

Avaliação *in vitro* da resposta linfoproliferativa de células mononucleares à antígenos solúveis de *Leishmania (V.) guyanensis*

In vitro evaluation of the lymphoproliferative response of mononuclear cells to soluble antigens of *Leishmania (V.) guyanensis*

Evaluación *in vitro* de la respuesta linfoproliferativa de células mononucleares a antígenos solubles de *Leishmania (V.) guyanensis*

Recebido: 01/12/2022 | Revisado: 14/12/2022 | Aceitado: 15/12/2022 | Publicado: 20/12/2022

Rafaela Benício Santana

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1426-0052>
Centro Universitário FAMETRO, Brasil
E-mail: rafaelabenicio@live.com

Erika Oliveira da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1948-8280>
Centro Universitário FAMETRO, Brasil
E-mail: ericcaoliveira@hotmail.com

Paula Figliuolo da Cruz Borges

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1323-0062>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: paula.fcruz86@gmail.com

Francimeire Gomes Pinheiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8897-6088>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: meireg1@hotmail.com

Antonia Maria Ramos Franco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4300-5325>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: afranco@inpa.gov.br

Resumo

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* sp. Apresenta-se de duas formas clássicas, a leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM). A diversidade em formas clínicas encontrada na LTA dá-se da interação da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, resposta imune de cada indivíduo frente ao parasito e até mesmo o vetor. Dos componentes de defesa do hospedeiro importantes para a eliminação da *Leishmania* sp., podemos destacar a resposta imune adaptativa, que é fluentemente mediada por células. Sabe-se que a resistência ou susceptibilidade da doença está relacionada com o nível de expansão e diferenciação em subpopulações de células efetoras, onde células T CD4+ podem se diferenciar em células T do tipo Th₁, ou Th₂. Este projeto teve como objetivo avaliar o perfil da linfoproliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com LC e de indivíduos saudáveis sensibilizadas por antígenos solúveis de *Leishmania (V.) guyanensis*, a fim de compreender a modulação celular induzida por essa espécie, agente etiológico da LTA prevalente na região amazônica. A resposta linfoproliferativa foi avaliada em cultura de células estimuladas com Antígeno solúvel de *L. guyanensis* e Phytohemagglutinin - PHA (10 µg/mL) utilizando *BrdU Cell Proliferation ELISA Kit*. Os resultados mostraram que todos os indivíduos apresentaram linfoproliferação em resposta ao mitógeno. Em relação ao antígeno, os pacientes antes e após o tratamento apresentaram elevada resposta linfoproliferativa. Dessa forma, podemos sugerir que houve a expansão dos linfócitos T *in vitro* dos grupos primoinfectados e após tratamento.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar; *Leishmania guyanensis*; Linfoproliferação.

Abstract

Leishmaniasis is an infectious-parasitic disease caused by intracellular protozoa of the genus *Leishmania* sp. It presents in two classical forms, cutaneous leishmaniasis (CL) and mucosal leishmaniasis (ML). The diversity in clinical forms found in ATL is due to the interaction of the *Leishmania* species involved in the infection, the immune response of each individual against the parasite and even the vector. Of the host defense components important for the elimination of *Leishmania* sp., we can highlight the adaptive immune response, which is fluently mediated by cells. It is known that disease resistance or susceptibility is related to the level of expansion and differentiation in effector cell subpopulations, where CD4+ T cells can differentiate into Th₁, or Th₂ type T cells. This project aimed to evaluate the

lymphoproliferation profile of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with CL and from healthy individuals sensitized by soluble antigens of *Leishmania (V.) guyanensis*, in order to understand the cell modulation induced by this species, the etiologic agent of ATL prevalent in the Amazon region. The lymphoproliferative response was evaluated in cell culture stimulated with soluble *L. guyanensis* antigen and Phytohemagglutinin - PHA (10 g/mL) using the *BrdU Cell Proliferation ELISA Kit*. The results showed that all individuals showed lymphoproliferation in response to the mitogen. Regarding the antigen, the patients before and after treatment, showed a high lymphoproliferative response. Thus, we can suggest that there was T lymphocyte expansion in vitro in the primoinfected groups and after treatment.

Keywords: Tegumentary Leishmaniasis; *Leishmania guyanensis*; Lymphoproliferation.

Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa-parasitaria causada por protozoos intracelulares del género *Leishmania* sp. Se presenta en dos formas clásicas, la leishmaniasis cutánea (LC) y la leishmaniasis mucosa (ML). La diversidad de formas clínicas encontradas en la LTA se debe a la interacción de las especies de *Leishmania* implicadas en la infección, a la respuesta inmunitaria de cada individuo contra el parásito e incluso al vector. De los componentes de defensa del huésped importantes para la eliminación de *Leishmania* sp. podemos destacar la respuesta inmunitaria adaptativa, que está mediada de forma fluida por las células. Se sabe que la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad está relacionada con el nivel de expansión y diferenciación en las subpoblaciones de células efectoras, donde las células T CD4⁺ pueden diferenciarse en células T Th1 o Th2. Este proyecto tuvo como objetivo evaluar el perfil de linfoproliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con LC e individuos sanos sensibilizados por antígenos solubles de *Leishmania (V.) guyanensis*, con el fin de comprender la modulación celular inducida por esta especie, agente etiológico de la LTA prevalente en la región amazónica. La respuesta linfoproliferativa se evaluó en cultivo celular estimulado con antígeno soluble de *L. guyanensis* y Fitohemaglutinina - PHA (10 g/mL) utilizando el *Kit ELISA de Proliferación Celular BrdU*. Los resultados mostraron que todos los individuos mostraron linfoproliferación en respuesta al mitógeno. En cuanto al antígeno, los pacientes antes y después del tratamiento mostraron una elevada respuesta linfoproliferativa. Por lo tanto, podemos sugerir que hubo una expansión de los linfocitos T in vitro en los grupos primoinfectados y después del tratamiento.

Palabras clave: Leishmaniasis tegumentaria; *Leishmania guyanensis*; Linfoproliferación.

1. Introdução

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) constituem o grupo de doenças debilitantes e, frequentemente, estigmatizantes, que prevalecem entre as populações mais pobres e impotentes, com pouca ou sem nenhuma visibilidade política e que vivem, principalmente, em áreas remotas e desfavorecidas (Ferreira & Andricopulo, 2019; Luna & Campos, 2020; Scotti & Scotti, 2020). Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS (2019), atualmente, são 20 as Doenças Tropicais Negligenciadas e, dentre as prevalentes no Brasil, encontra-se a leishmaniose.

No Brasil, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) destaca-se por sua extensa distribuição, possuindo casos notificados em todo o território brasileiro. No estado do Amazonas, no ano de 2020 foram notificados 1.685 casos, sendo os municípios de maiores notificações: Manaus (617 casos), Presidente Figueiredo (226 casos) e Rio Preto da Eva (221 casos) (BRASIL, 2020).

A LTA trata-se de uma doença infecciosa, porém não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. É uma zoonose e possui ciclo heterogênico, apresentando duas formas principais: promastigota, forma flagelada encontrada no canal digestivo do vetor; e a amastigota, com flagelo interiorizado e obrigatoriamente intracelular (Ministério da Saúde, 2017; Santos et al., 2020; Ribeiro et al., 2020).

No território nacional, encontram-se sete espécies de *Leishmania* spp., sendo cinco destas relacionadas à infecção de LTA em humanos no estado do Amazonas, são elas: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) lainsoni* e *Leishmania (V.) guyanensis*, a última se destaca por ser a mais prevalente na região, sendo a responsável por 89% dos casos diagnosticados no município de Rio Preto da Eva (Figueira et al., 2014; Benício, 2015; Ministério da saúde, 2017; Chagas, 2018).

A LTA apresenta-se de duas formas clássicas, a leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM). A LC é caracterizada pela formação de lesões únicas ou múltiplas que pode se manifestar em várias partes do corpo; possui bordas

delimitadas, base eritematosa, infiltrada e de consistência firme, assemelhando-se a úlceras. A LC pode ser classificada em: leishmaniose cutânea localizada (LCL), forma cutânea disseminada (LD), recidiva cutis (LCC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Ministério da Saúde, 2017; Silva Filho, 2020).

A infecção da LTA se inicia quando as fêmeas de flebotomíneos infectadas, do gênero *Lutzomyia*, inoculam as formas infectantes de promastigotas metacíclicas de *Leishmania* sp. no hospedeiro (Carvalho, 2018; Cavalcante, 2018; Silva, 2018; Rocha et al., 2019). Uma vez que as formas metacíclicas caem na corrente sanguínea, o sistema imune é ativado e elas precisam escapar da lise pelo sistema complemento. Durante o ciclo da *Leishmania* spp. no vetor, quando se transformam na forma infectiva, a promastigota sofre modificações em sua membrana, como a alteração do lipofosfoglicano (LPG) e aumento da expressão da gp63 (glicoproteína de superfície 63kDa), o que impede a formação do Complexo de ataque à membrana (MAC) tornando-a resistente à lise (Castellano, 2005; Lemos, 2016).

A resposta imune é iniciada no local de entrada da *Leishmania* spp. após a picada do vetor, quando são recrutados os neutrófilos, células dendríticas e macrófagos para o local da infecção e, após reconhecimento do patógeno, irão realizar a fagocitose. Os neutrófilos infectados sobrevivem por um curto período e, após a apoptose, são fagocitados pelos macrófagos, o que facilita a entrada da *Leishmania* spp. e leva à produção de citocinas que podem modular o desenvolvimento da resposta imune à infecção (Espir, 2013; Carvalho, 2018; Rocha, 2019).

No macrófago, o parasito assume a forma amastigota e é dentro do fagolisossomo que acontece os principais mecanismos da resposta imune inata de combate a *Leishmania* spp.: a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a produção de óxido nítrico (NO) (Rocha, 2019). A ativação de linfócitos gera numerosos mecanismos que visam a destruição do microrganismo invasor, dos quais podemos destacar a proliferação e diferenciação das células, que irão gerar células efetoras específicas para responderem, eficientemente, ao antígeno para que as células de memória respondam rapidamente caso haja uma nova exposição (Zandonai, 2007). Dessa forma, a proliferação celular passa a ser essencial na resposta inflamatória.

Sabe-se que a resistência ou susceptibilidade da doença está relacionada com o nível de expansão e diferenciação em subpopulações de células efetoras, onde células T CD4+ podem se diferenciar em células T do tipo Th₁ ou Th₂ (Hailu *et al.* 2006). As células T CD4+ do tipo Th₁ produzem citocinas pró-inflamatórias, como Interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF), que estão relacionadas com a resistência a infecção e diminuição da carga parasitária. IFN γ e TNF atuam na ativação de macrófagos, levando a produção de NO e NADPH oxidase com possível eliminação da *Leishmania* durante a fagocitose no fagolisossomo (Carvalho, 2018; Silva, 2018).

Em contrapartida, as células que apresentam o perfil Th₂ produzem IL-4, IL-5, IL10, IL-13, citocinas anti-inflamatórias, onde algumas delas podem inibir a ativação dos macrófagos. O perfil Th₂ está relacionado com a susceptibilidade à infecção por *Leishmania* spp. (Carvalho, 2018). A patogenia da leishmaniose é complexa e está relacionada com diversos fatores, onde precisa ser levado em consideração as diferenças entre as espécies de *Leishmania*, o sistema imunológico do paciente infectado e a espécie do vetor. Como resultado, existe um espectro de manifestações clínicas a ser desenvolvida pelo paciente (Espir, 2013; Ministério da Saúde, 2017; Carvalho, 2018).

Diante da grande variabilidade de fatores envolvidos no curso clínico da infecção por *Leishmania* sp. e que o sistema imune desempenha papel crucial na polarização da imunopatogênese, estando envolvida no controle ou indução de formas crônicas mais graves. Diante disso, este projeto teve como objetivo avaliar o perfil da linfoproliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com LC e de indivíduos saudáveis sensibilizadas por antígenos solúveis de *Leishmania (V.) guyanensis*, a fim de compreender a modulação celular induzida por essa espécie, agente etiológico da LTA prevalente na região amazônica.

2. Metodologia

Aspectos éticos

Este projeto faz parte de um projeto maior, submetido e aprovado pelo comitê de ética em seres humanos, tendo como nº CAAE: 29406319.2.0000.5020.

Preparo do antígeno

Os antígenos solúveis de *Leishmania* (SLA) utilizados para estimulação celular foram obtidos a partir de massa parasitária de formas promastigotas de *L. guyanensis* (MHO/BR/75/IM4147). Conforme o protocolo para a obtenção dos antígenos, foi realizada a centrifugação a 4.400 rpm da massa parasitária por 15 minutos, seguida de lavagens do sedimento com PBS (Tampão fosfato-salino). Após a última lavagem, foi realizada a ressuspensão do sedimento em solução salina e a adição do inibidor de protease. A extração dos antígenos foi executada por meio de choques térmicos com congelamento e descongelamento, seguida de nova centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos para a aquisição do sobrenadante e desprezo do sedimento. O preparado dos antígenos foi analisado quanto ao teor de proteína total por espectrofotometria pelo método de *Bradford*, diluído a 10µg/µL RPMI e conservado a -80 °C, em pequenas alíquotas.

Obtenção de amostras biológicas

As amostras biológicas foram obtidas através da realização de atividade em campo, efetuada pela equipe técnica e de pesquisa do laboratório, que se deslocaram até o município de Rio Preto da Eva (AM), onde atenderam pacientes com LC na Unidade Básica de Saúde (UBS) Ednaide Lopes da Costa. Na UBS, foram realizadas as coletas do material biológico, que tinham como destino o laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do INPA para a realização dos experimentos.

Foram incluídos na pesquisa sendo cinco primo-infectados com LC, cinco pacientes após tratamento com Glucantime®) e cinco indivíduos saudáveis, totalizando n= 15 pessoas.

Os critérios de inclusão dos pacientes na pesquisa foram os seguintes: ser do gênero masculino ou feminino; idade igual ou superior a dezoito anos, se menor de idade, ter autorização do responsável legal; residentes de Rio Preto da Eva; para o grupo de indivíduos saudáveis, não possuir aspecto clínico ou lesões causadas por *Leishmania* spp. Para o grupo controle positivo foram incluídos pacientes após tratamento por Glucantime® com cicatrização da(s) lesão(ões).

Obtenção de células PBMCs

Das amostras de sangue obtidas dos pacientes, foram utilizados 8 mL do sangue para a obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). O volume de 8 mL de sangue foi dividido em dois tubos do tipo Falcon 15 mL e foi diluído em meio RPMI completo (L-glutamina) na proporção de 1:1, após diluição, cuidadosamente, o sangue foi acrescentado sob 4 mL de Histopaque® - 1077 e logo após levado à centrífuga a 2.400 rpm por 30 minutos. Após a centrifugação, foi realizada a remoção da camada de células mononucleares e transferida para um tubo Falcon 15 mL, onde foi adicionado PBS (Tampão fosfato-salino), na proporção 1:1, para a realização de 3 lavagens e centrifugações a 4.400 rpm por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de meio RPMI completo. A contagem das células foi através da câmara de Neubauer com azul de Trypan, a concentração foi ajustada para 2 x 10⁵ células/mL em meio RPMI completo.

Preparo de placas para proliferação celular

Em placas de 96 poços de fundo chato, foram adicionadas 100 µL/poço de células PBMCs (2 x 10⁵/poço) extraídas a partir do sangue de pacientes. Logo, foram distribuídas em triplicatas: 100 µL/poço de SLA de *L. guyanensis*; 100 µL/poço de

células sem estímulo, consideradas como controle negativo; e Fitohemaglutinina (*phytohemagglutinin* – PHA) [10 µg/mL], essa última sendo utilizada como controle positivo do ensaio por possuir a habilidade de estimular linfócitos T a sofrerem mitose (Zandonai 2007).

Todas as substâncias foram previamente diluídas em meio RPMI completo, obedecendo suas devidas concentrações de acordo com as instruções do fabricante (*Amersham BrdU Cell Proliferation Biotrak ELISA Kit, GE Healthcare*[®]). Após a adição de todas as substâncias e das células PBMCs, as placas foram incubadas durante 72 horas em estufa *ThermoScientific Forma*[®]*Series II WaterJacketed CO₂Incubators* a 37 °C com níveis de CO₂ a 5% e 95% de umidade.

Ensaio de proliferação celular

Após as 72 horas de incubação das PBMCs, foi adicionado 25 µL/poço de solução BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine), como marcador da proliferação celular, seguindo de nova incubação a 37 °C por 18 horas. No dia seguinte, a placa foi centrifugada a 2.200 rpm por 15 minutos e foi realizada a coleta do sobrenadante (≈150 µL) estocado em microtubos a -80 °C, para posterior dosagem de citocinas.

O procedimento de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é realizado na placa seca e seguiu o protocolo *Amersham BrdU Cell Proliferation Biotrak ELISA Kit (GE Healthcare*[®]). Para isso, após a coleta do sobrenadante, foi utilizado um secador de cabelo, por aproximadamente 15 minutos, para secagem da placa.

Após a placa totalmente seca, foi adicionado 200 µL/poço da solução fixadora e a placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 200 µL/poço da solução bloqueadora (solução diluída 1:20 em água destilada) e a placa foi novamente incubada por mais 30 minutos. Em seguida, após descarte do sobrenadante, foi adicionado 100 µL/poço de *antiBrdU* (solução diluída 1:100 com *antibodysolution*) e a placa foi levada a incubação por mais 90 minutos.

No término do tempo de incubação, foi iniciado o processo de lavagem da placa, onde foi adicionado 200µL/poço de tampão de lavagem e, logo em seguida, a placa foi vertida para descarte de resquícios de solução. O processo foi repetido 3 vezes.

Posterior as lavagens, foi adicionado 100 µL/poço de solução de substrato, onde, gradativamente, o volume de solução tornou-se azul e a placa então foi incubada por 30 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de 25 µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄), resultando em uma imediata mudança na cor da solução para amarelo. Após 5 minutos, a placa foi levada para leitura no espectrofotômetro a 450nm.

Análise estatística

As análises estatísticas serão realizadas com o GraphPad Prism[®] 6.0 software e analisadas pelo teste de análise de variância (ANOVA) (p <0,05) e teste de Tukey, com limite de confiança de 95%. Os dados são mostrados em tabelas e gráficos.

3. Resultados e Discussão

Aspectos epidemiológicos

A partir das excursões realizadas à UBS Ednaide Lopes da Costa Ribeiro, localizada no município de Rio Preto da Eva – AM, foram atendidos dez pacientes com o diagnóstico de LC, sendo cinco pacientes primo-infectados e sem tratamento prévio e os outros cinco, pacientes que obtiveram cicatrização da lesão após tratamento com Glucantime[®].

Durante os atendimentos, foi realizada investigação epidemiológica e clínica (Tabela 1), e em seguida diagnóstico através da escarificação da lesão. Também foram coletadas 5 amostras de sangue periférico de indivíduos não infectados para o grupo controle, denominados indivíduos sadios.

No presente estudo, observou-se predominância do sexo masculino, equivalente a 80% dos indivíduos atendidos (Tabela 1). A faixa etária dos pacientes variou entre 12 anos e 56 anos. Para o sexo masculino, a faixa etária com maior número de casos foi de 16 a 19 anos (50%).

Estudos realizados por Guerra *et al.* (2006) e Figueira *et al.* (2014), já haviam mostrado que o perfil epidemiológico dos grupos mais afetados pela leishmaniose consiste na população jovem e ativa, com predomínio maior do gênero masculino, por exercer alguma atividade relacionada a exploração da mata, como agricultura ou extrativismo.

Quanto ao número de lesões, 80% dos pacientes apresentaram lesões múltiplas. Segundo o Ministério da Saúde (2017), a *L. (V.) guyanensis*, em grande parte dos casos, causa lesões ulceradas cutâneas. O mesmo foi afirmado por Laison (2010), onde também justificou que as múltiplas lesões eram devido às picadas simultâneas dos flebotômios, mas que também poderiam ocorrer devido metástases linfáticas secundárias.

Dentre os pacientes com lesões ativas, 80% das lesões eram do tipo úlcera, sendo em sua maioria, localizadas em membros inferiores. Em Naiff Junior *et al.* (2009), o predomínio da localização das lesões foi nos MMII (36,2%) em pacientes também atendidos no município de Rio Preto da Eva. Vale evidenciar que, na área onde foi realizado os atendimentos, há um predomínio nas ocorrências de infecção por *L. guyanensis* (Figueira *et al.*, 2014).

Tabela 1 - Dados e características clínicas das lesões dos pacientes com leishmaniose cutânea atendidos em Rio Preto da Eva, Amazonas, em abril e maio de 2020.

Código da Amostra	Gênero	Tempo de infecção (dias)	Exame direto	Cultivo	Nº de lesões	Localização da lesão	Características da lesão	Tamanho da lesão (cm)
MHOM/BR/20/IM6221	M	30	+	-	02	Tronco	Nodular com crosta	1 cm
MHOM/BR/20/IM6227	M	30	+	-	02	Glúteo D	Ulcerada	8,92 cm
						Glúteo E		1,3 cm
MHOM/BR/20/IM6230	M	15	+	**	05	MMII	Ulcerada	2,8 cm
								1,2 cm
								1,5 cm
								1,5 cm
								0,8 cm
MHOM/BR/20/IM6232	M	10	+	-	02	MMII	Ulcerada	1,4 cm
								1 cm
MHOM/BR/20/IM6234	F	10	+	**	02	MIE	Ulcerada	1,1 cm
						QPE		1,1 x 1,5 cm

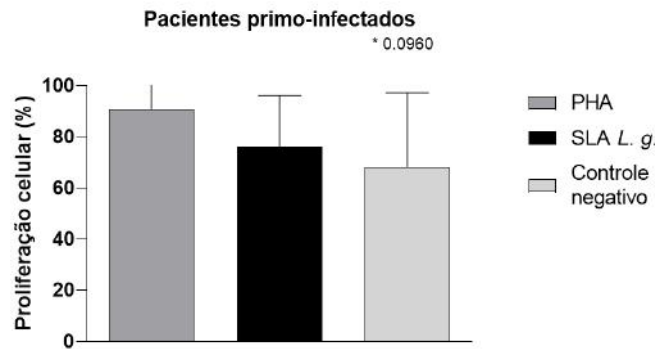
Legenda: Pacientes /Amostras isoladas: M = Mamífero; HOM = *Homo sapiens*; BR = País de origem (Brasil); 20 = Ano de isolamento (2020); IM = Código de cadastro original utilizado pelo INPA; M = Masculino; F = Feminino; '+' = Exame direto positivo para leishmaniose cutânea; '-' = Meio de cultivo NNN negativo; ** = Meio de cultivo NNN contaminado. Fonte: Autores.

Ensaio de proliferação celular

A linfoproliferação foi avaliada nas culturas de CMSPs dos pacientes com LC primo-infectados (Figura 1), após tratamento com Glucantime® (Figura 2) e no grupo de indivíduos sadios (Figura 3). Analisando os resultados obtidos, todos os grupos apresentaram linfoproliferação celular em resposta ao mitógeno. Assim, pode-se perceber que a fitohemaglutina foi um eficiente indutor de proliferação linfocitária, da mesma forma que foi observado em estudos realizados por Reis (2007) e Miramin-Mohammadi *et al.*, (2020).

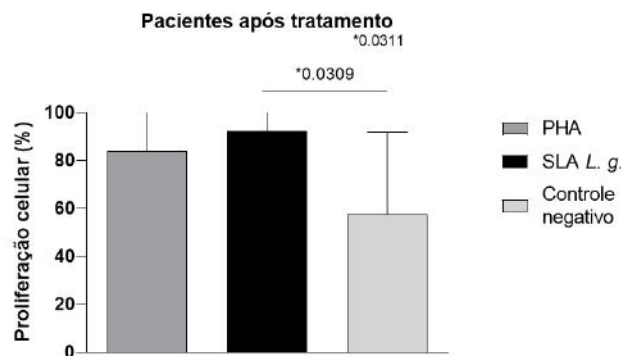
As PBMCs de pacientes primo-infectados e após tratamento apresentaram elevada resposta linfoproliferativa, frente ao antígeno de *L. guyanensis* (Figuras 1 e 2). Em contrapartida, no grupo dos indivíduos sadios, observou-se baixa indução da linfoproliferação (Figura 3).

Figura 1 - Gráfico da proliferação celular de PBMCs dos pacientes LC primo-infectados. PHA- fitohemaglutinina; SLA *L.g.* – Antígeno solúvel de *Leishmania guyanensis*; Controle negativo – célula sem estímulo. Linhas verticais representam o desvio padrão; Linhas horizontais representam a significância estatística entre tratamentos ($p < 0,005$).



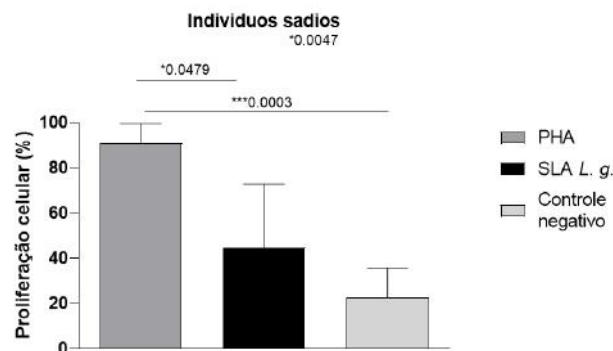
Fonte: Autores.

Figura 2 - Gráfico da proliferação celular de PBMCs dos pacientes LC após tratamento com Glucantime®. PHA- Fitohemaglutinina; SLA *L.g.* – Antígeno solúvel de *Leishmania guyanensis*; Controle negativo – célula sem estímulo. Linhas verticais representam o desvio padrão; Linhas horizontais representam a significância estatística entre tratamentos ($p < 0,005$).



Fonte: Autores.

Figura 3 - Gráfico da proliferação celular de PBMCs dos Indivíduos saudáveis. PHA- Fitohemaglutinina; SLA *L.g.* – Antígeno solúvel de *Leishmania guyanensis*; Controle negativo – célula sem estímulo. Linhas verticais representam o desvio padrão; Linhas horizontais representam a significância estatística entre tratamentos ($p < 0,005$).



Fonte: Autores.

Em relação a análise dos indivíduos saudáveis (Figura 3), o antígeno solúvel de *L. guyanensis* parece induzir baixa linfoproliferação. O resultado encontrado não foi diferente quando comparado a estudos já realizados (Toledo et al., 2001; Reis, 2007) onde as células não proliferaram frente ao estímulo antigênico.

Estudos sobre a proliferação celular frente a antígeno de *Leishmania* spp. em diferentes grupos de pacientes com LC já mostraram resultados semelhantes aos encontrados neste estudo. Toledo et al. (2001), verificou maior taxa linfoproliferativa em PBMCs de pacientes com tratamento combinado de imunoquimioterápico e Glucantime[®], em relação aos pacientes tratados apenas com Glucantime[®], sendo todas PBMCs sensibilizadas por SLA de *L. braziliensis*. Segundo os autores, essa diferença se dá devido a contínua inoculação do antígeno *in vivo*, fazendo com que as células continuem sendo estimuladas.

Em estudo realizado por Reis (2007), que também utilizou SLA de *L. braziliensis*, com pacientes antes e após tratamento com Glucantime[®], verificaram considerável reposta proliferativa, porém sem diferença relevante entre os dois grupos. Telino et al. (2006), utilizaram antígenos de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. No estudo, as células estimuladas *in vitro* por *L. braziliensis* apresentaram elevada proliferação celular quando comparada com *L. amazonensis*. Contudo, o autor presumiu que diferença se dá devido os pacientes estarem infectados por *L. braziliensis*, pela espécie ser predominante na região.

Ainda que estudos já tenham sido realizados com o intuito de avaliar a resposta imune celular frente a antígenos solúveis de *Leishmania* spp., é importante salientar que nenhum foi realizado com a espécie predominante na região, a *L. (V.) guyanensis* (Toledo et al., 2001; Telino et al., 2006; Reis, 2007; Figueira et al., 2014).

4. Considerações Finais

Pode-se perceber que houve elevada resposta linfoproliferativa das PBMCs de pacientes com LTA antes e após tratamento com Glucantime[®] frente a estímulo com antígeno solúvel de *L. (V.) guyanensis*. Dessa forma, podemos sugerir que houve a expansão dos linfócitos T *in vitro* deste grupo.

Os mecanismos imunológicos envolvidos na LC são complexos e ainda requerem esclarecimentos. Dessa forma, é de suma importância trabalhos que visem elucidar a resposta imunológica do indivíduo infectado frente ao parasito, visto que esta interação resulta em um amplo espectro clínico da doença.

Agradecimentos

Agradecemos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e sucesso deste artigo.

Referências

- Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro de Jesus, A., Dutra, W. O., Gollob, K. J., & Carvalho, E. M. (2002) Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity*, 70: 6734-6740.
- Benício, E., Cordeiro, M., Monteiro, H., Moura, M.A.S., Oliveira, C., Gadelha, E.P.N., Chrusciak-Talhari, A., Talhari, C., Ferreira, L.C.L., Mira, M.T., Machado, P.R.L., Talhari, S., & Schriefer, A. (2015). Sustained Presence of Cutaneous Leishmaniasis in Urban Manaus, the Largest Human Settlement in the Amazon. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93: 1208-1213.
- Carvalho, B.C.V. (2018) *Aspectos imunológicos e moleculares correlacionados às manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília/Faculdade de Medicina, Brasília, Distrito Federal. 114p.
- Castellano, L.R.C. (2005). Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão. *VITAE Academia Biomédica Digital*, 25: 1-10.
- Cavalcante, G.A. (2018). *LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: Associações entre aspectos clínicos e mecanismos imunológicos em pacientes*. Dissertação de Mestrado, Centro de Biociências/Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 82p.
- Chagas, E.C.S. (2018). *Leishmaniose Tegumentar Americana em área rural endêmica na Amazônia Ocidental: estudo sobre flebotomíneos e reservatórios*. Tese de Doutorado, Fundação de Medicina Tropical/ Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, Amazonas. 138p.
- Dos Santos, A.F.S., Calheiros, T.R.S.P., De Lima, A.F., Xavier Junior, A.F.S., De Oliveira, S.G., & Maria, R.A.R. (2020). Perfil Epidemiológico dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Maceió Alagoas de 2011 a 2016. *Ciências Biológicas e de Saúde Unit*, 2: 202-2012.

- Espir, T.T. 2013. *Características da resposta imune em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana, antes e após tratamento quimioterápico com antimonial pentavalente*. Tese de Doutorado, Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 196p.
- Ferreira, L.L.G., & Andricopulo, A.D. (2019). Drugs and vaccines in the 21st century for neglected diseases. *The Lancet*, 19: 125-127.
- Figueira, L.P., Soares, F.V., Naiff, M.F., Da Silva, S.S., Espir, T.T., Pinheiro, F.G., & Franco, A.M.R. (2014). Distribuição de casos de Leishmaniose Tegumentar no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Ver Parol Trop.*, 43: 173-181.
- Guerra, J.A.O. (2009). *Leishmaniose Mucosa - Estudos de casos atendidos em um centro de referência em Manaus, Amazonas*. Tese de Doutorado, Fundação de Medicina Tropical do Amazonas/Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, Amazonas. 139p.
- Hailu, A., Baarle, D.V, Knol, G.J., Berhe N., Miedema, F., & Kager, P.A. (2005). T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. *Clinical Immunology*, v. 117, n. 2, p. 182–191
- Lemos, A.F.B. (2016). *Avaliação da ativação do sistema complemento por extratos proteicos de Leishmania spp.* Dissertação de Mestrado, Instituto de Higiene e Medicina Tropical/Universidade Nova de Lisboa, Alcântara, Lisboa. 53p.
- Luna, E.J.A., & Campos, S.R.S.L.C. (2020). O desenvolvimento de vacinas contra as doenças tropicais negligenciadas. *Cad. Saúde Pública*, 36: 1-14.
- Ministério da Saúde. 2017. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Brasília: *Editora do Ministério da Saúde*.
- Mohammadi, A.M., Duthie, M.S, Reed. S.G., Javai, A., & Khamesipour, A.J. (2020). Evolution of antigen-specific immune responses in cutaneous leishmaniasis patients. *Parasite Immunology*, 43(4).
- Naiff Junior, R.D., Pinheiro, F.G., Naiff, M.F., Souza, I.S., Castro, L.M., Menzes, M.P., & Franco, A.M.R. (2009). Estudo de uma série de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 38: 103-114.
- Nascimento, P., & Holanda, V. (2018). Challenges and perspectives in the treatment of Tegumentary Leishmaniasis: review. *Revista Interfaces: saúde, humanas e tecnologia*, 6: 140-157.
- Pimenta, P.F.P. (2012). A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. In: De Freitas, V.C.; Secundino, N.F.C. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular*, Belo Horizonte, Minas Gerais, p. 1-45.
- Reis, L.C. (2007). *Caracterização da resposta imune celular em portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana antes e após tratamento quimioterápico*. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco. 127p.
- Reis, L.C., De Brito, M.E.F., Souza, M.A., & Pereira, V.R.A. (2006). Mecanismos imunológicos na resposta celular humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista de Patologia Tropical*, 35: 103-115.
- Ribeiro, A.C.S., Santana, D.A., Da Silva, S.G., Rabelo, L.M., Alexandre, K.V., & Rodrigues, G.M.M. (2020). Profilaxias da Leishmaniose Tegumentar Americana: Papel do enfermeiro frente a enfermidade. *Revista Liberum Accessum*, 1: 1-14.
- Rocha, T.M.D.D., Silveira, M.B., & Quixabeira, V.B.L. (2019). Leishmaniose Tegumentar Americana em humanos: uma revisão dos aspectos envolvidos na doença. *Revista Acadêmica do Instituto de Ciência da Saúde*, 05: 1-13.
- Scott, L., & Scotti, M.T. (2020). Neglected Diseases – New Compounds and Treatments. *Current Medicinal Chemistry*, 27: 659-661.
- Silva Filho, R.A., De Oliveira, D.R., Dutra, V.B.P., Meireles, N.M., Dos Anjos, L., & De Moura, G.M.R. (2020). Tratamento das lesões causadas pela Leishmaniose Tegumentar. *Revista Liberum Accessum*, 3: 29-36.
- Silva, P.A.M. (2018). *Avaliação da produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-23 em portadores da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia ocidental*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Acre/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental, Rio Branco, Acre. 83p.
- Brasil. (2020). Leishmaniose Tegumentar. SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinanet/cnv/Itaam.pdf>.
- Telino, E.; De Luca, P.M.; Matos, D.C.S.; Azeredo-Coutinho, R.B.; Meirelles, M.N.; Conceição-Silva, F.; Schubach, A.; & Mendonça, S.C.F. 2006. *In vitro* responses of human peripheral blood mononuclear cells to whole-cell, particulate and soluble extracts of *Leishmania* promastigotes. *Clin Exp Immunol*, 2: 338-344.
- Toledo, V.P.C.P., Mayrink, W., Gollob, K.J., Oliveira, M.A.P., Da Costa, C.A., Genaro, O., Pinto, J.A., & Afonso, L.C.C. (2001). Immunochemotherapy in American Cutaneous Leishmaniasis: Immunological Aspects before and after Treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96: 89-98.
- Zandonai, R.H. (2007). *Análise da atividade linfoproliferativa de células esplênicas murinas frente a extrato de seis plantas medicinais da flora catarinense*. Dissertação de Mestrado, Universidad do Vale do Itajaí/Centro de ciências da saúde, Itajaí, 67p.