha irmã, Kelly, por ter me ensinado como ser uma pessoa forte e confiante e por me amar incondicionalmente.

Ao meu sobrinho, Arthur, por me dar a oportunidade mais linda de todo o mundo, de ensinar uma criança a ser sempre uma pessoa melhor.

À minha família, que sempre me serviu como um porto seguro e um lugar onde posso ser só uma criança novamente. Em especial, à minha tia Nelma Maria, que sempre me demonstrou carinho, amor e cuidados.

À Profa. Dra. Maria Jania Teixeira, pela orientação e por ser uma excelente professora e um ser humano que me inspira. Por ser amável, compreensiva, carinhosa e por me receber de braços abertos em seu laboratório.

À Profa. Dra. Erika Freitas Mota, por ter me dado a oportunidade de ser seu monitor na disciplina de Imunologia e por inspirar, aos alunos da Biologia, como ser uma profissional de qualidade.

Às mestrandas do Laboratório de Parasitologia da UFC, Amanda Holanda, Raquel Pinheiro e Ana Livia, por terem paciência de me ensinarem e me permitirem aprender, acompanhando e auxiliando nos seus experimentos.

Aos meus colegas de estágio supervisionado, Sabrina e Gabriel, por garantirem que o clima no laboratório seja amigável e hospitaleiro para qualquer um que esteja começando no laboratório.

Aos profissionais do Setor de Parasitologia da UFC; Naya Rodrigues; Fabíola Fernandes, Josias Martins e Dr. Alan Rodrigo Soares Maia, principalmente pelo aprendizado e por sempre me receberem com carinho.

Aos meus amigos, que considero minha segunda família, Alfredo, Jade, Cauê e Jonatan, por me permitirem me despir de minhas máscaras sociais e ser somente eu, simples e puro.

Aos meus colegas do primeiro semestre, quando entrei na UFC vocês moldaram minha nova vida e lutaram junto comigo contra todas as adversidades da formação.

Aos meus colegas do segundo semestre, por me aceitarem no pós-pandemia e me permitirem fazer parte dessa nova família, em especial, agradeço à Rayça, Arthur Vitor, Flávinny, Lucas Cipriano, Laís, Hellen e Gabriel Caesar.

À professora Erika Freitas Mota e à Dra. Naya Lúcia de Castro Rodrigues, por aceitarem participar da banca examinadora, pelo tempo que dedicaram à leitura do trabalho, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À minha *alma mater*, a Universidade Federal do Ceará, por ser uma “mãe” dura e rígida e fornecer uma educação gratuita de qualidade e respeitosa para os alunos.

Aos professores do Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado, muitos deles, alunos egressos do próprio curso, por me fornecerem uma educação transformadora, ensinando-me Habilidades e Competências para que após formado, eu possa ser chamado de fato de Biólogo.

E finalmente, a mim, por ter tomado a decisão tão difícil nos tempos atuais, de me tornar um cientista. Por ser o primeiro de minha família a me formar em uma Universidade Pública. Por ser, primeiramente, bom e amável antes de todas as coisas.

“Quando acordei hoje de manhã, eu sabia quem eu era, mas acho que já mudei muitas vezes desde então.” (CARROLL, 1832, p. 72).

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar americana (LTA) é uma doença com alta incidência e impacto na saúde pública no Brasil, tendo a *Leishmania braziliensis* como o principal agente etiológico. Glucantime (antimoniato de meglumina) é o fármaco utilizado para o tratamento, entretanto, nas últimas décadas, o surgimento de cepas resistentes tem dificultado o tratamento. Os macrófagos são as células hospedeiras de *Leishmania* e desempenham um papel crucial na resposta contra estes parasitos. A ativação para macrófagos inflamatórios (M1) promove a eliminação do parasito, entretanto, pouco se sabe sobre a modulação da plasticidade destas células induzida por cepa de *L. braziliensis* resistente ao tratamento. O principal objetivo deste estudo foi avaliar a resposta de macrófagos polarizados in vitro, para os perfis M1 e M2, à infecção por cepas de *Leishmania braziliensis* resistente (LbR) ao antimonio de meglumina, comparada com a suscetível (LbS). Para isso, macrófagos J774 foram polarizados para M1 (LPS, 1µg/ml) e para M2 (IL-4, 10ng/ml) e infectados com LbR ou LbS e avaliadas: carga parasitária, produção de citocinas (macrófagos M1: TNF- α , IL-12; macrófagos M2: IL-4 e IL-10) e de óxido nítrico (NO), com 24 e 48 h. Os resultados mostraram que macrófagos M1 infectados com LbR apresentaram maior carga parasitária do que aqueles com LbS, nos dois tempos avaliados. Em relação aos mediadores inflamatórios, observou-se que a infecção com LbR induziu níveis mais baixos das citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-12, e de NO, em macrófagos M1, quando comparada com LbS, com 24 e 48 h. Ao contrário, em macrófagos M2, LbR desencadeou produção significativa das citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e IL-4, enquanto LbS não induziu produção significativa destas citocinas, quando comparada com LbR, nos tempos avaliados. Estes dados sugerem que a cepa LbR resistente ao tratamento com antimonio de meglumina, é capaz de modular, tanto a produção de citocinas inflamatórias, quanto de NO, em M1, e a produção de citocinas regulatórias em M2. Desta forma, tornando o ambiente intracelular menos inflamatório e favorável à sua sobrevivência, o que pode levar à persistência do parasito por mais tempo, dificultando o tratamento e a cura da doença. Esses achados abrem perspectivas para mais estudos que possam aprofundar o entendimento sobre os mecanismos de resistência das leishmânias às drogas utilizadas para o tratamento da infecção, o que pode, neste caso, contribuir para o desenvolvimento de novas terapias mais eficazes.

Palavras-chave: leishmaniose; mediadores inflamatórios; antimonio de meglumina.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a disease with high incidence and significant impact on public health in Brazil, with *Leishmania braziliensis* being the primary etiological agent. Glucantime (meglumine antimoniate) is the drug used for treatment; however, in recent decades, the emergence of resistant strains has complicated treatment. Macrophages are the host cells for *Leishmania* and play a crucial role in the response against these parasites. Activation to inflammatory macrophages (M1) promotes parasite elimination, but little is known about the modulation of macrophage plasticity induced by a treatment-refractory *L. braziliensis* strain. The main objective of this study was to evaluate the response of macrophages polarized in vitro to M1 and M2 profiles upon infection with *Leishmania braziliensis* strains resistant (LbR) and susceptible (LbS) to meglumine antimoniate. J774 macrophages were polarized to M1 (LPS, 1 µg/ml) and M2 (IL-4, 1 µg/ml), then infected with LbR or LbS strains. Parasite load, cytokine production (M1 macrophages: TNF- α , IL-12; M2 macrophages: IL-4, IL-10), and nitric oxide (NO) production were evaluated at 24- and 48-hours post-infection. The results showed that M1 macrophages infected with LbR exhibited a higher parasite load than those infected with LbS at both time points. Regarding inflammatory mediators, infection with LbR induced lower levels of inflammatory cytokines (TNF- α and IL-12) and NO in M1 macrophages compared to LbS at both 24 and 48 hours. In contrast, LbR induced significant production of the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-4 in M2 macrophages, while LbS did not induce significant cytokine production compared to LbR at the evaluated time points. These findings suggest that the LbR strain, refractory to meglumine antimoniate treatment, can modulate the production of inflammatory cytokines and NO in M1 macrophages, as well as regulatory cytokine production in M2 macrophages. This creates a less inflammatory intracellular environment, favoring the parasite's survival and potentially prolonging the infection, making treatment and disease cure more challenging. These results open new perspectives for further studies to deepen the understanding of *Leishmania* resistance mechanisms to current treatments, which may contribute to the development of more effective therapies.

Keywords: leishmaniasis; inflammatory mediators; meglumine antimoniate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida do gênero <i>Leishmania</i>	16
Figura 2 Carga parasitária em macrófagos de perfil M1 infectados com <i>L. braziliensis</i> resistente (LbR) e suscetível (LbS) ao antimoniato de meglumina in vitro.....	24
Figura 3 Produção de citocinas inflamatórias (TNF-a e IL-12) em macrófagos de perfil M1 infectados com <i>L. braziliensis</i> resistente e suscetível ao antimoniato de meglumina in vitro.....	25
Figura 4 Produção de citocinas inflamatórias (TNF-a e IL-12) em macrófagos de perfil M1 infectados com <i>L. braziliensis</i> resistente e suscetível ao antimoniato de meglumina in vitro.....	26
Figura 5 Produção de óxido nítrico por macrófagos de perfil M1 infectados com <i>L. braziliensis</i> resistente e suscetível ao antimoniato de meglumina in vitro.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AM	Antimoniato de Meglumina
ARG	Arginase
B.O.D.	Biochemical Oxygen Demand (Incubadora)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EROs/ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
HEPA	High-Efficiency Particulate Air
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LbR	Cepa de <i>Leishmania braziliensis</i> resistente ao Antimoniato de Meglumina
LbS	Cepa de <i>Leishmania braziliensis</i> suscetível ao Antimoniato de Meglumina
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LD	Leishmaniose Disseminada
LM	Leishmaniose Mucosa
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
N.N.N.	Meio de cultura Novy, MacNeal, and Nicolle
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PGE2	Prostaglandina E2
RPMI	Meio de cultura celular RPMI
SBF	Soro Bovino Fetal
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	JUSTIFICATIVA	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	Objetivo geral	21
3.2	Objetivos específicos	21
4	METODOLOGIA	22
4.1	Parasitas	22
4.2	Cultura e polarização de macrófagos J774	22
4.3	Infecção de macrófagos	23
4.4	Determinação da taxa de infecção de macrófagos M1	23
4.5	Dosagem de citocinas	24
4.6	Avaliação dos níveis de Óxido Nítrico	24
4.7	Análise estatística	24
5	RESULTADOS	26
5.1	Carga parasitária em macrófagos de perfil M1 e infectados com <i>L. braziliensis</i> resistente e suscetível ao antimoniato de meglumina in vitro	25
5.2	Quantificação de citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos de perfil M1 infectados com <i>L. braziliensis</i> resistente e suscetível ao AM in vitro	27
5.3	Quantificação de citocinas anti-inflamatórias produzidas por macrófagos de perfil M2 infectados com <i>L. braziliensis</i> resistente e suscetível ao AM in vitro	28
5.4	Quantificação de óxido nítrico produzido por macrófagos de perfil M1 e infectados com <i>L. braziliensis</i> resistente e suscetível ao antimoniato de meglumina in vitro	30
6	DISCUSSÃO	31
7	CONCLUSÃO	34
8	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias, cosmopolitas, porém com ampla e significativa incidência na zona tropical, elencadas entre as principais doenças tropicais negligenciadas. São preconizadas como doenças negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) devido ao seu alto coeficiente de detecção e a capacidade de algumas de suas manifestações clínicas produzirem deformidades (BRASIL, 2017). A doença é causada por mais de 21 espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, possuindo um amplo espectro clínico de manifestações, como visceral e cutâneas (PEARSON; DE QUEIROZ SOUSA, 1996; SCORZA et al., 2017).

Esta enfermidade apresenta indicadores de novos casos inaceitáveis e investimentos ainda reduzidos, ocorrendo, em sua maioria, em populações de baixa renda, com saneamento inadequado e exposição aos vetores. Estima-se que estas parasitoses são endêmicas atualmente em 99 países, com aproximadamente 12 milhões de infectados, 350 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a doença, e cerca de 2 milhões de novos casos ocorrendo a cada ano (WHO, 2023).

A OMS calcula que 70% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria (WHO, 2010), sendo o Brasil o único representante das Américas na lista de países que concentram 90% dos novos casos, figurando ao lado de Bangladesh, Índia, Etiópia, Nepal e Sudão (FIOCRUZ, 2012).

A Leishmaniose Cutânea é denominada nas Américas de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). É considerada uma doença de caráter epidemiológico, tendo seus padrões de distribuição fortemente relacionados a áreas de recente colonização e às populações mais vulneráveis (NEGRÃO; FERREIRA, 2014). As espécies *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* são os agentes etiológicos mais relevantes da LTA no Brasil (OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012; SCORZA et al., 2017).

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam ciclo de vida heteroxênico, vivendo alternadamente nos insetos vetores e hospedeiros vertebrados. Insetos da subfamília Phlebotominae são os vetores destes parasitos, sendo o gênero *Phlebotomus* o principal transmissor no Velho Mundo e o gênero *Lutzomyia* o principal transmissor nas Américas (BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017; PEARSON; DE QUEIROZ SOUSA, 1996).

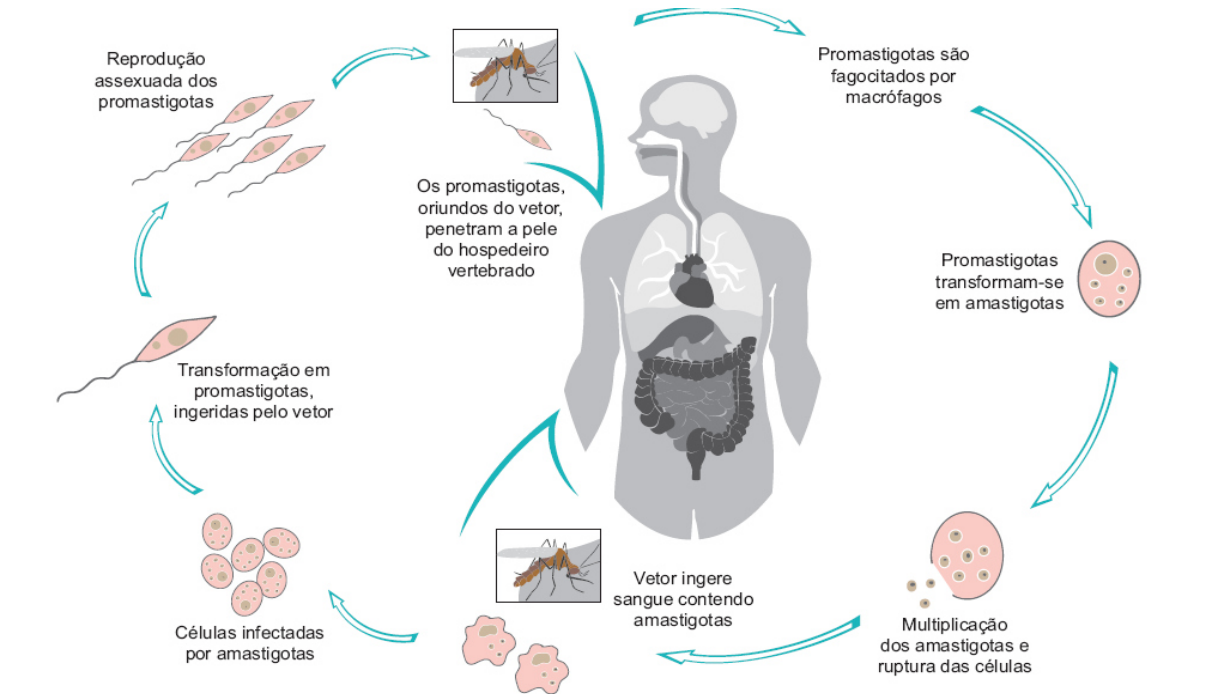
Os parasitos do gênero *Leishmania* exibem um ciclo de vida biológico digenético com morfologia variável que alterna entre dois principais estágios de desenvolvimento: a forma promastigota flagelada de vida livre, encontrada no intestino médio de vetores flebotomíneos

e as amastigotas, formas intracelulares obrigatórias em vacúolos parasitóforos das células fagocíticas de vertebrados, principalmente em macrófagos (LIU; UZONNA, 2012; SERAFIM et al., 2018).

O ciclo de vida de *Leishmania* se dá como ilustrado na Figura 1. As fêmeas de flebotomíneos fazem repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado mamífero infectado, e desta forma, acabam por ingerir, junto com o sangue, macrófagos infectados com as formas amastigotas (BATES, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003). No inseto, as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, forma proliferativa e não infectante que se multiplicam no intestino médio do vetor (PEARSON; DE QUEIROZ SOUSA, 1996; BATES, 2007).

Ao final da multiplicação, influenciadas por mudanças no pH e depleção de nutrientes, através de um processo chamado metaciclogênese, ocorre a transformação de promastigota procíclica na forma promastigota metacíclica, estágio infectante para mamíferos (BATES, 2007). As promastigotas metacíclicas migram para as partes mais anteriores do intestino do inseto (LESLIE et al., 2002), sendo regurgitadas durante o repasto sanguíneo (BATES, 2007), e então, fagocitadas por macrófagos presentes na derme, além de neutrófilos e células dendríticas (HANDMAN; BULLEN, 2002; NEVES et al., 2016). O englobamento do parasito forma o vacúolo parasitóforo, que se funde com lisossomos, formando um fagolisossomo, onde as promastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas, formas arredondadas, com flagelo internalizado, que se multiplicam, rompem as membranas dos macrófagos e infectam novas células presentes no local ou após disseminação (PEARSON; DE QUEIROZ SOUSA, 1996; REITHINGER et al., 2007).

Figura 1 - Ciclo de vida de *Leishmania* spp.



Fonte: Batista-Siqueira, 2020 (Adaptado).

A LTA pode ocasionar um amplo espectro de manifestações clínicas, dependendo da espécie do parasito e do estado imunológico do hospedeiro (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). As manifestações clínicas da LTA são subdivididas em Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Mucosa (LM), Leishmaniose Disseminada (LD) e Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) (SCORZA et al., 2017).

A LCL, reconhecida como a forma clássica da doença, tem como evolução clínica o surgimento de uma a três pápulas, formadas no local da picada do vetor, que evoluem de forma progressiva para uma úlcera, por um período de duas semanas a seis meses (SCORZA et al., 2017). A LM pode ocorrer após a cura clínica, espontânea ou terapêutica, da LCL e é caracterizada por ulcerações da mucosa nasal e perfuração do septo (nariz de tapir), podendo se estender para lábios, bochechas, palatos, faringe, laringe, traqueia, podendo causar complicações respiratórias e, por conseqüências, grande morbidade (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014; PEARSON; DE QUEIROZ SOUZA, 1996).

A LD é uma forma rara da doença, ocorrendo principalmente em indivíduos imunossuprimidos, e é caracterizada pelo surgimento de muitas lesões polimórficas, que

variam entre dezenas e centenas de lesões, distantes do sítio de inoculação, que podem ter formas acneiformes, ulceradas, nodulares, verrucosas ou em placa (SCORZA et al., 2017), e que comprometem mais de um seguimento corpóreo, com predileção por áreas expostas, como membros, face e tronco (CARVALHO et al., 1994). A LCD tem como agente etiológico a *L. amazonensis* e é também conhecida como LCD anérgica (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014; SCORZA et al., 2017). Os pacientes apresentam múltiplas lesões, não ulceradas, predominantemente papulares ou nodulares, com uma abundância de formas amastigotas em seu interior, podendo não responder ao tratamento (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). A espécie *Leishmania braziliensis* é causadora de três destes morfotipos: LCL, LM e LD (COSTA et al., 2009).

A *Leishmania* tem como células hospedeiras alvos os macrófagos, e isso é importante para a determinação do curso da infecção. No combate à infecção por *Leishmania*, os monócitos/macrófagos desempenham função importante, agindo como a parte efetora da imunidade adaptativa, mediada por citocinas produzidas por linfócitos T (SCOTT; NOVAIS, 2016). Linfócitos Th1, produtores de IFN- γ , ativam a produção de NO induzível sintase (iNOS) em macrófagos e, desta forma, ocorre a morte dos parasitos mediada por Óxido Nítrico (NO). Em contrapartida, linfócitos Th2 produzem citocinas como IL-4 e IL-10, inibidoras da ativação de macrófagos, que promovem o aumento da expressão de arginase e a progressão da infecção parasitária (LIU; UZONNA, 2012).

Por analogia à divisão entre células Th1 e Th2, os fenótipos de macrófagos são divididos em M1 (macrófagos classicamente ativados) e M2 (macrófagos ativados alternativamente), sendo o último subdividido em três subtipos: M2a, M2b e M2c (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018). Os macrófagos M1, atuam como primeira linha de defesa contra parasitos intracelulares, desempenham um papel central na resposta imunológica desencadeada contra infecções ativada por Th1, secretando citocinas, como IL-12 e CXCL10 (ROJAS et al., 2015; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018; VELLOZO et al., 2021). Para a eliminação do patógeno intracelular, é crucial que haja retroalimentação entre macrófagos M1 e a existência de uma subpopulação de linfócitos Th1, produzindo citocinas como IFN- γ e TNF- α , que ativam M1, levando a uma explosão oxidativa por NO, tendo linfócitos Th1 como as principais fontes de IFN- γ na cronicidade da doença (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Em contraponto, macrófago M2 é caracterizado pela produção de poliaminas via ativação da enzima Arginase (ARG), de ureia e de L-ornitina, que são favoráveis ao crescimento de *Leishmania* no interior do macrófago, favorecendo a sobrevivência do parasito

e a progressão da doença (ARANGO DUQUE; DESCOTEAU, 2014; MUXEL et al., 2017). Em relação aos subtipos de M2, o perfil M2a é altamente anti-inflamatório e atua no reparo dos tecidos, sendo capaz de depositar matriz extracelular e produzir TGF- β , inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , enquanto os perfis M2b e M2c atuam como células reguladoras, secretando IL-10 e limitando a progressão da inflamação (ROJAS et al., 2015; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018; VELLOZO et al., 2021).

O mecanismo de destruição de parasitos por macrófagos se desencadeia após a fagocitose, através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs/ROS) pelo sistema NADPH, e pela produção de NO, induzida por estimulação de macrófagos M1 sob a estimulação por IFN- γ , que induz a produção de iNOS (BOGDAN et al., 1990; LIU; UZONNA, 2012; ROJAS et al., 2015).

Como mecanismo de evasão à resposta imune, os parasitos são capazes de inibir a produção de IL-12, bem como induzir a expressão de IL-10 e TGF- β , citocinas características dos subtipos M2a e M2b, que contribuem para a sobrevivência de *Leishmania* (FILARDY et al., 2011; LIU; UZONNA, 2012). Além disso, as amastigotas apresentam atividade enzimática elevada capaz de eliminar as EROs, utilizando glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase (DEREURE et al., 2003; CECILIO et al., 2014).

Com a diminuição de IL-12, a produção de IFN- γ também é diminuída, o que dificulta a ativação de macrófagos para o perfil M1 e interfere na destruição dos parasitos (KAYE; SCOTT, 2011). Portanto, a presença de mediadores inflamatórios, como IL-10, IL-4, PGE2 e TGF- β , são características de suscetibilidade de macrófagos à proliferação de *Leishmania* (FILARDY et al., 2011). Existem também cepas de *Leishmania* que são resistentes ao NO, resistência esta que está também associada à resistência ao antimônio, como já demonstrado por Souza et al., 2010 e por Alves, 2021. Além disso, a resistência ao NO também parece estar associada à severidade da doença (GIUDICE et al., 2007).

Para o tratamento da LTA, as drogas de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes, sendo utilizado no Brasil o antimoniato de meglumina (AM) ou Glucantime® (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Estas medicações requerem administração injetável e supervisão clínica ou hospitalização durante o tratamento, por causa dos efeitos colaterais e toxicidade (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRIGUEZ, 2001). Infelizmente, são diversos os efeitos colaterais causados pelos antimoniais, como danos hepáticos e renais, pancreatite, anorexia, artralgia, mialgia, náusea, vômito, hepato e cardiotoxicidade e até morte súbita, se usados em altas doses (PEARSON; DE QUEIROZ SOUZA, 1996; AMATO et al., 2008; SINGH et al., 2023).

Quanto ao mecanismo de ação, existem hipóteses de que o AM cause intervenção nas atividades bioenergéticas da amastigota de *Leishmania*, podendo interferir no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise, o que causaria uma depleção de ATP, levando o parasito à morte (BALAÑA-FOUCE, 1998; BENTO et al., 2013). Alguns estudos sugerem também, como mecanismo de ação, que os antimoniais pentavalentes, após penetrarem no organismo, passam por biotransformação para antimoniato trivalente, mais tóxico e letal para o parasito, ligando-se a polipeptídios, inibindo as enzimas da via glicolítica, da beta-oxidação e a DNA topoisomerase, provocando o efluxo de tripanotona e glutatona (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; AMATO et al., 2008; SOUZA et al., 2010).

Também pode determinar alterações na membrana plasmática parasitária, observadas por microscopia eletrônica (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; HALDAR; SEN; ROY, 2011). Além disso, foi mostrado que o tratamento com antimoniato de meglumina é capaz de aumentar a fagocitose, induzir a produção de ânion superóxido, TNF- α e, conseqüentemente, NO por células do SMF, apresentando efeito imunomodulador (MUNIZ-JUNQUEIRA; PAULA-COELHO, 2008; DE SALDANHA et al., 2012).

O mal uso dos antimoniais, principalmente devido a tratamentos irregulares e incompletos, expõe os parasitos a pressões seletivas que guiam a evolução de resistência, o que é, de longe, o maior problema que delinea o tratamento com os antimoniais na atualidade (BLUM et al., 2004; CROFT; SEIFERT; YARDLEY, 2006). Os mecanismos pelos quais as leishmânias resistem aos antimoniais são diversos, entre eles, a diminuição da redução da forma pentavalente para a trivalente, aumento de enzimas e precursores de glutatona e tripanotona, ou sequestro e acúmulo do antimonial em vacúolos (CROFT; SHYAM; FAIRLAMB, 2006).

A partir do exposto acima, surgem questionamentos se cepas de *L. braziliensis* resistentes ao tratamento poderiam modular a resposta celular de macrófagos que infectam, possibilitando, assim, sobreviver e proliferar em macrófagos de diferentes perfis. Daí surge a relevância deste estudo, que esclarece, em um modelo in vitro, a diferença na produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e óxido nítrico (NO), em macrófagos infectados com *L. braziliensis* resistente ao Glucantime, em comparação com a cepa suscetível.

2 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é um sério problema de saúde pública nas Américas. No Brasil, um número significativo de pessoas é infectado anualmente por espécies de *Leishmania* causadoras das manifestações clínicas de LTA, que embora não causem mortalidade em sua maioria, podem causar complicações e alta morbidade, como no caso das leishmanioses mucosa, difusa e disseminada. *Leishmania braziliensis* é o agente etiológico mais importante da LTA no Brasil, além disso, é a única espécie encontrada no Ceará causadora de LTA.

Um dos grandes desafios para o controle e tratamento das leishmanioses na atualidade tem sido o surgimento de cepas de *Leishmania* resistentes aos antimoniais pentavalentes, utilizados como tratamento de primeira escolha para a doença, entre eles o antimoniato de meglumina (Glucantime®). Os emergentes relatos da resistência ao antimônio têm comprometido a habilidade de controlar a doença. Além disso, pode significar uma situação alarmante frente ao aumento dos casos de coinfeção com HIV.

Com a existência de suscetibilidade e resistência de cepas de *Leishmania* ao tratamento pelos antimoniais e da resposta imune celular distinta na infecção por estes parasitos, ainda persistem muitas questões não elucidadas. Uma destas questões é se cepas de *Leishmania* resistentes ao tratamento poderiam modular a resposta imune desencadeada por macrófagos de perfil M1 e assim, facilitar sua sobrevivência.

Uma vez que tais questões sejam esclarecidas, pode-se pensar em uma intervenção terapêutica que auxilie melhor no processo inflamatório e de cicatrização da doença, e que evite efeitos indesejáveis associados às funções alteradas dos macrófagos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a resposta de macrófagos polarizados in vitro para os perfis M1 e M2, à infecção por cepa de *Leishmania braziliensis* resistente ao antimonio de meglumina, comparada com a cepa suscetível.

3.2 Objetivos específicos

- Induzir a diferenciação de macrófagos J774 em M1 (inflamatório) e M2 (anti-inflamatório) in vitro.
- Comparar a carga parasitária em macrófagos de perfil M1 por *L. braziliensis* resistente e suscetível ao antimonio de meglumina.
- Determinar a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-12) e óxido nítrico em macrófagos de perfil M1 infectados por *L. braziliensis* resistente e suscetível ao antimonio de meglumina.
- Determinar a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) em macrófagos de perfil M2 infectados por *L. braziliensis* resistente e suscetível ao antimonio de meglumina.

4 METODOLOGIA

4.1 Parasitos

As linhagens utilizadas de *L. braziliensis* para os experimentos in vitro foram: a cepa LTCP393, resistente ao antimoniato de meglumina (Glucantime) e ao óxido nítrico (COSTA et al., 2011), e a cepa Thor (MCAN/BR/98/R619), suscetível ao tratamento com Glucantime. Para os experimentos, foram utilizadas promastigotas até a 5ª passagem de cultivo. Os parasitos foram cultivados em meio N.N.N., contendo o meio Schneider suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado (SBF), 2% de urina humana estéril, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, em estufa B.O.D., 25°C. As cepas LTCP393 e Thor foram nomeadas neste trabalho como LbR e LbS, respectivamente.

4.2 Cultura e polarização de macrófagos J774:

A linhagem celular de macrófagos murinos J774 foi cultivada em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 2 mM L-glutamina e solução antibiótico-antimicótico a 1% a 37°C com 5% de CO₂ em incubadora umidificada (Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA). Para induzir o fenótipo M1, 1x10⁶ de células J774 foram cultivadas em garrafas de cultura de células e mantidas em meio RPMI suplementado com 5% de SBF e 1 µg/mL de LPS (Sigma) por 24 horas. Para induzir o fenótipo M2 (que foi utilizado nos experimentos de citocinas anti-inflamatórias), os macrófagos J774 foram cultivados em placas de cultura de células e mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de SBF e 10ng/mL de IL-4 (Sigma) por 24 horas (BRITO SOUSA et al., 2019). Macrófagos não polarizados (MØ) não passaram por nenhuma indução foram distribuídos em placas pelo mesmo período de tempo. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4) e utilizadas para os demais experimentos.

Figura 2 – Desenho experimental representando a polarização de macrófagos J774.



4.3 Infecção de Macrófagos

Macrófagos J744 de perfil M0, M1 e M2 foram distribuídos em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de vidro (13 mm), e incubados durante 24 horas para aderirem à superfície da lamínula, com concentração de 1×10^6 macrófagos/mL. Para a infecção dos macrófagos com *L. braziliensis* (LbR e LbS), a cultura dos parasitos foi centrifugada a 3.000 rpm, por 15 minutos a 4°C, e em seguida, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e diluídos em meio RPMI suplementado na concentração de 1×10^7 parasitos/mL. A taxa de infecção inicial dos macrófagos foi de 1 macrófago/1 parasito. Os macrófagos M1 infectados foram incubados em estufa 5% de CO₂, 37°C e 95% de umidade por 24 e 48 horas. Após esse tempo, os sobrenadantes foram retirados dos poços e armazenados em freezer -20°C para posterior análise de citocinas e óxido nítrico.

4.4 Determinação da taxa de infecção de macrófagos M1

Para quantificar o nível de infecção dos Macrófagos M1 foram incubados em incubadora umidificada (Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA). por 24, 48 e 72 h após esse tempo as lamínulas contendo as células foram lavadas com salina e em seguida, fixadas e coradas com corante Giemsa (Sigma Aldrich). As lamínulas coradas foram montadas em lâminas de vidro e examinadas em microscopia óptica, com magnificação de 100x em óleo de imersão. Cinquenta células foram examinadas e o número de amastigotas/50 células foi determinado.

4.5 Dosagem de citocinas

A produção das citocinas nos sobrenadantes obtidos das culturas de macrófagos M1 e M2 foi determinada utilizando-se a técnica ELISA, como recomendado pelo fabricante (BD Biosciences). Resumidamente, placas de 96 poços, fundo chato (TPP, Switzerland), foram sensibilizadas com anticorpo de captura anti-citocina purificado, na concentração determinada pelo fabricante, por 12 às 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas utilizando a solução de lavagem recomendada (PBS com Tween 20 a 0,05%); foi realizado bloqueio com PBS e soro bovino fetal (SBF 10%) ou solução fornecida pelo fabricante, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS + Tween 20, foram adicionados 100 µl das amostras e das diluições do padrão da citocina (para a elaboração de curva-padrão). Todas as amostras e diluições foram avaliadas em triplicata. A placa foi incubada por mais 2 horas à temperatura ambiente e em seguida lavada, e então as amostras foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com anticorpo de detecção ligado à enzima peroxidase. Após esse passo, a placa foi submetida a nova lavagem e em seguida a solução substrato foi adicionada. Depois da incubação final, por 30 minutos à temperatura ambiente, a reação foi parada com ácido fosfórico (1:20) e a densidade óptica foi avaliada no comprimento de onda de 450 nm, utilizando-se o software Softmax® v.5 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA).

4.6 Avaliação dos níveis de óxido nítrico

Os níveis de óxido nítrico foram determinados através da reação de Griess (GREEN et al., 1982). Cem microlitros do sobrenadante obtido no homogenato foram misturados a 100 µl do reagente de Griess (0,1% Dihidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamida e 1% sulfanilamida em ácido fosfórico 5%) e após 10 minutos a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro em 540 nm. As absorbâncias obtidas foram interpoladas à curva padrão de nitrito de sódio.

4.7 Análise estatística

Para verificar a significância estatística entre os grupos, nos dados com distribuição normal, onde foram comparados dois grupos independentes, foi utilizado o teste t de Student. Para as comparações entre múltiplos grupos foi realizado o teste one-way ANOVA, com pós-teste Tukey. Todas as análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism

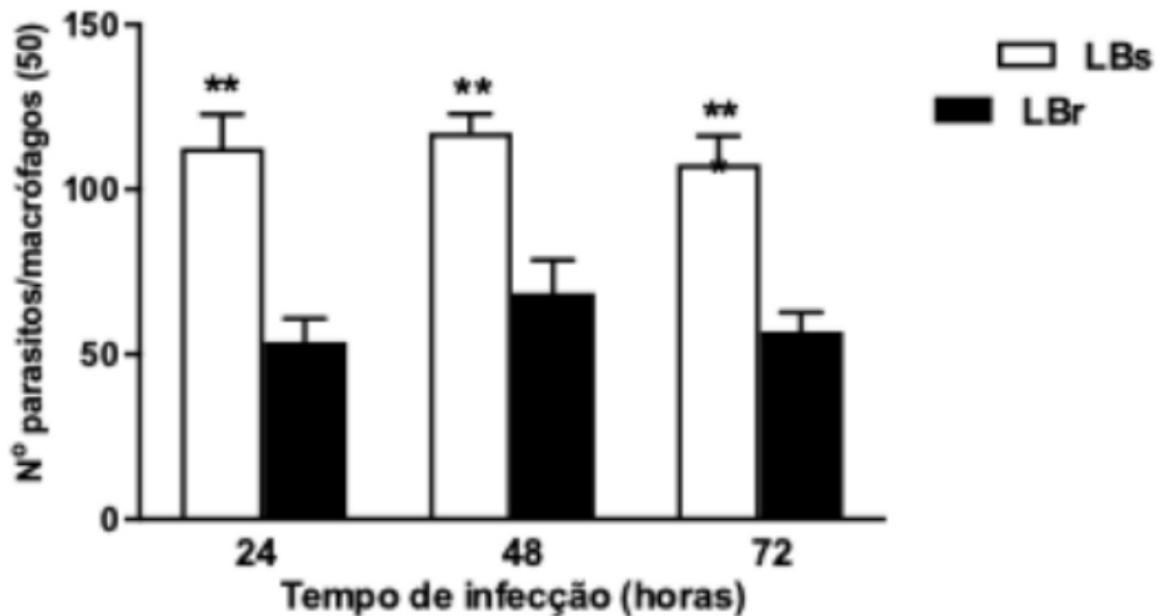
version 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e em todos os testes utilizados, a significância mínima utilizada foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Carga parasitária em macrófagos de perfil M1 e infectados por cepas de *L. braziliensis* resistente e suscetível ao antimoniato de meglumina in vitro.

Os resultados mostraram que os macrófagos M1 infectados com LbR apresentaram significante menor carga parasitária, com média em torno de 50 parasitos/macrófago, quando comparados com macrófagos infectados com a cepa LbS, que apresentaram carga parasitária com média acima de 100 parasitos/macrófago nos três tempos avaliados, 24, 48 e 72 horas, como observado na Fig. 3.

Figura 3 – Carga parasitária em macrófagos de perfil M1 infectados com *L. braziliensis* resistente (LbR) e suscetível (LbS) ao antimoniato de meglumina in vitro.



Fonte: Elaborado pelo autor. Carga parasitária em macrófagos de perfil M1 infectados com cepas de *L. braziliensis* resistente (LbR) e suscetível (LbS) ao antimoniato de meglumina, após 24, 48 e 72 horas de infecção. Os valores representam média aritmética \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. Significância estatística $p < 0,05$ (teste t de Student)

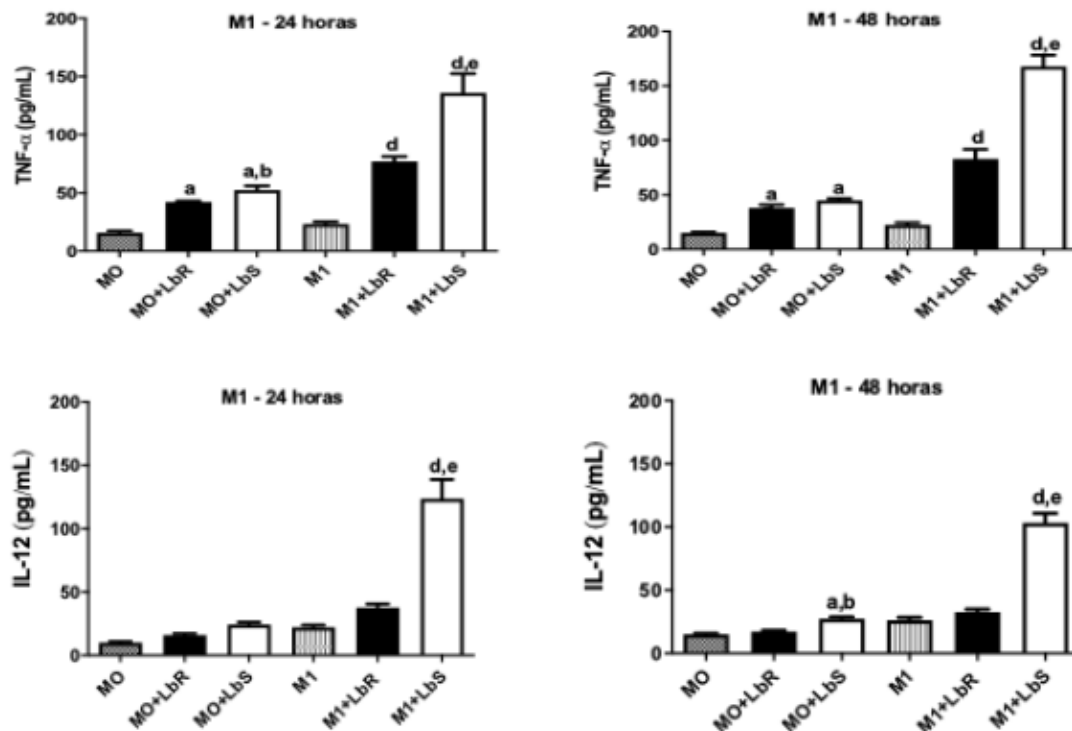
5.2 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos de perfil M1 infectados por cepas de *L. braziliensis* resistente e suscetível ao antimoniato de meglumina *in vitro*.

Em MO infectado por LbS, a produção de TNF- α foi significativa em relação ao macrófago não infectado e ao macrófago infectado por LbS no tempo de 24h. No tempo de 48h, a produção de TNF- α de MO+LbR e MO+LbS foram semelhantes, e significativas em relação ao macrófago não infectado. (Fig. 4)

Em M1 infectado por LbS, a produção de TNF- α foi significativa em relação ao macrófago não infectado e ao macrófago infectado por LbS no tempo de 24 e 48h.

Em relação à IL-12, a produção de M1+LbS foi significativa em relação a M1 e M1+LbR, em 24 e 48h. Para os grupos MO, a produção de IL-12 por MO+LbS só se torna significativa no tempo de 48h, em relação a MO e MO+LbR. (Fig. 4)

Figura 4 – Produção das citocinas TNF- α e IL-12 em macrófagos de perfil M1 infectados com *L. braziliensis* resistente e suscetível ao antimoniato de meglumina *in vitro*.



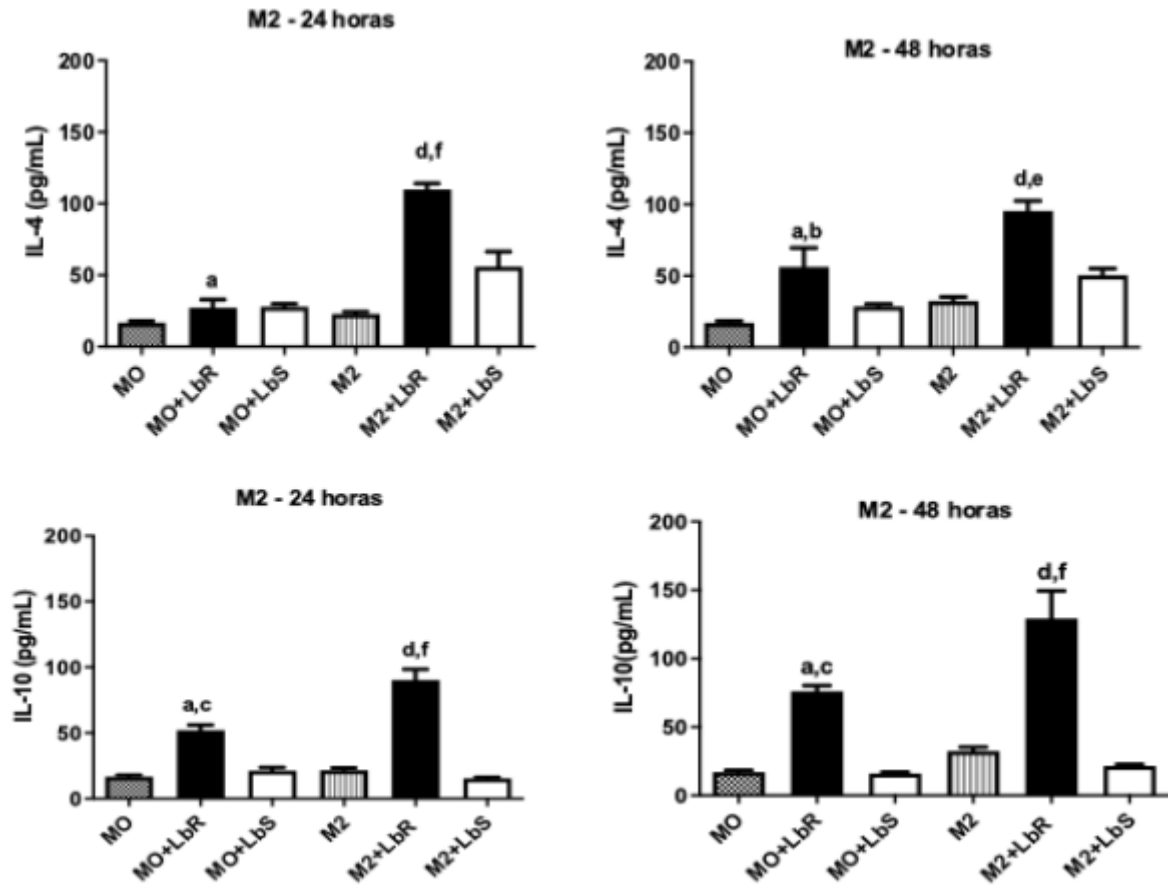
Fonte: Elaborado pelo autor. Citocinas inflamatórias em macrófagos de perfil M1 infectados com cepas de *L. braziliensis* resistente (LbR) e suscetível (LbS) ao antimoniato de meglumina, após 24 e 48 horas de infecção *in vitro*. Os valores representam média aritmética \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. Legendas: MO = macrófago não infectado; M1 = macrófago de perfil inflamatório. Significância estatística a = MO; b = MO+LbR; c = MO+LbS, d = M1, e = M1+LbR, f = M1+LbS). $p < 0,05$ (ANOVA, pós-teste Tukey).

5.3 Quantificação de citocinas anti-inflamatórias produzidas por macrófagos de perfil M2 infectados por cepas de *L. braziliensis* resistente e suscetível ao antimoniato de meglumina in vitro.

Em relação a IL-4, a produção em M2+LbR foi significativa em relação a M2 e M2+LbS, nos tempos de 24 e 48h. M2+ LbR induziu maior produção também quando comparado ao MO+LbR nas primeiras 24h. Em 48 h, M2+LbR manteve a indução de IL-4 entre os tempos, enquanto MO+LbR aumentou a produção com o passar do tempo. embora não estatisticamente significante, M2+ LbS teve uma produção de IL-4 maior que o MO+LbS. (Fig. 5)

Em relação a IL-10, LbR induziu um produção superior a LbS em MO e M2 em 24 e 48h, tendo um aumento nesses mesmos grupos com 48h, no entanto para essa citocina a LbS não obteve indução siginificativa em nenhum grupo avaliado (Mo+ LbS e M2 + Lbs). (Fig.5)

Figura 5 – Produção das citocinas IL-4 e IL-10 em macrófagos de perfil M2 infectados por *L. braziliensis* resistente e suscetível ao antimoniato de meglumina in vitro.

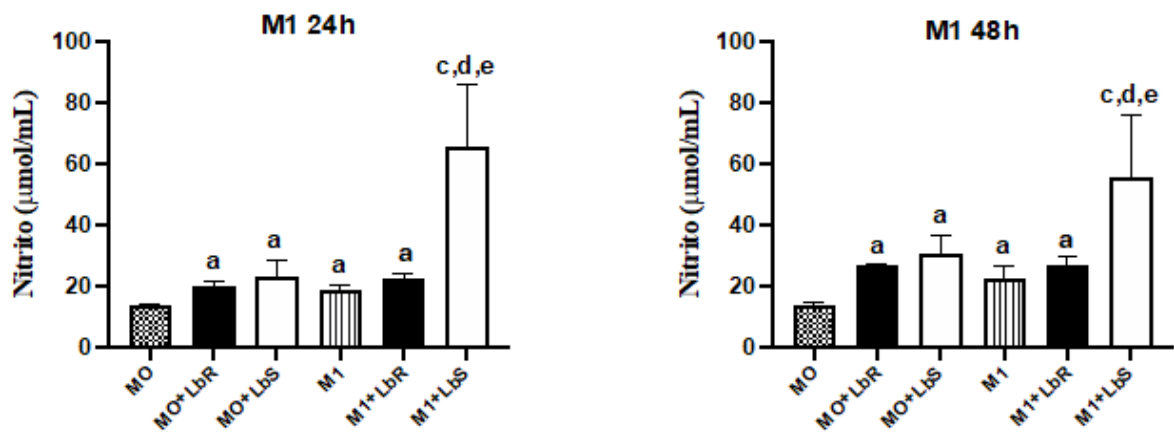


Fonte: Elaborado pelo autor. Citocinas anti-inflamatórias/regulatórias em macrófagos de perfil M2 infectados com cepas de *L. braziliensis* resistente (LbR) e suscetível (LbS) ao antimoniato de meglumina, após 24 e 48 horas de infecção in vitro. Os valores representam média aritmética \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. Legendas: MO = macrófago não infectado; M2 = macrófago de perfil anti-inflamatório. Significância estatística a = MO; b = MO+LbR; c = MO+LbS, d = M2, e = M2+LbR, f = M2+LbS). $p < 0,05$ (ANOVA, pós-teste Tukey).

5.4 Quantificação de óxido nítrico produzido por macrófagos de perfil M1 e infectados por *L. braziliensis* resistente e suscetível ao antimoniato de meglumina in vitro.

Nos tempos avaliados, M1+LbS induziu a maior produção de NO, significativa quando comparada aos grupos MO+LbS, M1 e M1+LbR. Os grupos M1+LbR, M1, MO+LbS e MO+LbR tiveram uma produção significativa em relação ao macrófago não polarizado e não infectado, como observado na Figura 6

Figura 6 - Produção de óxido nítrico por macrófagos de perfil M1 infectados por *L. braziliensis* resistente e suscetível ao antimoniato de meglumina in vitro.



Fonte: Elaborado pelo autor. Produção de óxido nítrico em macrófagos de perfil M1 infectados com cepas de *L. braziliensis* resistente (LbR) e suscetível (LbS) ao antimoniato de meglumina, após 24 e 48 horas de infecção in vitro. Os valores representam média aritmética \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. Legendas: MO = macrófago não infectado; M1 = macrófago de perfil inflamatório. Significância estatística a = MO; b = MO+LbR; c = MO+LbS, d = M1, e = M1+LbR, f = M1+LbS). $p < 0,05$ (ANOVA, pós-teste Tukey).

6 DISCUSSÃO

No cenário da leishmaniose, os momentos iniciais da infecção são fundamentais para o controle da proliferação do parasito, relacionando-se à contenção destes, nos momentos precoces da infecção, principalmente quando se trata de cepas com fenótipo de resistência ao tratamento (DE ALMEIDA et al., 2003; LASKAY et al., 1995). A investigação deste estudo, que possui considerável ineditismo, avaliou a resposta in vitro de macrófagos polarizados para os perfis M1 e M2 à infecção por cepa de *Leishmania braziliensis* resistente ao Glucantime®, comparada com uma cepa suscetível, em relação à carga parasitária, à produção de citocinas inflamatórias e NO (em M1), e anti-inflamatórias (em M2).

Neste estudo, utilizando-se macrófagos MJ774 polarizados para perfil M1 (inflamatórios) e perfil M2 (anti-inflamatórios) in vitro, observou-se que a infecção com a cepa resistente (LbR) induziu baixos níveis de TNF- α e IL-12, nos macrófagos de perfil M1, e altos níveis de IL-4 e IL-10 nos macrófagos de perfil M2, com 24 e 48 horas, o que sugere que a LbR modulou o ambiente para um perfil mais anti-inflamatório. Ao contrário, a cepa suscetível (LbS) induziu produção significativa de TNF- α e IL-12 nos macrófagos M1, e baixos níveis de IL-4 e IL-10 nos macrófagos M2, nos dois tempos avaliados, indicando um ambiente mais inflamatório, e, portanto, menos propício à sua proliferação e sobrevivência.

Observando o perfil de cepas resistentes aos medicamentos, Garcia-Hernandez et al. (2015) mostraram que estas cepas possuíam uma maior capacidade adaptativa, comparada às linhagens suscetíveis, provavelmente como consequência de suas adaptações metabólicas, as quais convergem na maior tolerância às condições de estresse. Sugere-se que na seleção à resistência ao antimônio e ao NO, a cepa resistente tornou-se mais apta ao ambiente pró-inflamatório, sobrevivendo nas primeiras horas em ambiente mais hostil, até a inversão do perfil inflamatório para anti-inflamatório, onde ela consegue sobreviver e proliferar (Costa et al. (2011), o que corrobora, no presente estudo, com a maior carga parasitária observada nos macrófagos infectados com a cepa LbR, quando comparada com a cepa LbS, nos tempos avaliados.

Sabe-se que TNF- α tem funções importantes durante a doença; na fase aguda, esta citocina contribui para o controle dos parasitos e, durante a fase crônica, apresenta uma segunda função, que seria de imunorregulação (ROCHA et al., 1999). Costa et al. (2011) observaram que, embora TNF- α esteja relacionada à proteção contra a infecção, ocorreu expressão aumentada desta citocina em lesões de camundongos inoculados com cepa resistente, cinco semanas após a infecção, podendo também estar associada a uma resposta

Th2, induzida por esta cepa. Tal citocina também é associada na retroalimentação de macrófagos no ambiente *in vitro*, visto que sem a produção de IFN- γ , o macrófago M1 se mantém inflamatório por sinalização autócrina realizada por TNF- α .

No presente estudo, macrófagos M1 infectados por cepa LbR não mostraram produção significativa de TNF- α , enquanto a infecção por LbS influenciou uma produção muito mais expressiva desta citocina em macrófagos de perfil M1, nos dois tempos avaliados, 24 e 48 horas. De fato, alta produção de TNF- α vem sendo associada à amplificação da doença, com lesões mais graves e tendência às formas mais disseminadas, consolidando um perfil Th1 (SCORZA et al., 2017).

Em relação ao contrabalanço Th1, o consenso é que IL-12, produzida por macrófagos e por células dendríticas, possivelmente aumentada por outras citocinas, como IL-1, IL-23, IL-27 e TNF- α (VON STEBUT., 2007; RODRIGUES et al., 2015), conduzem à diferenciação e proliferação de células Th1, levando também à produção de IFN- γ (ALEXANDER; BRYSON., 2005.; DÍAZ; ZERPA; TAPIA, 2013). Neste estudo, a produção de IL-12 manteve o perfil de TNF- α , configurando o mesmo comportamento entre as citocinas pró-inflamatórias, onde durante a infecção em macrófagos M1, a cepa LbS induziu um ambiente mais inflamatório do que a cepa LbR.

Mesmo com seu importante papel na contenção de parasitos intracelulares, a produção de óxido nítrico (NO) mostrou-se significativa apenas para a infecção pela cepa LbS. Estudos com cepas *L. braziliensis* vêm mostrando que a proteção contra o parasito não parece ocorrer somente pela via de NO, entretanto, ainda não está bem estabelecido por qual via ocorre de fato o controle da infecção (SOUZA et al., 2010; COSTA et al., 2011). Souza et al. (2010) demonstraram que cepas resistentes de *Leishmania* podem inibir geração de NO de forma indireta, através da inibição da síntese de IL-12 pelos macrófagos, diminuindo a quantidade de IFN- γ produzido por células T. Estes dados corroboram com os achados do presente estudo, onde a cepa LbR induziu menor produção de IL-12 que a cepa LbS, sugerindo sua tolerância às vias de produção do NO, como já demonstrado anteriormente por Costa et al., 2011.

Em relação a citocina IL-10, tem sido documentado que a infecção de macrófagos por *Leishmania* pode conduzir à produção desta citocina imunorreguladora, conhecida por causar inibição/desativação das funções dos macrófagos (LIU; UZONNA, 2012). IL-10 inibe a explosão respiratória e a produção de citocinas inflamatórias, especialmente de TNF- α , pelos macrófagos, permitindo que o parasito prolifere localmente e espalhe-se para sítios distantes (GIUDICE et al., 2007; ANDERSON et al., 2007). Está bem estabelecido que IL-10

endógeno é um mediador central da homeostase imunológica, necessária para modular a forte reação inflamatória que pode acompanhar a resposta imunológica contra patógenos nos tecidos locais (DE OLIVEIRA; BRODSKYN., 2012).

A citocina IL-10 pode suprimir a imunidade de várias formas: diminuindo a produção de IL-12 e TNF- α em macrófagos ativados, o que desvia a resposta Th1 para uma resposta Th2, agindo sobre as moléculas co-estimulatórias de células apresentadoras de antígenos (APCs), além de sinergizar com TGF- β para inibir atividade microbicida de macrófagos (SALHI et al., 2008). No entanto, o papel de IL-10 na leishmaniose cutânea humana, como resultado de uma infecção por *L. braziliensis*, não é tão claro, e já foi sugerido que a ausência, ao invés da elevada produção de IL-10, seria a causa da doença (SALHI et al., 2008), no caso da leishmaniose mucosa, devido a exagerada inflamação causada por citocinas Th1, como TNF- α e IFN- γ (DIAZ et al., 2013).

No presente estudo, observou-se que os níveis da citocina IL-4 foram mantidos mais elevados na infecção pela cepa resistente LbR nos macrófagos M1, independente do tempo. Estes resultados corroboram com os encontrados em outro estudo, onde foi mostrado que esta mesma cepa LbR induziu níveis significantes de IL-4, e isso foi relacionado também com a diminuição da produção de NO (COSTA et al. 2011). IL-4 é um potente ativador da enzima arginase I (Arg I), que compete com iNOS pela L-arginina que é usada para a síntese de NO, em macrófagos. Ao consumir L-arginina, Arg I diminui a disponibilidade desse substrato para a iNOS, resultando em menor produção de NO e inibição da inflamação (MUNDER, 2009). Além disso, vale ressaltar que, tanto IL-4 como IL-10, também induzem a polarização para macrófagos M2, favorecendo a persistência da infecção (PEREIRA, 2018).

Ao associar os fatores estudados neste estudo. A infecção por LbR em macrófagos M1 diminui a expressão de citocinas inflamatórias, representadas por IL-12 e TNF- α , inibindo a resposta inflamatória e reduzindo a produção de mediadores inflamatórios, representado pelo NO. Em contrapartida, a infecção por LbR em macrófagos M2 aumenta a expressão de citocinas reguladoras, representadas por IL-4 e IL-10, inibindo a ocorrência de inflamação e a produção de citocinas inflamatórias e inibindo a produção de NO pela indução da expressão da arginase, por IL-4, contribuindo para a sobrevivência e proliferação dos parasitos.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se, a partir dos resultados deste trabalho que se pode sugerir que a cepa de *Leishmania braziliensis* resistente ao tratamento com o antimoniato de meglumina (Glucantime), é capaz de causar modulação de marcadores, tanto inflamatórios quanto anti-inflamatórios, induzindo o decaimento na produção de citocinas pró-inflamatórias, representadas por TNF- α e IL-12, e na produção de óxido nítrico, assim como a manutenção dos níveis de citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e IL-4. Esta modulação propicia um ambiente favorável à sobrevivência e proliferação da cepa resistente, podendo resultar na persistência da doença e dificuldade no tratamento. Ademais, o presente estudo é um subprojeto de um trabalho maior, e mais experimentos estão sendo realizados para melhor elucidar questões sobre a modulação de resposta dos macrófagos.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J; BRYSON, K. T helper (h) 1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. **Immunology letters**, v. 99, n. 1, p. 17-23, 2005.

ALVES, D.T. **Cepa de *Leishmania braziliensis* resistente ao antimônio induz reação inflamatória diferente de cepa susceptível**. 2021. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

AMATO, V.S. et al. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 2, p. 266-274, 2007.

ANDERSON, C.F. et al. CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 285-297, 2007.

ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 491, 2014.

BALANÑA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BATISTA-SIQUEIRA, R. et al. Parasitologia: fundamentos e prática clínica. In: **Parasitologia: Fundamentos e Prática Clínica**. 2020. p. 658-658.

BENTO, D. B. et al. Oxidative stress in mice treated with antileishmanial meglumine antimoniate. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 3, p. 1134-1141, 2013.

BLANCO, V.R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, Nailton Monteiro. Leishmaniose: Aspectos gerais relacionados com a doença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e vacinas. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 861-876, 2017.

BLUM, J. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 158-166, 2004.

BOGDAN, C et al. Tumor necrosis factor- α in combination with interferon- γ , but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. **European Journal of Immunology**, v. 20, n. 5, p. 1131-1135, 1990.

CARVALHO, E.M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, n. 4, p. 315-325, 1994.

CECÍLIO, P. et al. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 480, 2014.

CHAN-BACAB, M.J; PEÑA-RODRÍGUEZ, Luis Manuel. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 6, p. 674-688, 2001.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C.R. **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014.

COSTA, J.M.L. et al. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**. Bahia, Brasil. 2009;79 (Supl.3):70-83.

COSTA, D.L. et al. BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e965, 2011.

CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 399-410, 2006.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

DE ALMEIDA, M. C. et al. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 861-870, 2003.

DE OLIVEIRA, C.I.; BRODSKY, C.I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 145, 2012.

DE SALDANHA, R.R. et al. Meglumine antimonate treatment enhances phagocytosis and TNF- α production by monocytes in human cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 10, p. 596-603, 2012.

DEREURE, J. et al. Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 12, p. 1103-1108, 2003.

DIAZ, N.L.; ZERPA, O.; TAPIA, F.J. Chemokines and chemokine receptors expression in the lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 4, p. 446-452, 2013.

FILARDY, A.A.; PIRES, D.R.; DOSREIS, G.A. Macrophages and neutrophils cooperate in immune responses to *Leishmania infection*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 1863-1870, 2011.

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

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (Fiocruz). *Conheça as principais doenças tropicais negligenciadas*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2012. Disponível em: <https://www.ioc.fiocruz.br/noticias/conheca-principais-doencas-tropicais-negligenciadas>. Acesso em: 28 dez. 2024.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, R. et al. Fitness of *Leishmania donovani* parasites resistant to drug combinations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003704, 2015.

GIUDICE, A. et al. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, p. 1-12, 2007.

GONTIJO, Bernardo; CARVALHO, Maria de Lourdes Ribeiro. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71-80, 2003.

GREEN, L.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

HALDAR, A.K.; SEN, P.; ROY, S.. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, n. 1, p. 571242, 2011.

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

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

LASKAY, T. et al. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 8, p. 2220-2227, 1995.

LESLIE, G.; BARRETT, M.; BURCHMORE, R.. *Leishmania mexicana*: promastigotes migrate through osmotic gradients. **Experimental Parasitology**, v. 102, n. 2, p. 117-120, 2002.

LIU, D.; UZONNA, J.E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 83, 2012.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. suppl 2, p. S359-S375, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 28 dez. 2024.

MUNDER, M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 638-651, 2009.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I.; DE PAULA-COELHO, V.N. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- α production, but only via TNF- α it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 12, p. 1633-1638, 2008.

MUXEL, S.M. et al. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44141, 2017.

NEGRÃO, G.N.; FERREIRA, M.E.M.C. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. **Revista Percurso**, v. 6, n. 1, p. 147-68, 2014.

NEVES, B. M. et al. *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*: A Visceral and a Cutaneous Pathogen with Different Behavior on Dendritic Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 287, 2016. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00287/full>. Acesso em: 17 fev. 2025.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Weekly Epidemiological Record: Leishmaniasis**. Genebra: OMS, 2023. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/379491/WER9945-653-669.pdf?sequence=1>. Acesso em: 17 fev. 2025.

PEARSON, R.D.; DE QUEIROZ SOUSA, A. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, p. 1-11, 1996.

PEREIRA, N.V. **Macrófagos polarizados M2 na resposta tecidual das lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar americana**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Acesso em: 28 dez. 2024.

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

ROCHA, P.N. et al. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 5, p. 1731-1734, 1999.

RODRIGUES, A.A. et al. Cutaneous Leishmaniasis: Involvement of Cytokines and Chemokines. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 121, 2015.

ROJAS, J. et al. Macrophage heterogeneity and plasticity: impact of macrophage biomarkers on atherosclerosis. **Scientifica**, v. 2015, n. 1, p. 851252, 2015.

SALHI, A. et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 6139-6148, 2008.

SERAFIM, T. D. et al. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 548-555, 2018.

SINGH, R. et al. Recent advances in chemotherapeutics for leishmaniasis: Importance of the cellular biochemistry of the parasite and its molecular interaction with the host. **Pathogens**, v. 12, n. 5, p. 706, 2023.

SCORZA, B.M.; CARVALHO, E.M.; WILSON, M.E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, 2017.

SCOTT, P.; NOVAIS, F.O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016.

SOUZA, A.S. et al. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 1-11, 2010.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage polarization in leishmaniasis: broadening horizons. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2529, 2018.

VELLOZO, N.S.; RIGONI, T.S.; LOPES, M.F. New therapeutic tools to shape monocyte functional phenotypes in leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 704429, 2021.

VON STEBUT, E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. **European Journal of Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 115-122, 2007.

WHO. Trabalhando para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas: primeiro relatório sobre doenças tropicais negligenciadas. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2010. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44440/3/9789248564093_por.pdf. Acesso em: 28 dez. 2024.