UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

LEONARDO LIMA CARDOSO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA QUERCETINA NA INFECÇÃO DE MONÓCITOS POR *LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM*

João Pessoa

2025

LEONARDO LIMA CARDOSO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA QUERCETINA NA INFECÇÃO DE MONÓCITOS POR *LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Orientadora: Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima.

Coorientadora: Dra. Fernanda Silva Almeida.

João Pessoa

2025

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C268a Cardoso, Leonardo Lima.
Avaliação da atividade imunomoduladora da quercetina na infecção de monócitos por Leishmania (Leishmania) infantum / Leonardo Lima Cardoso. - João Pessoa, 2025.
85 f. : il.

Orientação: Tatjana Keesen de Souza Lima.
Coorientação: Fernanda Silva Almeida.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Leishmaniose. 2. Flavonoides. 3. Citotoxicidade. 4. Imunomodulação. I. Lima, Tatjana Keesen de Souza. II. Almeida, Fernanda Silva. III. Título.

UFPB/BC CDU 616.993.161(043)

Elaborado por RUSTON SAMMEVILLE ALEXANDRE MARQUES DA SILVA - CRB-15/0386

PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 508ª (quingentésima oitava) Dissertação de Mestrado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Leonardo Lima Cardoso,** candidato(a) ao Título de "Mestre" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às quatorze horas (14h) do dia vinte e um de fevereiro do ano de dois mil e vinte e cinco (21/02/2025), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: https://meet.google.com/qcs-xcnf-ywb, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Leonardo Lima Cardoso**, candidato(a) ao Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau, Ph.D em Bioquímica e Imunologia, Sandra Rodrigues Mascarenhas, Ph.D em Fisiologia, e Tatjana Keesen de Souza Lima, Ph.D em Bioquímica e Imunologia. Sendo a primeira, integrante do corpo docente da Universidade Federal de Minas Gerais e os demais integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Comissão, professor(a) Tatjana Keesen de Souza Lima, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Leonardo Lima Cardoso**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "**Avaliação da Atividade Imunomoduladora da Quercetina na Infecção de Monócitos por *Leishmania (Leishmania) infantum***". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO(A). Em face da aprovação, declarou o(a) Presidente achar-se o(a) examinado(a) **Leonardo Lima Cardoso** legalmente habilitado(a) a receber o Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof.ª Dr.ª Tatjana K[illegible]dora)

gov.br Documento assinado digitalmente
TATJANA KEESEN DE SOUZA LIMA CLEMENTE
Data: 24/02/2025 15:57:03-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof.ª Dr.ª Sandra Rodrigues Mascarenhas (Examinadora)

gov.br Documento assinado digitalmente
SANDRA RODRIGUES MASCARENHAS
Data: 24/02/2025 15:13:10-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof.ª Dr.ª Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

gov.br Documento assinado digitalmente
JULIANA DE ASSIS SILVA GOMES ESTANISLAU
Data: 24/02/2025 13:43:24-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Leonardo Lima Cardoso (Discente)

gov.br Documento assinado digitalmente
LEONARDO LIMA CARDOSO
Data: 24/02/2025 16:45:46-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dedico à minha família, por sempre estarem presentes e apoiando-me em todos os meus passos. Sem eles este trabalho não teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de inicialmente agradecer a minha avó Eliane, por todos os esforços que ela nunca mediu para me manter no caminho dos estudos. Minha avó é um grande exemplo de pessoa, criou quatro filhos e um neto, eu, e sempre esteve presente em nossas vidas ensinando o certo e o errado e como ela mesma diz “se formando junto conosco”, pois sempre trabalhou para pagar os estudos dos filhos e ainda hoje acorda cedo diariamente pra ajeitar meu almoço antes da universidade. Ela é minha companheira, minha vida e tudo que tenho para oferecer de melhor é um reflexo dela.

Faço também um agradecimento póstumo ao meu avô que esteve presente na minha vida durante a minha infância e parte da adolescência, e sempre me instruiu que a melhor forma de vencer na vida era através dos estudos e que o conhecimento é algo que se leva para toda vida.

Agradeço também ao meu pai e a minha mãe, por contribuírem com a minha formação escolar. Apesar de não ter sido criado por eles, são pessoas que sempre estiveram presentes em minha vida e nunca foram ausentes, assim como nunca mediram esforços para me ajudar e dar suporte em tudo que precisei.

Agradeço ao restante da minha família: tio, tias, irmãs, primas, por formarem uma família tão incrível e tornarem a vida mais alegre. Minha família sempre foi bastante unida, nos ajudamos em tudo e isso me ensinou que na vida há valores que são indispensáveis, tais como: união, compartilhamento e amor.

Agradeço ao meu parceiro de vida, por sempre estar presente comigo em todos os momentos. Você é uma pessoa que apareceu para tornar a minha vida infinitamente mais feliz e sou grato por tudo que já passamos juntos e por todas as ajudas que você sempre me proporcionou. Obrigado por todo amor, suporte e por sempre acreditar em mim, bem mais do que eu mesmo.

Agradeço ainda aos meus amigos, amigos da vida, amigos da universidade, amigos do trabalho, amigos tantos que irei levar para a vida inteira. Obrigado por tornarem a vida mais leve, abrandando os aperreios e intensificando as alegrias.

Um agradecimento também ao Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (LABIDIC), à professora Tatjana Keesen e ao grupo de pesquisadores que compõe esta

família. O LABIDIC é um laboratório de união, onde ocorre muito trabalho, mas também muitas risadas. Obrigado a todos por tornarem o ambiente de trabalho um lugar mais alegre de se estar.

Um obrigado à DEUS por toda saúde, paciência e discernimento que me proporciona. Por estar comigo em todos os momentos da minha vida e por me ajudar a passar pelos maus momentos, mostrando que os bons também sempre chegam.

Por fim, acho que posso agradecer um pouco a mim, por apesar de todas as angústias e incertezas, nunca ter desistido de seguir este caminho, um caminho árduo, sem dúvidas, mas que gosto de trilhar e que sei que no futuro a primavera irá florescer e a epóca da colheita chegará.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária que acomete diversos tipos de mamíferos. Aproximadamente 1,2 milhão de casos novos são registrados todos os anos em humanos e estão concentrados principalmente em populações vulneráveis que vivem em áreas de risco. A doença possui diferentes manifestações clínicas, desde formas brandas à condições bastante degradantes. A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença e sem tratamento sua mortalidade pode atingir valores superiores a 90%. No contexto de cura da doença, diversos estudos vem tentando desenvolver novas terapias, pois as convencionais apresentam altos índices de toxicidade, problemas de resistência e recidivas. Dentre as novas terapias propostas para tratar a leishmaniose, a associação de fármacos convencionais com produtos naturais vem demonstrando ser uma das linhas mais promissoras. A quercetina é um flavonoide presente em uma ampla variedade de vegetais e suas atividades antioxidante, pró-oxidante, imunomoduladora, anti-tumoral, anti-bacteriana, anti-fúngica e anti-protozoária já foram estudadas. Com base nisso, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade biológica da quercetina e sua associação à Anfotericina B contra culturas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* e no contexto da infecção de monócitos humanos. Para isso, tratamos culturas de promastigotas, eritrócitos e PBMC não infectadas ou infectadas com múltiplas concentrações de quercetina e AmB isoladas e combinadas. Com isso, avaliamos: 1) a atividade isolada e sinérgica dos compostos na morte dos parasitos por MTT; 2) a citotoxicidade dos compostos sobre células humanas; 3) a influência dos compostos sobre a taxa de infecção; 4) produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs); 5) produção de Óxido Nítrico (NO) em monócitos; 6) a produção de nitrito em PBMC expostas à *L. infantum* por reação de Griess; e por fim 7) a modulação do perfil de citocinas em PBMC com e sem infecção por *L. infantum*. Diante dos resultados obtidos, a quercetina apresentou atividade anti-promastigotas e a associação com a AmB potencializou a morte dos parasitos, indicando sinergismo entre as moléculas. Além disso, a quercetina diminuiu a taxa de infecção de monócitos e modulou positivamente a produção de EROs, apesar da AmB não ter tido participação nesses mecanismos. Ademais, nenhuma das condições testadas regulou a produção de NO, mas a associação dos compostos tendeu a aumentar o NO na infecção. Por fim, a quercetina diminuiu a produção de IL-6 e IL-17, mas não alterou a expressão de IFN-γ, IL-10 e IL12, e AmB diminuiu os níveis de IL-6, mas não modulou IFN-γ, IL-10, IL12 e IL-17. Portanto, nossos dados sugerem que a quercetina é atua como modulador da resposta imune, podendo ser utilizado sinergicamente com a AmB potencializando o processo de cura.

Palavras-chave: Leishmaniose. Flavonoides. Citotoxicidade. Sinergia. Imunomodulação.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious-parasitic disease that affects various types of mammals. Approximately 1.2 million new cases are reported annually in humans, and primarily concentrated in vulnerable populations living in high-risk areas. The disease presents different clinical manifestations, ranging from mild forms to highly debilitating conditions. Visceral leishmaniasis is the most severe form of the disease, with mortality rates exceeding 90% if left untreated. In the context of disease cure, numerous studies have been dedicated to developing new therapies, as conventional treatments exhibit high toxicity levels, resistance issues, and recurrence. Among the novel therapeutic approaches for leishmaniasis, the combination of conventional drugs with natural products has emerged as one of the most promising strategies. Quercetin is a flavonoid found in a wide variety of plants, and its antioxidant, pro-oxidant, immunomodulatory, anti-tumor, antibacterial, antifungal, and antiprotozoal activities have been extensively studied. Based on this, the present study aimed to evaluate the biological activity of quercetin and its combination with Amphotericin B against promastigote cultures of Leishmania (Leishmania) infantum and in the context of human monocyte infection. To achieve this, we treated promastigote cultures, erythrocytes, and PBMCs—both uninfected and infected—with multiple concentrations of quercetin and AmB, either alone or in combination. We then assessed: (1) the isolated and synergistic activity of the compounds in parasite death using the MTT assay; (2) the cytotoxicity of the compounds on human cells; (3) the influence of the compounds on the infection rate; (4) the production of Reactive Oxygen Species (ROS); (5) Nitric Oxide (NO) production in monocytes; (6) nitrite production in PBMCs exposed to L. infantum via the Griess reaction; and finally, (7) the modulation of cytokine profiles in PBMCs with and without L. infantum infection. Our results demonstrated that quercetin exhibited anti-promastigote activity, and its combination with AmB enhanced parasite death, indicating synergy between the molecules. Additionally, quercetin reduced monocyte infection rates and positively modulated ROS production, although AmB did not participate in these mechanisms. Furthermore, none of the tested conditions regulated NO production, but the combination of compounds showed a tendency to increase NO levels in infected cells. Finally, quercetin reduced IL-6 and IL-17 production but did not alter IFN-γ, IL-10, or IL-12 expression, whereas AmB reduced IL-6 levels but did not affect IFN-γ, IL-10, IL-12, or IL-17 expression. Therefore, our data suggest that quercetin acts as an immune response modulator and may be used synergistically with AmB to enhance the healing process.

Keywords: Leishmaniasis. Flavonoids. Cytotoxicity. Synergy. Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Árvore filogenética do gênero *Leishmania* 18

Figura 2 – Leishmaniose cutânea e visceral, região das Américas, 2021–2023..... 20

Figura 3 – Várias manifestações de leishmaniose cutânea..... 21

Figura 4 – PKDL nodular e papular..... 22

Figura 5 – Ciclo de transmissão de *Leishmania* spp. 25

Figura 6 – Micrografias eletrônicas de varredura de promastigota e amastigota axênica de *L. mexicana*.....27

Figura 7 - Dogma imunológico "Th1/Th2", resposta Breg e Treg na leishmaniose 30

Figura 8 – Mecanismo de ação da Anfotericina B..... 35

Figura 9 – Via biossintética da quercetina..... 36

Figura 10 – Teste de sinergismo em promastigotas com quercetina e AmB..... 42

Figura 11 – Estratégias de análise em monócitos não infectados e infectados..... 48

Figura 12 – Atividade anti-*Leishmania* da quercetina e Anfotericina B 49

Figura 13 – Cálculo do Índice de Combinação de compostos..... 50

Figura 14 – Atividade sinérgica da quercetina combinada à AmB em *L. infantum*..... 52

Figura 15 – Atividade citotóxica da quercetina e Anfotericina B em PBMC..... 53

Figura 16 – Atividade citotóxica da quercetina e Anfotericina B em eritrócitos humanos.....54

Figura 17 – Atividade da quercetina (QCT) e Anfotericina B (AmB) na infecção de monócitos (CD14+) por *L. Infatum* (CFSE+)..... 56

Figura 18 – Atividade da quercetina (QCT) e Anfotericina B (AmB) na produção de EROs (DHE+) durante a infecção de monócitos (CD14+) por *L. Infatum*..... 57

Figura 19 – Atividade da quercetina (QCT) e Anfotericina B (AmB) na produção de NO (DAF+) durante a infecção de monócitos (CD14+) por *L. Infatum*..... 58

Figura 20 – Atividade da quercetina (QCT) e Anfotericina B (AmB) na produção de nitrito durante a infecção por *L. Infatum*.....59

Figura 21 – Dosagem de citocinas de PBMC infectada com *L. infantum* 61

Figura 22 – Atividade anti-*Leishmania* e imunomoduladora da quercetina associada à AmB 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AmB	Anfotericina B
APC	Aloficocianina
C3	Componente 3 do Complemento
C3b	Componente 3b do Complemento
C5	Componente 5 do Complemento
$CaCl_2$	Cloreto de Cálcio Anidro
CC_{50}	Concentração Citotóxica Média
CD	Cluster de diferenciação
CFDA-SE	Diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil éster
CI_{50}	Concentração Inibitória Média
CO_2	Dióxido de Carbono
CR1	Receptor do Complemento tipo 1
CR3	Receptor do Complemento tipo 3
CTL	Grupo Controle
DAF-FM	Diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DHE	Dihidroetidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTN	Doença Tropical Negligenciada
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Forward Scatter
GP63	Leishmanolisina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
iC3b	Componente 3b do Complemento inativo
IFN-ɣ	Interferon-gama
IL	Interleucina
IRAK	Quinase associada ao receptor de interleucina-1

IκB	Quinase IkappaB
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal cinase
L.	*Leishmania*
LABIDIC	Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose Visceral
MAC	Complexo de Ataque à Membrana C5b6789
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de Sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PE	Ficoeritrina
PPA2	Proteína Fosfatase 2A
RORγT	Receptor gama órfão relacionado ao ácido retinóico
RPM	Rotações por minuto
RPMI 1640	*Roswell Park Memorial Institute* 1640
SBF	Soro Bovino Fetal
SSC	Side Scatter
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
T.	*Trypanosoma*
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β	Fator transformador de crescimento beta
Th	Células T helper
TLR	Receptor Toll-Like
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
V.	*Viannia*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
2. REFERENCIAL TEÓRICO 17
2.1. Origem Filogenética do gênero *Leishmania* 17
2.2. Epidemiologia, importância e aspectos clínicos da leishmaniose 19
2.3. Ciclo evolutivo dos parasitos e interações moleculares patógeno-hospedeiro..... 23
2.4. Aspectos imunológicos na infecção por *Leishmania* spp. 28
2.5. Terapias para o tratamento da leishmaniose e problemas associados..... 33
2.6. Flavonoides como uma nova proposta de intervenção para tratar a leishmaniose ... 35
3. OBJETIVOS 38
3.1. Objetivo geral..... 38
3.2. Objetivos específicos 38
4. MATERIAIS E MÉTODOS 39
4.1. Obtenção dos materiais..... 39
4.2. Considerações éticas..... 39
4.3. Manutenção da linhagem celular de promastigotas..... 39
4.4. Desenho Experimental..... 40
4.5. Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) 40
4.6. Avaliação da citotoxicidade da quercetina em promastigotas de *L. infantum*..... 41
4.7. Avaliação da atividade sinérgica entre quercetina e anfotericina B em promastigotas de *L. infantum* 41
4.8. Avaliação da citotoxicidade da quercetina em PBMC..... 42
4.9. Avaliação da citotoxicidade da quercetina em eritrócitos humanos 43
4.10. Preparação da *Leishmania* para infecção de monócitos 43
4.11. Processo de Infecção e plaqueamento..... 44
4.12. PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DE espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico 44
4.13. Quantificação da taxa de infecção e produção de EROs e NO 45
4.14. Quantificação de nitrito pela reação de Griess..... 46
4.15. Ensaio de Imunoabsorção ligado à Enzima para quantificação de citocinas 46
4.16. Análises estatísticas 47
5. RESULTADOS..... 49
5.1. Quercetina e Anfotericina B associadas possuem atividade sinérgica anti-*leishmania*..... 49
5.2. Citotoxicidade da quercetina em células sanguíneas de humanos 53
5.3. Avaliação da atividade da quercetina na taxa de infecção de monócitos..... 55
5.4. Avaliação da produção de EROs e NO em monócitos infectados por *L. infantum* . 56
5.5. Avaliação do perfil de citocinas em PBMC durante a infecção por *L. infantum* 60
6. DISCUSSÃO 62
7. CONCLUSÃO 71
REFERÊNCIAS..... 73
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 84
APÊNDICE B - Artigo publicado em tema correlato à dissertação 86
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospiral Universitário Lauro Wanderley/UFPB..... 87

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é considerada uma das doenças tropicais negligenciadas (DTN) de maior importância para a Organização Mundial de Saúde (OMS). A infecção é transmitida pela picada de dípteros fêmeas da família Psychodidae e sub-família phlebotominae e a doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania* spp., afetando principalmente populações de baixa renda que moram em áreas de risco e animais da região (ROATT et al., 2020; SERAFIM et al., 2021; WHO, 2023).

A *Leishmania* spp. é um protozoário intracelular obrigatório pertencente à família Trypanosomatidae. Nos flebotomíneos, os parasitos passam por diferentes estágios de sua forma promastigota e são transmitidos para os hospedeiros vertebrados quando estão em sua forma promastigota metacíclica (NEVES et al., 2016; SERAFIM et al., 2021). Ao entrar no hospedeiro vertebrado, os protozoários inicialmente são atacados pelo sistema complemento, porém, suas metaloproteases de membrana clivam moléculas da cascata do sistema complemento, impedindo a formação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; LEMOS, 2017). Após sua fuga do sistema complemento, as promastigotas metacíclicas são internalizadas majoritariamente por neutrófilos na fase inicial da infecção, e posteriormente monócitos e macrófagos, suas principais células hospedeiras. No meio intracelular, os parasitos ainda precisam driblar o ambiente agressivo dos fagolisossomos. Para isso, os parasitos sofrem mudanças de expressão gênica e metabólicas significativas, transformando-se em sua forma amastigota, que é evolutivamente eficiente em sobreviver aos mecanismos antimicrobianos dos fagócitos. Em seguida, as amastigotas se proliferam, matando a célula hospedeira e disseminando a infecção dentro do organismo célula a célula (DESCOTEAUX; TURCO, 1999; NEVES et al., 2016; MULE et al., 2020; CAVALCANTE et al., 2021).

Em relação a sua epidemiologia e sintomas clínicos, a leishmaniose é considerada um grave problema de saúde pública, pois afeta diversas regiões do planeta, em diferentes continentes, o que lhe confere um alto potencial de surto. Além disso, a leishmaniose apresenta formas cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV). A leishmaniose visceral é a forma mais grave e com taxa de mortalidade superior a 95% do casos quando

não tratada. Estima-se que 50 a 90 mil casos de LV ocorram por ano, com maior incidência no Brasil, leste da África e Índia (OPAS, 2021; WHO, 2023).

Atualmente o tratamento para leishmanioses ainda conta com poucos fármacos, tais como: antimoniais pentavalentes, pentamidina, anfotericina B e miltefosina. Ademais, esses compostos são significativamente tóxicos e apresentam diversos efeitos adversos. Além disso, já foram relatadas linhagens de *Leishmania* resistentes aos antimoniais pentavalentes, que são os fármacos de primeira linha. Devido a isso, comumente a Anfotericina B (AmB), um antifúngico de amplo espectro, é utilizada como tratamento de segunda linha nas leishmanioses (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; SHIRZADI, 2019; MULE et al., 2020). Contudo, efeitos como hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, hemólise e nefrotoxicidade já foram observados no tratamento com AmB (GILL et al., 1999; NIX, 2014; ABDEL-HAFEZ et al., 2022; LIU et al., 2023). Assim, a busca por novas alternativas de tratamento continua sendo um desafio para a ciência.

Nesse contexto, surgem os flavonoides, um grande grupo de compostos fenólicos que estão naturalmente presentes em uma diversidade de alimentos, incluindo frutas e bebidas. Os flavonoides são bastante conhecidos pela sua ampla gama de efeitos bioativos, incluindo atividades antioxidante, anti-tumoral, pró-oxidativas, antimicrobianas, anti-inflamatórias e antialérgicas (TASDEMIR et al., 2006; HIDALGO; SÁNCHEZ-MORENO; DE PASCUAL-TERESA, 2010; CATANEO et al., 2019; ZENG et al., 2019; SONG et al., 2020; SATO; MUKAI, 2020; JAFARINIA et al., 2020; SILVA-SILVA et al., 2021). Além disso, a atividade anti-*Leishmania* e anti *Trypanossoma cruzi* de diversos flavonoides já foi observada (TASDEMIR et al., 2006; LAGE et al., 2015). Dentre os flavonoides mais conhecidos e estudados na prevenção e terapêutica de diversas doenças incluindo a leishmaniose está a quercetina (MURAKAMI; ASHIDA; TERAO, 2008; LI et al., 2016; CATANEO et al., 2019), um pigmento vegetal, da subclasse flavonol, biossintetizado através da via metabólica dos fenilpropanóides, e que está presente em vegetais, frutas e chá (NISHIMURO et al., 2015; SINGH et al., 2021).

A quercetina já é amplamente estudada como potencial terapia para a leishmaniose, sua atividade *in vitro* contra promastigotas de *L. braziliensis* já foi observada, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e levando a morte do parasito por apoptose/necrose (CATANEO et al., 2019). Além disso, a quercetina e derivados semissintéticos já demonstraram atividade anti-*Leishmania* contra

L. donovani, L. amazonensis e *L. major* (SEN et al., 2008; DA SILVA; DO CARMO MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012; MOHAJERI et al., 2018).

Frente a isso, neste trabalho buscamos avaliar *in vitro* a atividade imunomoduladora da quercetina em monócitos infectados com *L. Infantum*, espécie causadora da LV. Além disso, também investigamos a ação da quercetina associada à Anfotericina B, um fármaco de referência já comercialmente utilizado, a fim de investigar possíveis efeitos sinérgicos e trazer novos direcionamentos para o tratamento da leishmaniose.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. ORIGEM FILOGENÉTICA DO GÊNERO *LEISHMANIA*

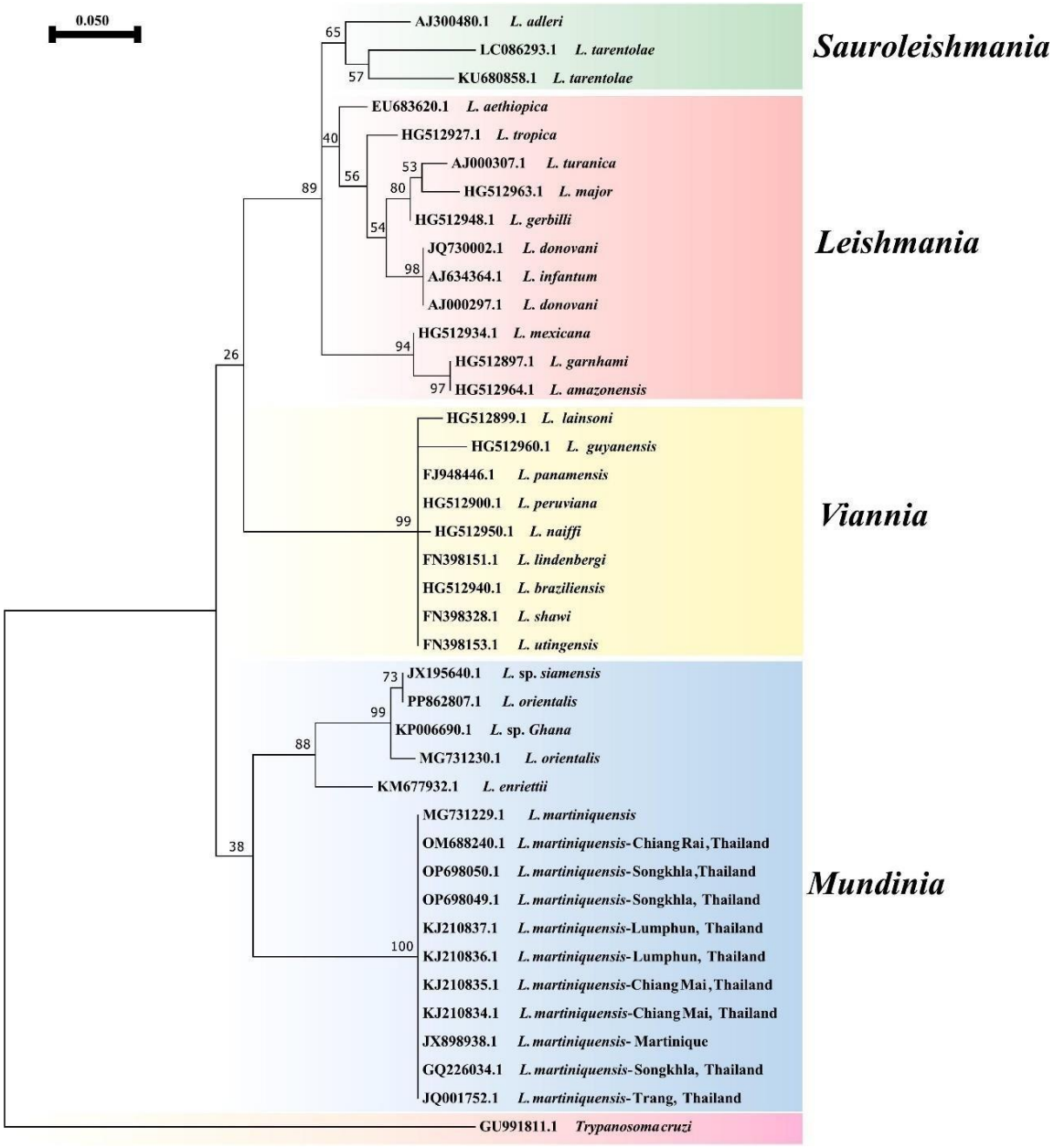
Existem muitas teorias sobre as possíveis origens e disseminação do gênero *Leishmania* pelo mundo. *Leishmania* pertence a ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae, e está incluído no supergrupo eucarioto Excavata, cujos fósseis sugerem um surgimento no período Ordoviciano, na era Paleozoica, há mais de 440 milhões de anos atrás (TUON; AMATO NETO; SABBAGA AMATO, 2008; ROCHA et al., 2018). Ademais, especula-se que o gênero possa ter se originado apenas na era mesozoica, ocorrida entre 252 a 66 milhões de anos atrás (STEVERDING, 2017).

Em relação ao ambiente geográfico de origem, algumas hipóteses são atualmente discutidas. A primeira hipótese (LYSENKO, 1971), afirma que os protozoários *Leishmania* podem ter se originado durante o paleoceno (66 a 56 milhões de anos atrás), na área paleártica, região que atualmente abrange territórios da Europa, Ásia e África. A hipótese também é sustentada pela existência de fósseis de roedores murídeos e flebotomíneos ancestrais, que provavelmente se desenvolveram na região paleártica durante o paleoceno. De forma contrastante, também foi hipotetizado (LAINSON et al., 1987) que o gênero *Leishmania* se originou na região Neotropical, sugerindo que as preguiças foram o seu primeiro hospedeiro vertebrado. A terceira hipótese (MOMEN; CUPOLILLO, 2000), aborda sobre as origem dos parasitos no supercontinente de Gondwana, no Mesozoico, após a separação da Pangeia, e sugere que com a separação dos continentes os subgêneros *Leishmania* e *Sauroleishmania* se desenvolveram em regiões atualmente pertencentes à África, e que o subgênero *Viannia* evoluiu inicialmente na América do Sul (HARKINS et al., 2016; STEVERDING, 2017).

Atualmente, o gênero *Leishmania* é dividido em quatros subgêneros: *Leishmania* (*Leishmania*), *L.* (*Mundinia*), *L.* (*Sauroleishmania*) e *L.* (*Viannia*) (figura 1). Os subgêneros *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)* são os principais causadores de doenças em mamíferos. Já o *L.* (*Sauroleishmania*) foi separado apenas com espécies causadoras de leishmaniose em répteis, contando com 21 espécies já descritas. Por sua vez, *L.* (*Mundinia*) é o subgênero criado mais recente e menos estudado até o momento, e contém apenas 4 espécies descritas: *L. enriettii* , *L. macropodum* , *L. martiniquensis* e *L. orientalis*. Apesar disso, *Leishmania* (*Mundinia*) spp. é de interesse especial, pois também

possui espécies patogênicas para humanos (*L. enriettii* e *L. macropodum*) (BUTENKO et al., 2019; TICHA et al., 2021).

Figura 1 – Árvore filogenética do gênero *Leishmania*



Fonte: AHMADI et al., 2024. Relações evolutivas entre diversas espécies de *Leishmania* são ilustradas pela árvore, que inclui representantes de diferentes subgêneros *de Leishmania* (*Mundinia* , *Viannia* , *Leishmania* e *Sauroleishmania*). *Trypanosoma cruzi* é classificado como um grupo externo.

Por causar leishmaniose em diversas espécies de mamíferos, os subgêneros *L.* (*Leishmania*) e *L.* (*Viannia*) foram os mais amplamente estudados até agora. Devido a isso, existem atualmente diversas espécies de *Leishmania* descritas dentros desses

subgêneros, incluindo: *Leishmania (L.) donovani, Leishmania (L.) infantum, Leishmania (L.) major, Leishmania (L.) tropica* e *Leishmania (L.) aethiopica*, que podem ser encontradas na Ásia, Europa e África. Já nas américas, espécies como: *Leishmania (L.) amazonensis, Leishmania (V.) braziliensis, Leishmania (V.) guyanensis, Leishmania (V.) peruviana, Leishmania (V.) panamensis* e *Leishmania (L.) mexicana* (LAINSON, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010 apud ROCHA et al., 2018). Ademais, *Leishmania (L.) donovani*, é a principal causadora de LV no sudeste asiático, em países como Índia, Bangladesh e Nepal, e na África Oriental, especialmente no Sudão, Etiópia, Quênia e Somália. Já a *Leishmania (L.) infantum*, também conhecida como *L. chagasi* nas Américas, causa a LV em regiões como o Mediterrâneo, Oriente Médio, Afeganistão, Irã, Paquistão e Brasil (MAURÍCIO, 2018; SCARPINI et al., 2022).

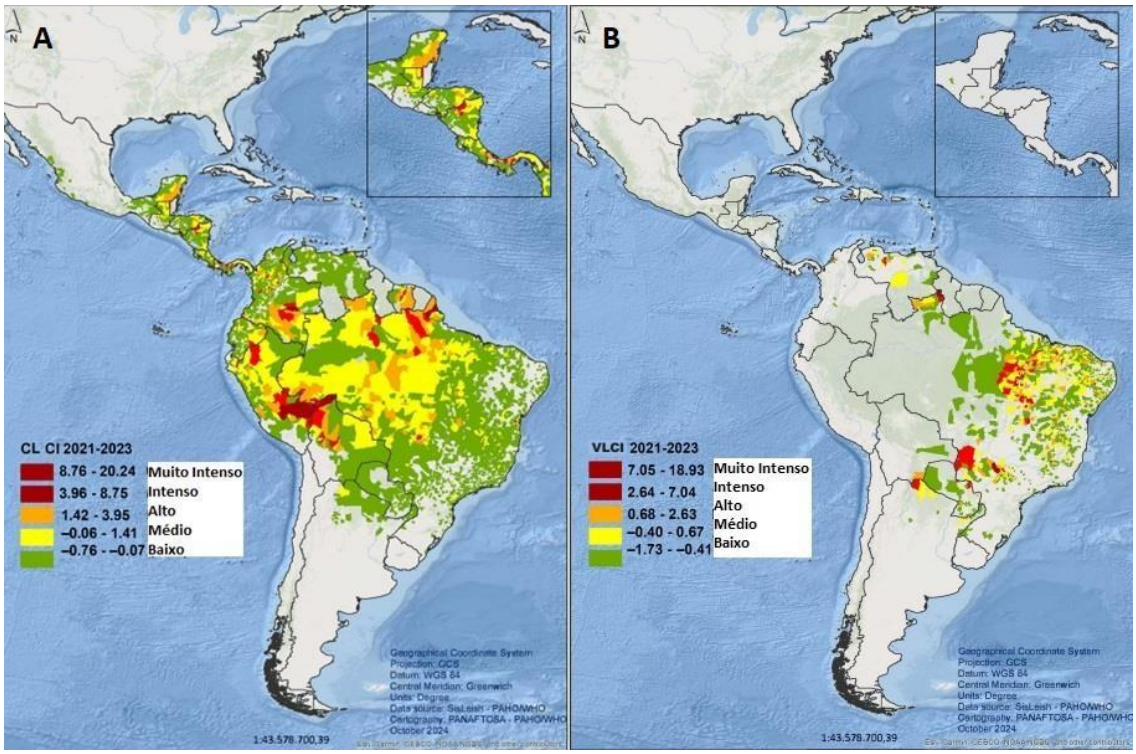
Com base nisso, é possível observar que a origem filogenética do gênero *Leishmania*, bem como suas classificações taxonômicas, ainda não foram totalmente definidas e cotinuam sendo base para discussões científicas. Além disso, *L. donovani* e *L. infantum*, são as espécies de maior importância nos estudos que visam a busca por tratamentos para a leishmaniose visceral.

2.2. EPIDEMIOLOGIA, IMPORTÂNCIA E ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2023), cerca de 50 a 90 mil novos casos de LV ocorrem no mundo anualmente. Entretanto essa estimativa torna-se pouco precisa, devido aos baixos indíces de reporte de casos à organização. Já para a leishmaniose cutânea, são estimados 600.000 a 1 milhão de novos casos por ano, com apenas 200 mil sendo relatados à OMS. Ademais, apenas oito países contribuem para 90% dos casos de LC: Brasil, Afeganistão, Argélia, Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria (DE VRIES; SCHALLIG, 2022). Por conseguinte, de acordo com o boletim informativo da Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO, 2024), durante o triênio 2021-2023, casos de LV foram notificados em 1233 municípios na região das Américas. Todos os municípios com transmissão muito intensa foram no Brasil; já com transmissão intensa, distribuiram-se entre Brasil, Argentina, Bolívia e Paraguai; e os com alta transmissão foram observados no Paraguai, Venezuela e Brasil. Além disso, vale ressaltar

que, no Brasil, as leishmanioses tem ocorrência nas cinco regiões do país, sendo, portanto, um problema de importância nacional. Apesar disso, o número de casos concentra-se principalmente nas regiões norte e nordeste (Figura 2).

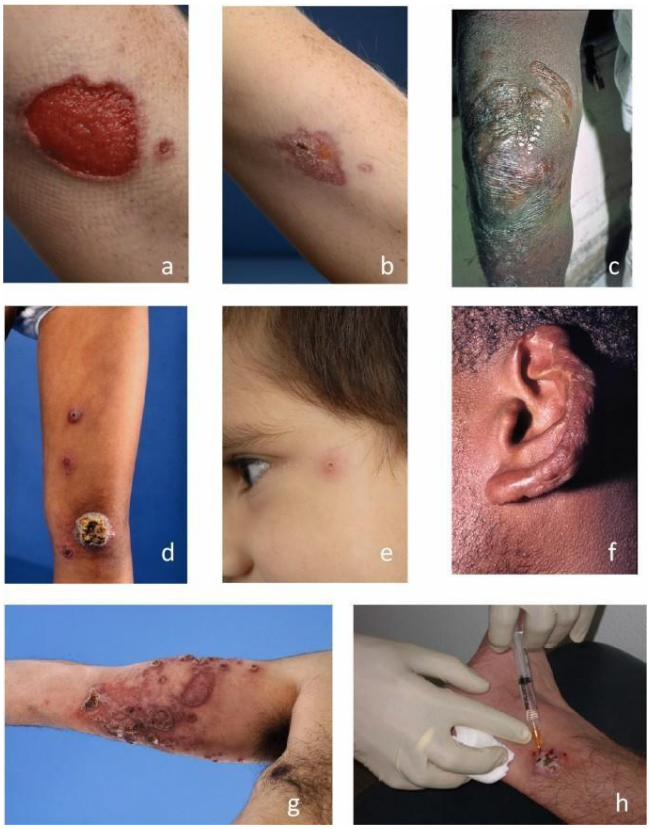
Figura 2 – Leishmaniose cutânea e visceral, região das Américas, 2021–2023



Fonte: Adaptado de Pan American Health Organization. LEISHMANIASIS: Epidemiological report on the Region of the Americas. No. 13, December 2024. Estratificação do risco de leishmaniose cutânea (A) e visceral (B) no segundo nível administrativo subnacional de acordo com o indicador composto de leishmaniose cutânea (CLCI) e visceral (VLCI).

Adiante, em relação aos aspectos clínicos da doença, as leishmanioses apresentam diferentes formas de manifestação no organismo do hospedeiro vertebrado. A forma mais disseminada é a leishmaniose cutânea, que caracteriza-se pelo surgimento inicial de uma pápula no local da inoculação dos parasitos, evoluindo para um nódulo e podendo causar lesões ulcerativas, com posterior formação de cicatrizes desfigurantes (figura 3) (VOLPEDO et al., 2021; ABADÍAS-GRANADO et al., 2021).

Figura 3 – Várias manifestações de leishmaniose cutânea



Fonte: Departamento de Dermatologia, Amsterdam UMC, Amsterdã, Holanda. DE VRIES; SCHALLIG, 2022. **a** Úlcera de leishmaniose cutânea com uma lesão satélite no antebraço. **b** O mesmo paciente de a, curado após tratamento com crioterapia e antimoniais intralesionais. **c** Lesão de leishmaniose cutânea não ulcerativa no cotovelo. **d** Úlcera de leishmaniose cutânea crostosa com linfangite na parte superior da perna. **e** Lesão de leishmaniose cutânea típica. **f** Úlcera de Chiclero, afetando tipicamente a orelha com destruição da cartilagem. **g** Lesões cutâneas disseminadas em um paciente com leishmaniose mucocutânea causada *por L. guyanensis.* **h** Tratamento intralesional de leishmaniose cutânea com antimoniais.

Além disso, na LC as lesões ainda podem ser únicas ou múltiplas e a infecção pode atingir o sistema linfático, causando o aumento dos linfonodos e formação de lesões satélites. Do mesmo modo, a leishmaniose mucocutânea também causa lesões na pele, porém, extende-se também para regiões mucosas, desfigurando áreas como cavidades nasais, orofaringe, laringe, cordas vocais e cartilagens. Assim, para ambos os casos o tratamento é necessário. Contudo, para LMC é indispensável, pois a doença pode ser fatal (ABADÍAS-GRANADO et al., 2021; SEVERINO et al., 2022).

Ao contrário das duas primeiras formas clínicas da leishmaniose, onde os protozoários residem apenas em macrófagos da pele e seus linfonodos de drenagem, na leishmaniose visceral os parasitos se espalham sistemicamente, infectando macrófagos de órgãos internos, principalmente do fígado, baço, medula óssea e linfonodos. Dentre os

sintomas da doença estão: febre, perda de peso, esplenomegalia, icterícia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia policlonal (IgG e IgM). Ademais, devido ao seu processo infeccioso de grande amplitude, a LV é bastante grave e quando não tratada tem índices de mortalidade acima de 90% dos casos (KUMAR; NYLÉN, 2012; KONE et al., 2019).

Uma quarta forma da doença a ser considerada é a leishmaniose dérmica pós-kalazar (PKDL), uma complicação dermatológica da LV, que ocorre em alguns pacientes dentro de um ano após a conclusão do tratamento, sendo mais comum em casos de LV na África e Ásia. Nesta condição clínica, os pacientes não estão mais sistemicamente infectados e portanto não apresentam sintomas como febre, hepatomegalia e esplenomegalia. Entretanto, a remissão da doença ainda não ocorreu de forma completa, fazendo com que os parasitos possam ser encontrados em macrófagos residentes da pele, com aparecimento de nódulos, pápulas e máculas hipopigmentadas (figura 4). Apesar dos estudos já realizados, a manifestação da PKDL ainda não é totalmente esclarecida (KUMAR; NYLÉN, 2012; ZIJLSTRA, 2016; VOLPEDO et al., 2021).

Figura 4 – PKDL nodular e papular

Fonte: ©World Health Organization, 2012. The Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) Atlas: A Manual for Health Workers. Pápulas em vários estágios de desenvolvimento e densidade e de vários tamanhos; com localização inicial típica ao redor da boca.

Por fim, outra problemática clínica, envolve a existência de casos de co-infecção *Leishmania*-HIV. O primeiro caso dessa co-infecção foi descrito na Europa em 1985 e posteriormente espalhou-se para outros países como o Brasil. A preocupação da co-infecção é relevante, pois a mortalidade é relatada como significativamente maior nesses pacientes. Além disso, são observados nos co-infectados uma maior disseminação do parasito, má resposta ao tratamento, cura tardia, ausência de reconstituição imunológica após o tratamento e recidivas da doença. Ademais, também observa-se que durante a co-infecção, a progressão da infecção viral para a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é mais rápida, com uma redução mais acelerada na contagem de linfócitos T CD4+, aumento da carga viral e soroconversão. Na Tailândia, o número de co-infectados tem aumentado e as espécies de *Leishmania* mais comumente relatadas na região são *L. (Mundinia) martiniquensis* e *L. (Mundinia) orientalis*. Destes casos, aproximadamente 40% eram pacientes com HIV/AIDS, o que aumentou a atenção das autoridades de saúde para os casos de *Leishmania*-HIV, que passaram a constituir um grave problema de saúde pública global (COUTINHO et al., 2017; MAKSOUD; EL HOKAYEM, 2023; RUANG-AREERATE et al., 2023).

Assim, a leishmaniose pode apresentar diferentes manifestações clínicas, desde quadros mais brandos observados na leishmaniose cutânea, à quadros graves que podem ser fatais, tais como ocorrem na LMC e LV. Sendo assim, a leishmaniose ainda é um problema importante e atual, que merece mais atenção das autoridades e sobretudo no Brasil, que está no ranking entre os países com maior número de casos no mundo.

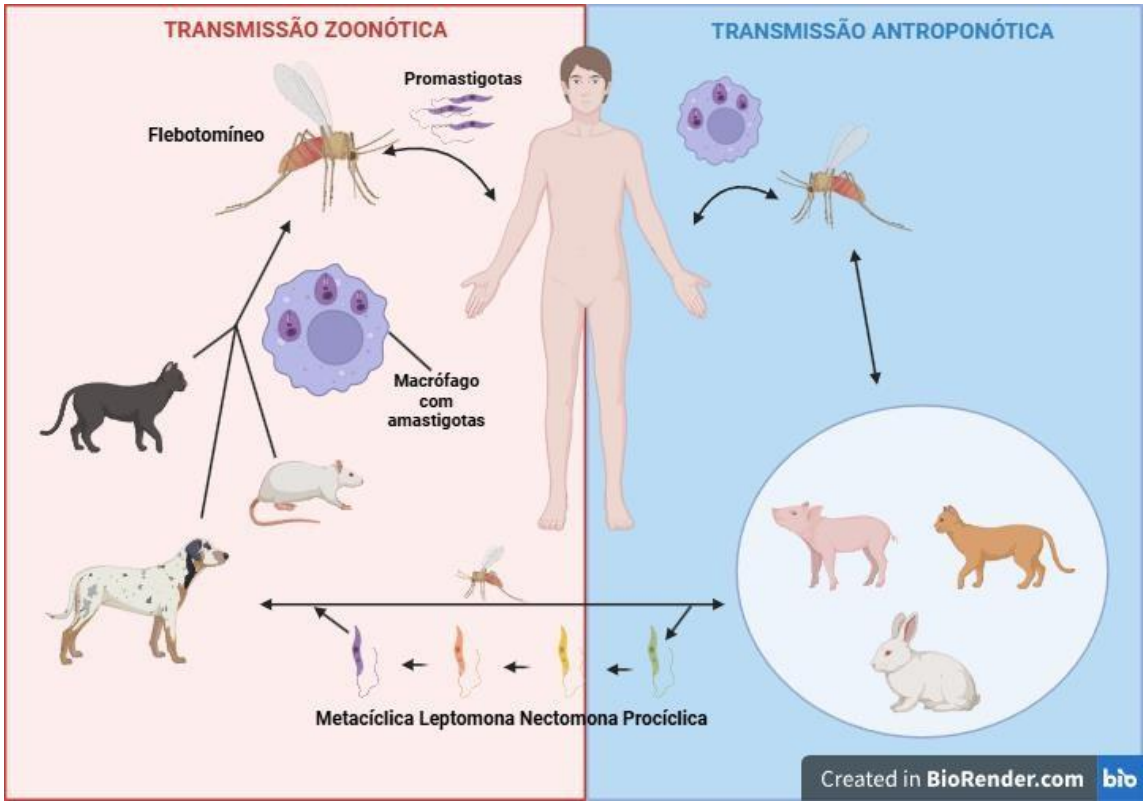
2.3. CICLO EVOLUTIVO DOS PARASITOS E INTERAÇÕES MOLECULARES PATÓGENO-HOSPEDEIRO

A transmissão de *Leishmania spp.* para seus hospedeiros vertebrados ocorre durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos fêmeas, que além de utilizarem açúcares vegetais como fonte de energia, também se alimentam de sangue para se desenvolver e colocar ovos. Os flebotomíneos são pertencentes a ordem díptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Esta subfamília ainda dividi-se em seis gêneros: *Phlebotomus, Sergentomyia, Chinius, Lutzomyia, Brumptomyia* e *Warileya*. Os gêneros que possuem importância clínica na transmissão da leishmaniose são:

Phlebotomus e *Lutzomyia*, responsáveis pela disseminação dos parasitos no velho mundo (África, Europa e Ásia) e no novo mundo (Américas), respectivamente (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022; COSTA-DA-SILVA et al., 2022).

O ciclo evolutivo da *Leishmania* é heteroxênico (figura 5), nos hospedeiros invertebrados os parasitos encontram-se em sua forma promastigota extracelular flagelada, que possui diferentes estágios de desenvolvimento. Já nos vertebrados, a *Leishmania* assume sua forma amastigota intracelular não flagelada, que é morfologica e bioquimicamente distinta da promastigota (figura 6). Inicialmente, ao picar um mamífero infectado os mosquitos ingerem junto com o sangue amastigotas intracelulares ou livres. No sistema digestório do mosquito, as mudanças de pH e temperatura criam um microambiente favorável para a diferenciação das amastigotas em promastigotas procíclicas, que se multiplicam intensamente e logo se diferenciam em promastigotas nectomonas. Estas, por sua vez, ancoram-se no intestino médio do mosquito por meio de moléculas de superfície, tal como o lipofosfoglicano (LPG), o que impede a excreção dos protozoários pelo fluxo intestinal. As nectomonas ainda se diferenciam em leptomonas antes de finalmente chegarem ao estágio infeccioso de promastigota metacíclica (SERAFIM et al., 2021; COSTA-DA-SILVA et al., 2022; CLOS; GRÜNEBAST; HOLM, 2022).

Figura 5 – Ciclo de transmissão de *Leishmania* spp.



Fonte: Autoria própria, 2025. Criado em BioRender.com.

No estágio metacíclico, os parasitos estão prontos para serem inoculados nos hospedeiros vertebrados. Entretanto, para que isso aconteça de forma eficaz, uma pequena fração de promastigotas leptomonas, que não se transformaram em metacíclicas, transformam-se em haptomonas. Essas últimas possuem a capacidade de adesão ao epitélio da válvula estomodeal do mosquito através de estruturas semelhantes a hemidesmossomos, causando bloqueio na válvula e diminuindo a entrada de sangue, o que leva o mosquito a um maior tempo de alimentação e portanto, maior tempo para a deposição de parasitos no local da picada. Ademais, as leptomonas ainda produzem o chamado gel secretor promastigota, e ficam embutidas no gel junto as metacíclicas e haptomonas, formando uma espécie de biofilme. O biofilme, também ajuda na transmissão, bloqueando parcialmente a passagem para o intestino e reduzindo a eficácia da alimentação, tal como as haptomonas, o que leva a mais tentativas de alimentação por parte do flebotomíneo e maior regurgitação dos parasitos. Além disso, o biofilme também ajuda no posicionamento dos parasitos para o momento da transmissão (ALCOLEA et al., 2019; SERAFIM et al., 2021; ROGERS; DE PABLOS; SUNTER, 2024).

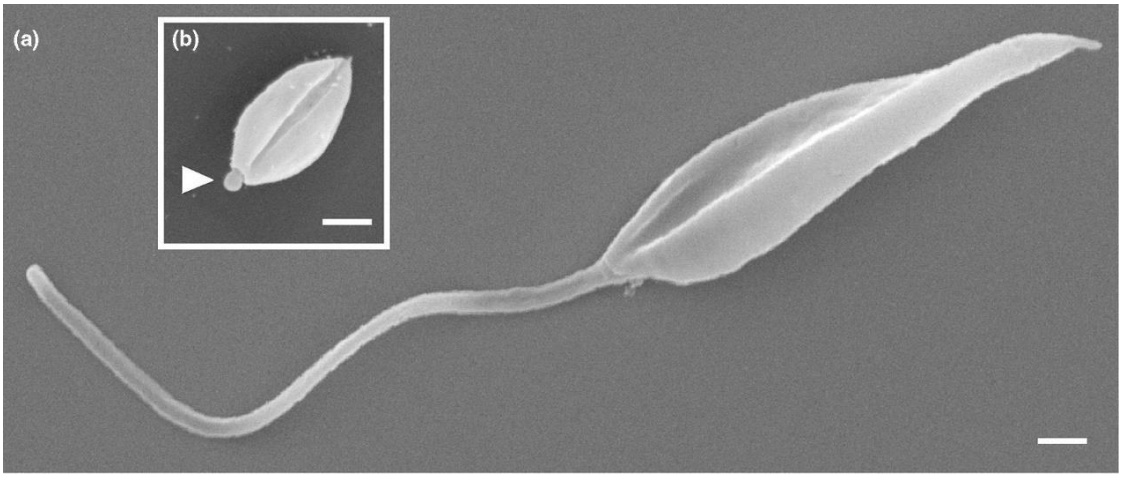
Quando inoculadas no hospedeiro vertebrado, o qual consideraremos como modelo a partir de agora o humano, as promastigotas metacíclicas invadem diferentes tipos celulares, incluindo neutrófilos, monócitos e macrófagos, que são rapidamente recrutados para o local da lesão. Porém, ainda antes dos processos fagocíticos, os protozoários precisam sobreviver ao sistema complemento. Para isso, a *Leishmania* spp. possui fatores de patogenicidade presentes em sua superfície, tal como a zinco-metaloprotease GP63, que atua inibindo a atividade do complemento através de sua ligação a C3b e conversão em C3bi, uma forma inativa que reduz a formação do complexo de ataque à membrana terminal C5-C9. Além disso, a metaloprotease degrada a matriz extracelular subcutânea do hospedeiro, ajudando na movimentação dos parasitos (DUQUE; DESCOTEAUX, 2015; SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016).

Após vencer a barreira do sistema complemento, os parasitos ainda precisarão lutar pela sua sobrevivência dentro dos meios intracelulares. A internalização dos parasitos por células especializadas, tais como monócitos e macrófagos, envolve receptores da membrana plasmática da célula hospedeira, que reconhecem ligantes no parasitos. Nesses receptores estão incluídos os receptores de complemento CR1 e CR3, o receptor de fibronectina, o receptor de manose-fucose e o receptor para produtos finais de glicosilação avançada. Além disso, a internalização dos parasitos se dá por meio de processos passivos e ativos. Já se foi observado que a entrada passiva de *Leishmania* spp. ocorre através de endocitose mediada por caveolinas, proteínas transmembranares que oligomerizam em balsas lipídicas ricas em colesterol para formar a invaginação da membrana. Tal tipo de endocitose, já foi observada em macrófagos murinos para *L. chagasi* e *L. donovani* (RODRÍGUEZ; GAUR; WILSON, 2006; KUMAR et al., 2019; VALIGUROVÁ; KOLÁŘOVÁ, 2023).

Curiosamente, durante esse processo, as promastigotas também atuam de forma ativa para infectar as células hospedeiras. Evidências comprovam que a viabilidade, polaridade e motilidade flagelar dos parasitos contribuem para a sua captação por macrófagos. Durante o contato entre as células, a ponta do flagelo dos protozoários interage com a membrana da célula hospedeira. Além disso, a composição da membrana do flagelo pode estar associada a funções especializadas como adesão e sinalização, corroborando para uma fixação orientada e entrada do parasito na célula por interações de receptor/ligante. Dentro das células hospedeiras ainda ocorre a reorientação dos parasitos ocasionada pela atividade flagelar persistente. Posteriormente, os parasitos são

orientados de forma altamente polarizada, com seu flagelo direcionado para a periferia da célula hospedeira e seu corpo celular direcionado para o núcleo. Por fim, o parasito perde sua motilidade, provavelmente ocasionada pelo início da diferenciação em amastigotas, resultando na retração do seu flagelo – Figura 6 (FORESTIER et al., 2011; VALIGUROVÁ; KOLÁŘOVÁ, 2023).

Figura 6 - Micrografias eletrônicas de varredura de promastigota e amastigota axênica de *L. mexicana*



Fonte: Adaptado de GLUENZ; GINGER; MCKEAN, 2010. Diferença no comprimento do flagelo entre o promastigota *de L. mexicana* (**a**) e a amastigota axênica (**b**).

Assim como a metaloprotease GP63, o LPG presente na membrana de promastigotas é um fator de patogenicidade de grande importância para a sua sobrevivência. O LPG é o principal glicoconjugado da superfície de promastigotas e passa por alterações de produção significativas durante o ciclo de vida do parasito, dobrando sua quantidade na transição de promastigotas procíclicas para metacíclicas e diminuindo intensamente na transformação para amastigotas. Sabe-se que o LPG confere resistência à ação lítica do sistema complemento em humanos, mas além disso, essa estrutura de superfície propicia condições favoráveis para o parasito dentro da célula hospedeira, favorecendo a diferenciação de promastigotas para amastigotas, ajudando no retardo da fusão do fagossomo com o lisossomo e prejudicando a produção de superóxidos. Retardar a formação do fagolisossomo é essencial para os protozoários, que ganham tempo para a sua transformação em amastigotas, forma celular que é resistente à morte por oxidantes tóxicos (LODGE; DESCOTEAUX, 2005; RODRÍGUEZ; GAUR; WILSON, 2006; RODRÍGUEZ et al., 2011).

Adiante, dentro do fagolisossomo, os parasitos suprem sua necessidade de fontes de carbono, absorvendo purinas, vitaminas, aminoácidos e lipídios do fagolisossomo (MCCONVILLE et al., 2007). Com isso, após a conquista do ambiente intracelular, as amastigotas podem ser proliferar e posteriormente levar à morte da célula hospedeira, sustentando a infecção através da invasão de outras células.

2.4. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP.

2.4.1. Mecanismos de evasão imunológica do parasito

No início da infecção, as primeiras células a serem recrutadas para o local da picada e majoritariamente invadidas pelos parasitos são os neutrófilos. Os polimorfonucleares são importantes para a evasão imunológica da *Leishmania* spp., pois servem como células hospedeiras intermediárias para os protozoários e "cavalos de troia" que serão eferocitados por monócitos/macrófagos, fazendo com que as promastigotas cheguem de fato às suas células-alvo. Contudo, para que isso dê certo os parasitos desativam a maquinária de morte intracelular especializada dos neutrófilos, inibindo sua explosão oxidativa e levando-os a uma via de fagocitose de células apoptóticas. Isso ocorre pois em meio as promastigotas viáveis, existem subpopulações de promastigotas apoptóticas expressando fosfatidilserina em sua superfície, o que induz a produção de fator de crescimento transformador beta (TGF-ß), de caráter anti-inflamatório, por parte dos polimorfonucleares. Como células apoptóticas (expressando fosfatidilserina) não seriam uma ameaça, o resultado final é a captação de parasitos, pelos neutrófilos, sem a ativação de suas funções efetoras antimicrobianas. Por fim, a *Leishmania* spp. ainda se aproveita da morte por apoptose dos neutrófilos e recrutamento de macrófagos, para chegar as suas células hospedeiras terminais (VAN ZANDBERGEN et al., 2006 apud RITTER; FRISCHKNECHT; VAN ZANDBERGEN, 2009; GUEIRARD et al., 2008 apud LIÉVIN-LE MOAL; LOISEAU, 2016).

Nos monócitos/macrófagos, os parasitos alteram vias sinalizatórias importantes a fim de sobreviverem. Dentro do ambiente intracelular a proteína patogênica GP63 exerce múltiplas funções a favor dos parasitos, clivando proteínas cinases e fatores de transcrição, e modulando negativamente mecanismos regulatórios do hospedeiro. Já se

foi observado que GP63 participa da ativação da proteína tirosina fosfatase (PTP) SHP-1, que regula negativamente a estimulação de Interferon gama (IFN-γ) na via de sinalização JAK-2/STAT-1, responsável pela produção de agentes antimicrobianos, como o óxido nítrico (NO). Além disso, a metaloprotease dos parasitos também pode estar envolvida na alteração da sinalização de STAT1α e na clivagem da enzima c-Jun N-terminal cinase (JNK), causando impactos na sinalização de vias pró-inflamatórias (ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012; DONG et al., 2021). Simultaneamente, GP63 também neutraliza a resposta de células Natural Killer (NK), que desempenham um papel importante na resposta aos parasitos por meio da produção de IFN-γ (SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016).

Ademais, é relatado que peptidases de cisteínas de amastigotas de *L. mexicana* agem degradando o fator nuclear kappa B (NF-κB), interrompendo a produção de Interleucina 12 (IL-12) em macrófagos. De forma contradotória, já se foi observado também que essas peptidases de *L. mexicana* clivam as cinases JNK e ERK, aumentando a transcrição de IL-12 (CAMERON et al., 2004 apud SIQUEIRA-NETO et al., 2018). Adiante, outro mecanismo interessante foi observado em *L. amazonensis*, onde suas peptidases de cisteínas atuam degradando moléculas de MHC de classe II, prejudicando a apresentação de antígenos (LEAO et al., 1995 apud SIQUEIRA-NETO et al., 2018). Além disso, o LPG dos parasitos pode se ligar ao Receptor Toll-Like 2 (TLR-2) e induzir a expressão e ativação da serina/treonina fosfatase PP2A, inativando proteínas adaptadoras citoplasmáticas do TLR como: cinase 1 associada ao receptor de interleucina-1 (IRAK-1), Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK) e o complexo enzimático IκB, levando à tolerância imunológica (FERNÁNDEZ-FIGUEROA et al., 2016).

Assim, é possível observar que o parasito evoluiu para atingir múltiplos alvos de defesa do hospedeiro e manter sua sobrevivência. Portanto, o estudo desses alvos e de novas terapias que auxiliem o sistema imune no combate à leishmaniose torna-se imprescindível.

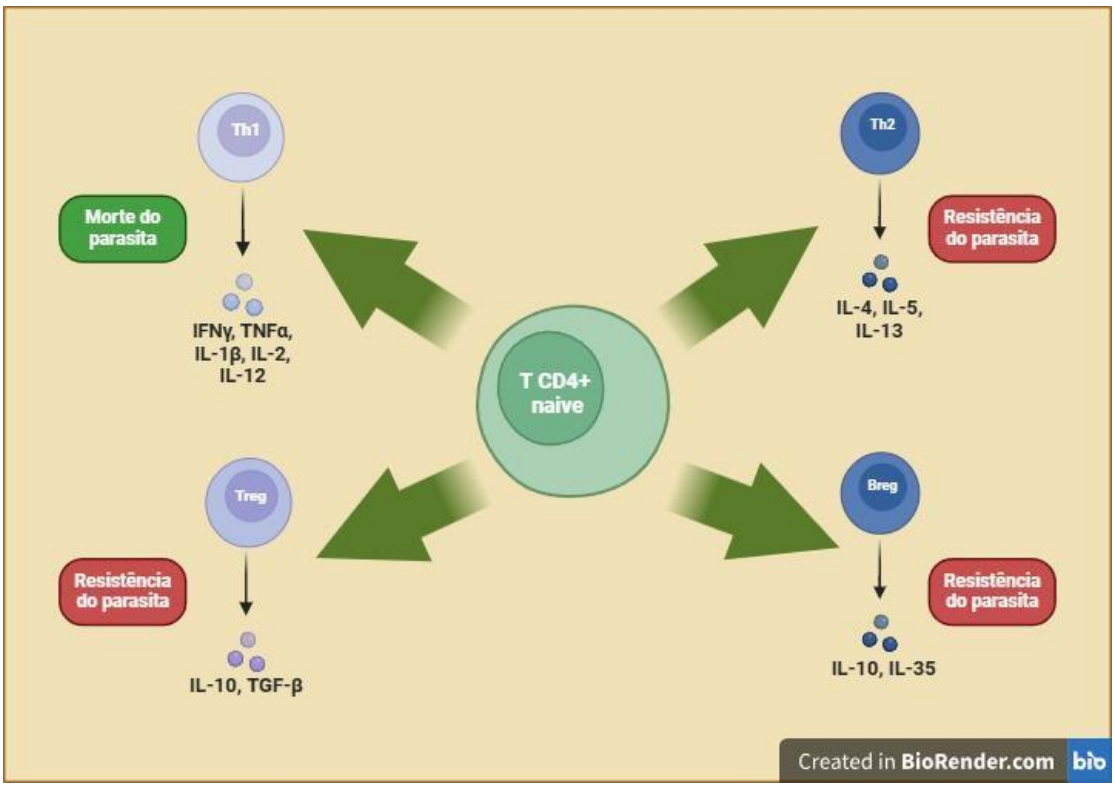
2.4.2. Atuação de células imunológicas e citocinas na infecção por *Leishmania* spp.

Apesar do ataque eficiente da *Leishmania* spp. contra os sistemas de defesa do hospedeiro, muita vezes, os parasitos não obtém êxito. Porém, a progressão ou remissão

da infecção, irá depender do perfil de citocinas e da construção da resposta imunológica de cada indivíduo.

Já se sabe de forma ampla que respostas celulares do tipo Th1 são protetivas para o hospedeiro. A IL-12, por exemplo, faz parte das respostas Th1 e ajuda no controle da infecção, estimulando a produção de IFN-γ. Ademais, células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com imunidade adquirida para leishmaniose cutânea apresentam aumento dos níveis de IFN-γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α). Ambas as citocinas são de grande importância para o controle da infecção, pois auxiliam nas respostas antimicrobianas de macrófagos, ativando vias de explosão oxidativa que elevam a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e NO, os principais mediadores microbicidas que ajudam na eliminação dos parasitos. Em contrapartida, respostas do tipo Th2 com perfis de citocinas como IL-4, IL-10 e TGF-ß, estão relacionadas ao agravamento da doença (KEMP et al., 1999; NOVAIS et al., 2014; ROSSI; FASEL, 2018; VOLPEDO et al., 2021; SAMANT et al., 2021). Do mesmo modo, respostas de células Treg (IL-10 e TGF-β) e Breg (IL-10 e IL-35) também estão relacionadas à maior suscetibilidade do hospedeiro e persistência do parasito – Figura 7 (DIVENUTO et al., 2023).

Figura 7 - Dogma imunológico "Th1/Th2", resposta Breg e Treg na leishmaniose



Fonte: Adaptado de DIVENUTO et al., 2023. As citocinas IL-12, IL-1β, IFN-γ, TNF-α e IL-2 induzem a ativação de macrófagos e a morte de parasitos por NO na resposta Th1. Por outro lado, uma intensa resposta Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), Treg (IL-10 e TGF-β) e Breg (IL-10 e IL-35) estão envolvidas na disseminação do parasito.

Apesar dos estudos clássicos sobre respostas Th1 e Th2 na infecção por *Leishmania* spp., na leishmaniose visceral a fisiopatologia da doença parece não se correlacionar de forma direta com disfunções da resposta Th2 (KUMAR; NYLÉN, 2012). Estudos já demonstraram que pacientes com LV apresentam níveis aumentados de IL-1, IL-6, IL-8, IFN-γ e TNF-α, sugerindo que o desenvolvimento da doença não seja impulsionado apenas por respostas Th2 disfuncionais, mas sim por outros mecanismos também. Adiante, estudos clínicos em pacientes com LV mostraram níveis elevados de IL-10 no soro, bem como do seu mRNA em orgãos como medula óssea, baço e linfonodos. A IL-10, de caráter anti-inflamatório, pode estar associada a progressão da doença ao inibir as respostas microbicidas dos fagócitos, pois regula negativamente a produção de TNF-α e NO, inibindo a morte de amastigotas intracelulares (ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006; KURKJIAN et al., 2006; NYLÉN et al., 2007; KUMAR; NYLÉN, 2012).

Adiante, as respostas das células Th17, secretoras de IL-17 e positivas para receptor órfão relacionado (ROR) γT e ativador de sinal e transdução da transcrição (STAT)-3, também possuem sua importância e tem sido evidenciadas de forma contrastante na LV (DE FRANÇA et al., 2024). Se por um lado a resposta de IL-17 tem sido associada a pacientes assintomáticos (CARRILLO et al., 2017), por outro a IL-17 também esteve envolvida com a suscetibilidade à LV causada por *L. donovani* (TERRAZAS et al., 2016). Além disso, em pacientes com leishmaniose cutânea, mucocutânea e dérmica pós-calazar, níveis aumentados de IL-17 na pele contribuíram menos para a cicatrização da feridas do que em outros tecidos (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017). Por outro lado, indivíduos que se recuperaram de uma infecção por LV ou LC foram capazes de induzir uma proteção duradoura contra a reinfecção, com níveis elevados de IL-17 e IL- 22 (BANERJEE et al., 2016). Ademais, sabe-se que IL-27 inibe a secreção de IL-17 e IL-22 e na LV já se foi observado níveis diminuídos de IL-17/RORγT e aumentados de IL-27. A partir disso é sugerido (KUMAR; NYLÉN, 2012) que a IL-27 possa ter um papel na patogênese da LV, suprimindo as ações da resposta Th17 que seriam potencialmente protetoras. Porém, também é ressaltado que a supressão da linhagem Th17 poderia ser uma forma do corpo controlar seus efeitos

patológicos. Portanto, o entendimento sobre a resposta Th17 na leishmaniose ainda é dual, não está totalmente esclarecido e deve continuar a ser investigado.

Outros componentes imunológicos importantes associados à progressão ou cura da leishmaniose são os mecanismos de polarização de macrófagos. Os macrófagos quiescentes (M0), tal como os linfócitos T CD4+ (Th0), podem assumir diferentes fenótipos, a depender do microambiente de citocinas ao qual são expostos. Quando ativados por citocinas pró-inflamatórias como IFN-γ e TNF-α ou agonistas TLR como o lipopolissacarídeo (LPS), os macrófagos M0 são diferenciados no perfil M1, pró-inflamatório, que é caracterizado pela expressão de marcadores de superfície, como TLR-2, TLR-4, CD80, CD86, MHC-II e iNOS, e secretam citocinas como TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12, CXCL9 e CXCL10. Entretanto, quando estimulados por fatores como IL-4, IL-10 e IL-13, os macrófagos M0 são direcionados para o fenótipo M2, de caráter regulatório, que expressa marcadores de superfície como CD206, CD163 e CD209 e secreta moléculas como IL-10, TGF-β e arginase 1 (Arg1) (MURRAY, 2017; WANG et al., 2021; ALMEIDA et al., 2023).

Na leishmaniose visceral, a polarização de macrófagos é significativamente importante e pode determinar o curso da infecção. Em fenótipos M1 as vias de produção de energia, tais como glicólise e via das pentoses fofasto são reguladas positivamente para gerar energia em forma de ATP e NADPH, que são usados para a produção de EROs e eliminação dos protozoários. Ademais, macrófagos M1 aumentam sua expressão de IL-12 e TNF-α. A IL-12 está envolvida tanto no aumento de iNOS, quanto na diferenciação de células Th1 produtoras de IFN-γ. Já o IFN-γ promove a expressão de IL-12 e iNOS, criando um ciclo de feedback positivo, que resulta na produção de altas concentrações de NO, a fim de matar os parasitos. Diferentemente, os macrófagos M2 são direcionados para uma via de produção de IL-4 e IL-10, diminuindo a produção de NO. Ademais, a IL-10 pode diminuir a responsividade dos macrófagos ao IFN-γ, o que os torna mais permissivos a presença das amastigotas intracelulares (SAUNDERS; MCCONVILLE, 2020; VOLPEDO et al., 2021; ALMEIDA et al., 2023).

Além dos macrófagos e linfócitos, os monócitos também possuem um papel importante na infecção por *Leishmania* spp. Essas células podem ser divididas em 3 subpopulações: monócitos não clássicos ($CD14^{baixo}$ $CD16^{++}$), de longa duração e que monitoram os vasos sanguíneos como um processo fisiológico normal; monócitos intermediários ($CD14^{+}$ $CD16^{+}$); e monócitos clássicos ($CD14^{+}$ $CD16^{-}$), inflamatórios e

de curta duração (iMOS) (VOLPEDO et al., 2021). Já se foi observado que os monócitos podem participar da patogênese da LC, mediando respostas inflamatórias nas zonas de infecção (NOVAIS et al., 2014; PASSOS et al., 2015). Ao contrário, já se foi relatado que monócitos intermediários assumem um perfil anti-inflamatório na LV, tornando-os mais parecidos com monócitos não clássicos, do que com os clássicos. Acredita-se que esse perfil anti-inflamatório prejudique as respostas imunológicas, contribuindo para a persistência da infecção (KAUSAR et al., 2024). Ademais, NOVAIS et al., (2014) demonstraram que *L. braziliensis* é capaz de infectar as 3 subpopulações de monócitos. Contudo, os monócitos clássicos apresentaram uma maior capacidade de induzir explosão oxidativa e controlar os parasitos. Além disso, o estudo também mostra que os monócitos clássicos controlaram os protozoários através da produção de EROs, porém sem aumentar as quantidades de NO, tanto de forma inata, quanto após ativação por IFN-γ.

Com base nisso é possível observar que, o que separa a cura da progressão da leishmaniose são os diversos componentes da resposta imunológica de cada indivíduo. O balanço entre as respostas Th1, Th2 e Th17, a polarização de macrófagos M1 e M2, bem como o perfil inflamatório de monócitos, demonstram ser fatores chaves que determinam o curso da infecção. Todavia, nem tudo ainda está esclarecido e mais estudos nesse sentido ainda se fazem necessário.

2.5. TERAPIAS PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE E PROBLEMAS ASSOCIADOS

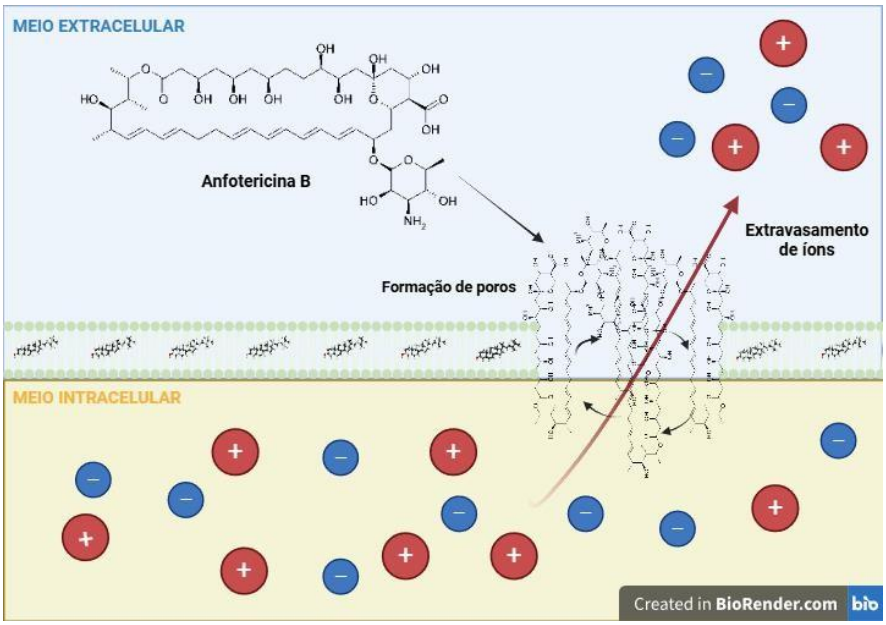
Os antimoniais pentavalentes foram introduzidos como terapêutica para a leishmaniose na década de 1940 e até hoje são os medicamentos de primeira linha contra todas as formas de leishmaniose, sendo os principais: o antimoniato de meglumina (Glucantime ®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam ®). Além disso, outros medicamentos também estão disponíveis para o tratamento, como a Pentamidina (Pentacarinat ®), Paramomicina (Humatin ®) e Anfotericina B (Anforicin B®, Funtex B®, Unianf®, etc). Contudo, todos os esses medicamentos apresentam consideráveis efeitos tóxicos para o organismo e alguns tem falhas no tratamento já registradas devido ao surgimento de linhagens de *Leishmania* resistentes. Apesar do desenvolvimento de formulações lipossomais menos tóxicas para Anfotericina B (AmBisome ®) e miltefosina

(Impavido ®), o alto custo de produção de um e o efeito teratogênico do outro, respectivamente, tornam seus usos ainda problemáticos (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; ALCÂNTARA et al., 2018; ALMEIDA et al., 2021; NERY et al., 2024). Assim, a busca por terapias mais efecientes continua sendo um desafio a ser resolvido pela ciência.

A miltefosina é o único tratamento oral para o tratamento da leishmaniose e foi aprovada em 1990. Inicialmente, a miltefosina foi um sucesso, porém, atualmente seu acesso para a população é difícil devido à cadeias de abastecimento ineficientes e baixo interesse das autoridades (SUNYOTO; POTET; BOELAERT, 2018). Além disso, outro problema envolvendo este fármaco é o surgimento de linhagens de *Leishmania* resistentes. Já se foi observado a recidiva da LV causada por *L. donovani* após o tratamento com miltefosina. Ademais, também há registros de recidivas de LC causada por *L. mexicana* e *L. amazonensis* após o uso do medicamento (CALVOPINA et al., 2006; ZERPA et al., 2007).

Outro fármaco bastante conhecido é a Anfotericina B, um antifúngico de amplo que passou a ser utilizado como tratamento de segunda linha para a leishmaniose na década de 1960, principalmente em casos de resistência de linhagens de *Leishmania* spp. aos antimoniais pentavalentes (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; SHIRZADI, 2019). Seus mecanismos de ação mais estudados são: a formação de poros na membrana plasmática dos microrganismos, levando a um choque metabólico e morte celular; e a interação com o ergosterol de membrana presente nos microrganismos, levando a desestabilização da membrana plasmática (figura 8). Entretanto, apesar de interagir preferencialmente com o ergosterol, a AmB também interage com o colesterol, o que a torna tóxica para células de mamíferos (OSTROUMOVA; EFIMOVA; SCHAGINA, 2012; CAROLUS et al., 2020). Com isso, seu tratamento requer hospitalização prologanda para monitoramento do paciente, e efeitos tóxicos como hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e atividade hemolítica já foram relatados (INSELMANN; INSELMANN; HEIDEMANN, 2002; NIX, 2014; LIU et al., 2023).

Figura 8 – Mecanismo de ação da Anfotericina B



Fonte: Autoria própria, 2025. Criado em BioRender.com. Formação de poros causada pela AmB através da interação com ergosterol de membrana e consequente extravasamento de conteúdo celular.

Com base nisso, a procura de novos fármacos para tratar a leishmaniose torna-se urgente. Além disso, devido ao fato da imunidade celular estar prejudicada durante a fase aguda da doença, a administração de fármacos que matam os parasitos junto a compostos que tenham efeitos imunomoduladores a favor do hospedeiro, parece ser um caminho promissor, que poderia ajudar o sistema imunológico em uma depuração mais rápida e eficaz dos invasores (SRIVASTAVA et al., 2017). Contudo, encontrar um novo agente promissor não é uma tarefa fácil, sendo um desafio para os cientistas.

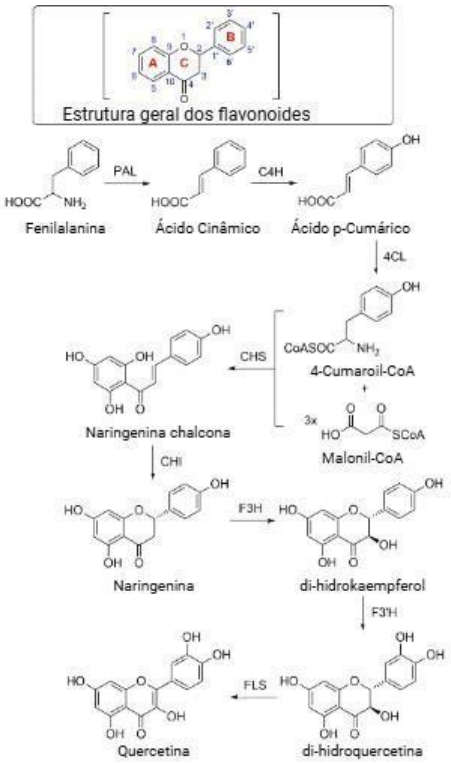
2.6. FLAVONOIDES COMO UMA NOVA PROPOSTA DE INTERVENÇÃO PARA TRATAR A LEISHMANIOSE

Os produtos naturais desempenham um papel crucial na história da descoberta de medicamentos. Dentro de uma vasta gama de compostos bioativos naturais, os flavonoides se destacam. Estes são metabólitos secundários com uma estrutura polifenólica, constituindo um grupo diversificado de produtos naturais encontrados amplamente em plantas vasculares. Ademais, essa classe de fitoquímicos é bastante produzida e utilizada pelas plantas como agentes defensivos que atuam como

fotoprotetores contra a luz solar ultravioleta e a previnem a peroxidação lipídica (BENTZ, 2017; ZHANG et al., 2022). Os flavonoides também estão entre as novas apostas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose e ganharam notoriedade devido a diversidade de efeitos biológicos que possuem, tais como: atividade antioxidante, pró-oxidativa, anti-câncer, anti-bacteriana, anti-*Leishmania*, entre outras (TASDEMIR et al., 2006; HIDALGO; SÁNCHEZ-MORENO; DE PASCUALTERESA, 2010; CATANEO et al., 2019; ZENG et al., 2019; SONG et al., 2020).

Dentre os flavonoides com atividade anti-*Leishmania* mais estudados está a quercetina (3, 3, 4, 5, 7-penta-hidroxiflavona), um flavonol aglicona que faz parte da dieta humana há séculos e pode ser encontrado em uma variedade de alimentos como: chás, maçã, brócolis, vinhos, espinafre, frutas vermelhas, coentro, amêndoa, cebola e alcaparras (BENTZ, 2017; AGHABABAEI; HADIDI, 2023). A quercetina é biossintetizada pela via metabólica dos fenilpropanoides (figura 9), através da conversão de fenilalinina em ácido cinâmico, que por sua vez é hidroxilado, formando ácido p-cumárico. Este último é convertido em 4-cumaroil-coA que se une a malonil-CoA para produzir a chalcona naringenina. Após mais algumas etapas, passando pela formação de di-hidrokaempferol e di-hidroquercetina, a quercetina finalmente é formada (SINGH et al., 2021).

Figura 9 – Via biossintética da quercetina



Fonte: Adaptado de SINGH et al., 2021. Biossíntese de quercetina a partir da fenilalanina.

Um dos efeitos biológicos mais conhecidos da quercetina é a sua atividade antioxidante, capaz de proteger o nosso corpo contra radicais livres (AGHABABAEI; HADIDI, 2023). Entretranto, a quercetina também pode ter ação pró-oxidativa a depender do microambiente e das condições inseridas (SANTOS et al., 2023). Em promastigotas de *Leishmania braziliensis*, a quercetina tem ação pró-oxidativa direta, elevando os níveis de EROs intracelular e levando à morte dos protozoários por apoptose/necrose (CATANEO et al., 2019). Além disso, a quercetina parece atuar como um inibidor misto da arginase de *L. amazonensis*, uma enzima que compete por L-arginina com a NO sintase (NOS) e ao ser inibida leva ao aumento dos níveis intracelulares de NO, um conhecido agente microbicida (CARTER et al., 2021).

Em relação a sua atividade imunomoduladora, estudos mostram que a quercetina regula positivamente a expressão gênica das citocinas IFN-γ e IL-10, pró e anti-inflamatórias respectivamente, em macrófagos infectados com *L. donovani* (DAS et al., 2022). Em contrapartida, a quercetina diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e a IL-6 em camundongos infectados com *L. major*. Já se sabe que os níveis excessivos de citocinas como TNF-α e a IL-6 dificultam o processo de cicatrização de feridas, devido a indução de inflamação persistente, o que leva à formação das feridas crônicas observadas na LC. Assim, a regulação negativa da quercetina sobre essas citocinas pode ajudar na cicatrização de feridas (ORYAN; BEMANI; BAHRAMI, 2023).

Com base nisso, a administração de imunomoduladores, como a quercetina, em conjunto com os medicamentos anti-*Leishmania* existentes, pode ser uma abordagem apropriada para mitigar as lesões patológicas da LC, bem como induzir respostas Th1 dependentes de IFN-γ mais contundentes na LV, aumentando a morte dos parasitos e acelerando os processos de cura. Porém, a literatura sobre a imunomodulação da quercetina na leishmaniose ainda é escassa, fazendo-se necessário mais estudos sobre o composto. Dessa forma, a hipótese desse trabalho é que a quercetina, devido aos seus efeitos imunomoduladores, possa atuar como um adjuvante terapêutico para o tratamento da leishmaniose e que sua associação com a AmB pode potencializar a cura da doença através de efeitos sinérgicos entre os compostos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como foco avaliar a atividade biológica da quercetina e sua associação à Anfotericina B contra culturas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* e no contexto da infecção de monócitos humanos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a citotoxicidade da quercetina sobre populações de promastigotas de *L. infantum*;

b) Avaliar se existe atividade sinérgica entre a quercetina e a AmB contra culturas de *L. infatum*;

c) Avaliar a citotoxicidade da quercetina em células humanas;

d) Avaliar a atividade biológica da quercetina isolada e associada à AmB na taxa de infecção de monócitos (CD14+) por *L. infantum*;

e) Avaliar a atividade da quercetina isolada e associada à AmB na modulação da produção de EROs e NO em monócitos (CD14+) infectados com *L. infantum*;

f) Avaliar a atividade imunomoduladora da quercetina na produção de citocinas como IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-17 em PBMC infectadas com *L. infantum*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DOS MATERIAIS

A quercetina, anfotericina B, dimetilsulfóxido (DMSO) e Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, foram obtidos da Sigma-Aldrich. As sondas de detecção dihidroetidina (DHE) e diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM Diacetate) foram obtidas da Invitrogen, ThermoFisher. O Anticorpo anti-CD14+-APC foi obtido da BD Biosciences. O diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFDA-SE) foi obtido da Molecular Probes (Ref.: C34554). O meio Schneider, o antibiótico (penicilina 200 U/mL + estreptomicina 0.1 mg/mL), o kit de reação de Griess e o meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, também foram obtidos da Sigma-Aldrich. O soro bovino fetal (SBF) foi obtido da Cultilab. O Ficoll-Hypaque foi obtido da Cytiva. Os kits para ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) foram obtidos da Invitrogen, ThermoFisher [Refs.: 88-7316-88 (IFN- γ), 88-7106-88 (IL-10), 88-7126-88 (IL-12p70), 88-7066-88 (IL-6) e 88-7478-88 (IL-17)].

4.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB (CAAE: 17813013.8.0000.5183), sendo o projeto intitulado “Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática”. Ademais, todos os contribuintes desta pesquisa foram informados sobre a importância da mesma, bem como, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participação voluntária do projeto.

4.3. MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR DE PROMASTIGOTAS

As culturas de *Leishmania (Leishmania) infantum* da linhagem BRK | BR2000 foram mantidas *in vitro*, em erlenmeyers ou garrafas de cultura, em meio Schneider (24,084 g/L

de pó Schneider + 0,4 g/L de Bicarbonato de Sódio (NaHCO3) + 0,6 g/L de cloreto de cálcio anidro – CaCl2), pH 7, suplementado com 20% de SBF, 1% de penicilina 200 U/mL + estreptomicina 0.1 mg/mL e 2% de urina masculina humana estéril filtrada (filtro 0,22 μm). Ademais, as células foram mantidas a uma temperatura de 26 ± 1 ºC em estufa de Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) e foram feitas passagens/repiques celulares semanalmente, não ultrapassando vinte passagens. Além disso, parte das células foram mantidas em meio ágar sangue com Schneider suplementado, para manutenção de passagens de menor número e outras alíquotas celulares foram criopreservadas com a adição de 12% de glicerol estéril nas culturas, sob agitação constante por 15 minutos e imediatamente armazenadas a -20 ºC (DEBRABANT et al., 2004 apud ROCHA, 2018).

4.4. DESENHO EXPERIMENTAL

Os participantes desta pesquisa foram escolhidos de forma voluntária através da aplicação de um questionário e assinatura do TCLE. Critérios de inclusão: Ter entre 18 e 40 anos e assinar o TCLE. Critérios de exclusão: Estar com alguma doença infecciosa ativa, já ter tido leishmaniose, possuir alguma doença autoimune, ser gestante ou lactante; ter feito o uso de anti-inflamatórios, antifúngicos, antibióticos, álcool ou drogas ilícitas nas últimas 48 h; não assinar o TCLE.

4.5. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

Para a obtenção das Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC), 15-20 mL de sangue periférico foram coletados em tubos VACUTAINERS com heparina de indivíduos saudáveis (n = 10). Inicialmente, para uma maior eficiência na extração das PBMC do sangue total, o sangue foi diluído (1:1) em Tampão Fosfato Salino (PBS 1x, pH = 7,2). Após a diluição de sangue em PBS, foi montado o gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque e as amostras foram centrifugadas a 2700 RPM, por 20 minutos, à 20 ºC (4 aceleração e 0 desaceleração). Em seguida, os aneis leucoplaquetários foram coletados e transferidos para tubos falcon de 15 mL estéreis. Adiante, o volume de cada tubo foi

completado com PBS 1x, para lavagem das células, e centrifugado (1500 RPM, por 10 minutos, a 4 ºC). Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e a lavagem foi repetida mais 2 vezes. Após as lavagens, os precipitados celulares foram ressuspensos em 1 mL de meio RPMI suplementado (com 10% de SBF, 1% de penicilina 200 U/mL + estreptomicina 0.1 mg/mL 1% de L-Glutamina) e 10 µL foram retirados para serem diluídos em 90 µL de azul de Trypan (1:10) para contagem celular em hemocitômetro. Após a contagem, a concentração de células foi ajustada com meio RPMI para $1x10^7$ células/mL.

4.6. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA QUERCETINA EM PROMASTIGOTAS DE *L. INFANTUM*

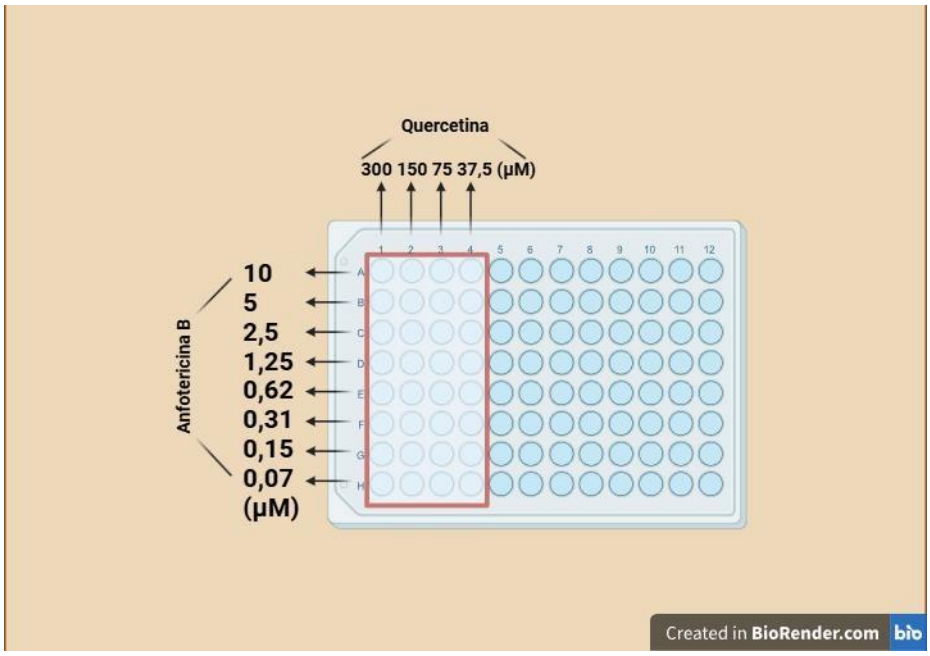
Para avaliar as concentrações citotóxicas da quercetina em promastigotas de *L. infantum.* Promastigotas em fase logarítimica foram colocadas em placas de 96 poços de fundo U com meio Schneider suplementado na concentração de $2x10^7$ células/mL e foram expostas a quercetina (300 a 9,37 µM) ou AmB como controle positivo (10 a 0,07 µM), por 72 horas, a 26 ± 1 ºC em estufa DBO. Após o período de tratamento, as placas foram centrifugadas (a 2000 RPM, por 10 minutos, a 25 ºC), os sobrenadantes desprezados e foi-se adicionado 100 µL/poço de meio com 10% de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O composto foi deixado nas placas para reagir por 4 horas, a 26 ± 1 ºC em estufa DBO, para formação dos critais de formazan. Em seguida, foram adicionados 100 µL/poço de DMSO e as placas foram lidas em leitor de microplaca no comprimento de onda de 540 nm.

4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE QUERCETINA E ANFOTERICINA B EM PROMASTIGOTAS DE *L. INFANTUM*

Para avaliar se existia uma atividade sinérgica da quercetina com a anfotericina B, promastigotas em fase logarítimica foram colocadas em placas de 96 poços de fundo U com meio Schneider suplementado na concentração de $2x10^7$ células/mL. Em seguida, foram adicionadas nas colunas 1, 2, 3 e 4 das placas, as concentrações de quercetina (300, 150, 75 e 37,5 µM) e nas linhas A, B, C, D, E, F, G e H as concentrações de AmB (10 a

0,07 µM), para gerar combinações de todas as concentrações de um composto com o outro, tal como mostrado na (figura 10). As placas foram então incubadas por 72 horas, a 26 ± 1 ºC em estufa DBO. Ao final do processo meio com MTT foi adicionado a todos os poços e posteriormente DMSO, e as placas foram lidas em leitor de microplaca no comprimento de onda de 540 nm.

Figura 10 – Teste de sinergismo em promastigotas com quercetina e AmB



Fonte: Autoria própria, 2025. Criado em BioRender.com. Concentrações de quercetina e AmB testadas contra promastigotas de *L. infantum* por 72 h.

4.8. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA QUERCETINA EM PBMC

Para avaliar a citotoxicidade da quercetina em PBMC, incialmente extraímos as células do sangue total de indivíduos saudáveis (n = 3) por gradiente de Ficoll-Hypaque. Após a extração, as células foram colocadas em placas de 96 poços de fundo U na concentração de $1{,}5x10^6$ células/mL. Ainda adicionamos quercetina (600 a 9,37 µM) ou AmB como controle positivo (100 a 0,78 µM) e as células foram incubadas por 24 horas, a 37 ± 1 ºC em estufa de CO_2 5%. Após o tratamento, as placas foram centrifugadas, parte do seu sobrenadante desprezado e 10% de MTT foi adicionado a todos os poços. Após 4 horas foi adicionado 100 µL/poço de DMSO e as placas foram lidas em leitor de microplaca no comprimento de onda de 540 nm.

4.9. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA QUERCETINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS

Com o objetivo de avaliar se a quercetina poderia ser tóxica para eritrócitos humanos, 4 mL de sangue periférico de indivíduos saudáveis (n = 3) foram coletados e diluídos em PBS. Em seguida, placas de 96 poços de fundo U foram preparadas com PBS mais quercetina ou AmB, apenas PBS para controle de viabilidade e água deionizada como controle de lise total. As amostras foram incubadas por 1 hora, a 37 ± 1 ºC em estufa de CO_2 5%. Após esse período, 100 µL de PBS foram adicionados a todos os poços, as placas foram centrifugadas por 10 min, a 25 ºC (4 aceleração e 4 desaceleração) e os sobrenadantes foram retirados e transferidos para placas de 96 poços de fundo chato, que foram lidas em leitor de microplaca no comprimento de onda de 540 nm.

4.10. PREPARAÇÃO DA *LEISHMANIA* PARA INFECÇÃO DE MONÓCITOS

Inicialmente as culturas de *Leishmania* foram transferidas para tubos falcons estéreis e centrifugadas a 2000 RPM, 10 min, a 25 ºC (4 aceleração e 4 desaceleração). Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 1 mL de RPMI suplementado. Em seguida, os parasitos foram diluídos (1:1000) em solução de isoton, para contagem em hemocitômetro. Após a contagem as células foram ajustadas para a concentração de $1x10^8$ cél/mL (10 parasitos : 1 PBMC). As culturas ainda foram separadas, sendo uma para marcação com CFDA-SE e outra sem marcação para ajustes de autofluorescência.

Após ajustes de concentração, as culturas foram centrifugadas a 3000 RPM, 10 min, 4 ºC (4 aceleração e 4 desaceleração), os sobrenadantes foram desprezados e os precipitados celulares ressuspendidos em 1 mL de PBS 1x suplementado com 10% de SBF. Paralelamente a solução de CFDA-SE [5 mM] foi preparada e 2 µL dessa solução foram adicionados ao ajuste de células que deveria ser marcado. Durante o processo de marcação as culturas de *Leishmania* foram colocadas em estufa com demanda biológica de CO_2 5% a 37 ± 1 ºC por 15 minutos. Ademais, os tubos foram cobertos com papel alumínio e agitados a cada 5 minutos para evitar precipitação. Após o período de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS suplementado para retirar o excesso

de corante, com centrifugação a 3000 RPM, 10 min, 4 ºC, 4 aceleração e 4 desaceleração, e desprezo do sobrenadante. Ao final os parasitos foram ressuspensos em 1 mL de RPMI suplementado.

4.11. PROCESSO DE INFECÇÃO E PLAQUEAMENTO

Após as culturas de PBMC e leishmanias promastigotas estarem devidamente preparadas, ambas foram juntas em um só tubo e homogeinizadas. Paralelamente, placas de 96 poços de fundo U foram preparadas com a adição de meio RPMI suplementado em todos os poços na quantidade pré-calculada. Em seguida, adicionamos as drogas em suas respectivas concentrações/poço, sendo quercetina 150 µM e anfotericina 5 µM. Posteriormente as células foram adicionadas em seus respectivos poços nas seguintes condições: PBMC sem infecção com apenas meio, quercetina, AmB e quercetina com AmB; além de PBMC com leishmanias marcadas com CFSE e PBMC com leishmanias sem marcação, para todas as condições anteriores. A placa foi então incubada em estufa de CO_2 5% a 37 ºC por 2 horas, após esse período 5 µg/mL de LPS foram adicionados em seus respectivos poços já predefinidos e a placa voltou para a estufa por mais 1 hora, totalizando 3 horas de infecção.

4.12. PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO

Inicialmente padronizamos diversos parâmetros dos experimentos através de testes pilotos. O primeiro teste foi realizado para determinar a melhor concentração de quercetina a ser utilizada, para isso a quercetina foi testada a 37,5, 75, 150 e 300 µM. Segundo os dados da citometria, as concentrações de 150 e 300 µM foram eficazes em diminuir a porcentagem de infecção de monócitos e a concentração de 150 µM foi escolhida pensando em uma maior janela terapêutica.

Adiante, buscamos padronizar as concentrações das sondas que seriam utilizadas na detecção de EROs e NO. Para isso, realizamos uma curva de concentração de 2, 5, 7.5 e 10 µM com DHE e 0.5, 1, 1.5 e 2 µM com DAF-FM. De acordo com o resultado piloto, a sonda DHE apresentou marcação ótima a 5 µM/poço, estando de acordo com a literatura

(CHANG et al., 2007), na concentração de 2 µM foi de baixa intensidade e em 7.5 e 10 µM as marcações desmontraram uma intensidade de fluorescência excessiva. Já em relação a DAF-FM, a sonda apresentou marcação satisfatória já a partir de 0.5 µM e portanto foi escolhida.

Adiante, buscamos descobrir a concentração de células necessárias para uma boa marcação e quantidade de eventos suficientes. Assim, testamos as concentrações celulares de $2{,}5x10^5$, $5x10^5$ e $1x10^6$ células/poço. Com base nos resultados obtidos, observamos uma boa quantidade de eventos e uma marcação satisfatória das células na concentração de $5x10^5$ células/poço. Ademais, outro parâmetro analisado em nossas padronizações foram os tempos de incubação das células com as sondas para haver uma melhor marcação das populações de monócitos. Testamos os tempos de 30 e 60 minutos, e os nossos resultados mostraram que, a partir de 30 minutos já houve uma intensidade de fluorescência satisfatória, estando de acordo com a literatura (ACUÑA et al., 2017).

Posteriormente testamos as concentrações ótimas de ação do LPS, que foi utilizado como controle pró-inflamatório. O LPS foi testado a 0.1, 0.5, 1, 5 e 10 µg/mL, durante 1 hora de estímulo, porém, só observamos efeito estimulatório significativo a partir de 1 µg/mL. Com base nisso, escolhemos a concentração de 5 µg/mL, tendo em vista que houve diferença de estímulo comparado a concentração de 1 µg/mL mas não apresentou diferença para 10 µg/mL.

Por fim, introduzimos a Anfotericina B, para também associá-la à quercetina nos estudos de infecção. A concentração de AmB escolhida foi baseada na literatura, onde foi observado que o fármaco diminuiu a infecção de macrófagos derivados de células THP-1 a partir de 5 µM após 48 h de tratamento (BORGES et al., 2023). Sendo assim, utilizamos a concentração de 5 µM para investigar se a AmB diminuiria a entrada de promastigotas em monócitos já durante as primeiras horas de infecção e se ocorreria alguma atividade sinérgica de diminuição da infecção junto à quercetina.

4.13. QUANTIFICAÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO E PRODUÇÃO DE EROS E NO

Após todo o período de incubação, as placas foram centrifugadas por 10 min, 1500 RPM, 4 ºC (4 aceleração e 4 desaceleração) e os sobrenadantes dos poços foram retirados.

A placa foi lavada 2x com PBS suplementado, sendo centrifugada por 10 min, 1500 RPM, 4 ºC (4 aceleração e 4 desaceleração), para retirada de parte das promastigotas não internalizadas. A partir daqui, os monócitos foram marcados com 2 µL/poço de anti-CD14+-APC e com as sondas DHE a 5 µM/poço e DAF-FM a 0,5 µM/poço, para quantificação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, respectivamente.

As placas com as marcações foram incubadas em temperatura ambiente (TA) por 30 min. e depois centrifugadas por 10 min, 1500 RPM, 4 ºC (4 aceleração e 4 desaceleração). Em seguida, os sobrenadantes foram retirados e os poços lavados com 150 µL de PBS 1x. Por fim, 100 µL de PBS 1x e 100 µL de formaldeído 4% foram adicionados em todos os poços e as placas incubadas por 20 min em TA. Com isso, as amostras foram transferidas para tubos FACs para leitura em citômetro de fluxo.

4.14. QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO PELA REAÇÃO DE GRIESS

A fim de avaliar a presença de nitrito em sobrenadantes celulares, que está diretamente relacionada à produção de óxido nítrico celular, amostras de PBMC com e sem infecção foram incubadas em placas de 96 poços de fundo U com meio, quercetina, AmB, quercetina com AmB, LPS, por 24 horas. Após os períodos de tratamento, as placas foram centrifugadas por 10 min, 1500 RPM, IFN-γ ou LPS + IFN-γ 4 ºC (4 aceleração e 4 desaceleração). Em seguida, os sobrenadantes foram retirados a transferidos para placas de 96 poços de fundo chato e a reação de Griess foi realizada de acordo com o manual do fabricante (Sigma-Aldrich). Após a reação, as placas foram lidas em leitor de microplaca no comprimento de onda de 540 nm.

4.15. ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO LIGADO À ENZIMA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

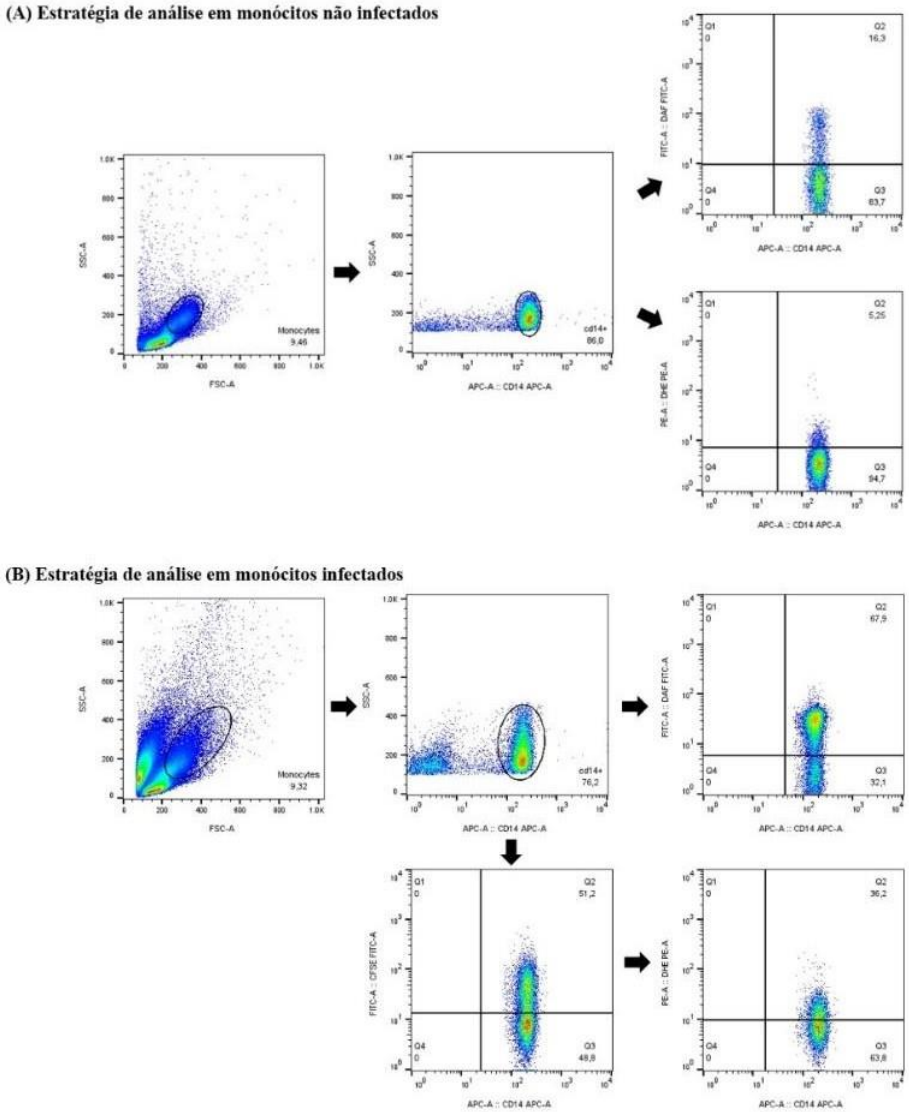
Para quantificação das citocinas IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-17 realizamos o ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA). Para este experimento, PBMC foram extraídas e uma parte foi infectada com promastigotas de fase estacionária (PBMC 1:10 promastigotas). Após 3 horas de infecção, em estufa de CO_2 5% a 37 ºC, as amostras

foram lavadas com PBS para retirada das promastigotas não internalizadas. As células infectadas e não infectadas foram colocadas em placas de 48 poços, com meio RPMI suplementado e quercetina (150 µM), AmB (5 µM), quercetina com AmB ou LPS (1 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa de CO_2 5% a 37 ºC, por 24 horas. Após o período de tratamento, as placas foram centrifugadas por 10 min, 1500 RPM, 4 ºC (4 aceleração e 4 desaceleração) e os sobrenadantes foram coletados para congelamento a -20 ºC. Posteriormente, as citocinas presentes nos sobrenadantes foram quantificadas por ELISA sanduíche de acordo com o manual do fabricante (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Assim, a leitura foi realizada em leitor de microplaca no comprimento de onda de 450 nm.

4.16. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises dos experimentos de citometria de fluxo foram realizadas no software FlowJo 10.9.0 (FlowJo LLC, Ashland, OR, US), para obtenção das porcentagens de marcação das populações de células. Como estratégia de análise para os monócitos não infectados, na PBMC selecionamos a população de células CD14+ e dentro desta população analisamos a porcentagem de células DHE+ e DAF-FM+. Já para analisar os monócitos infectados, selecionamos as células CD14+, seguido da seleção de células CD14+CFSE+ para avaliar a taxa (%) de infecção. Ademais, dentro da população de CD14+ infectados (CFSE+), também analisamos as porcentagens de células produtoras de EROs (DHE+) e NO (DAF-FM+) – Figura 11.

Figura 11 – Estratégias de análise em monócitos não infectados e infectados



Estratégia de análise para avaliação da porcentagem de células infectadas e produtoras de EROs e NO. (A) Análise de células não infectadas demarcando a população de monócitos, seguido da seleção de monócitos CD14+ e escolha das sondas DHE+ ou DAF-FM+. (B) Análise de células infectadas demarcando a população de monócitos, seguido da seleção de monócitos CD14+, seleção de monócitos infectados CD14+CFSE+ e seleção de DHE+. OBS.: para análise de NO após demarcar a população de CD14+, selecionamos a população CD14+DAF-FM+, pois no grupo de infectados marcados com DAF-FM+ não havia leishmania marcada com CFSE+, pois ambos os marcadores são do canal FITC.

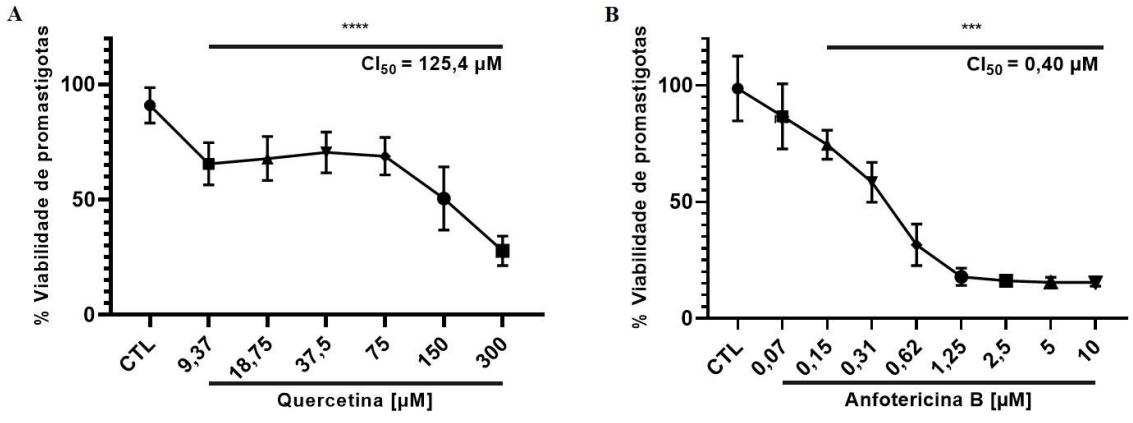
Adiante, os dados obtidos pelo método MTT, citometria de fluxo, quantificação de nitrito e ELISA, foram exportados para o software GraphPad Prism (San Diego, EUA), onde foram normalizados e analisados por por análise de variância (ANOVA One-Way) e o Teste post hoc de Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0.05$(*).

5. RESULTADOS

5.1. QUERCETINA E ANFOTERICINA B ASSOCIADAS POSSUEM ATIVIDADE SINÉRGICA ANTI-*LEISHMANIA*

A atividade anti-*Leishmania* da quercetina já foi relatada em diversas espécies, incluindo *L. major*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (MEMARIANI, H.; MEMARIANI, M.; GHASEMIAN, 2024). Ademais, a combinação de medicamentos com produtos naturais é uma estratégia amplamente utilizada para o combate de infecções mais graves e resistentes (AL ABOODY; MICKYMARAY, 2020). Nesse contexto, avaliamos a atividade da quercetina isolada e combinada à Anfotericina B em culturas de promastigotas de *L. infantum* por 72 horas de tratamento. Inicialmente as promastigotas foram expostas a tratamentos isolados com quercetina ou AmB. Segundo os resultados, a quercetina apresentou atividade anti promastigota, com Concentração Inibitória Média (CI_{50}) = 125,4 µM. Além disso, o flavonoide causou uma redução de aproximadamente 25% da viabilidade celular já a partir de 9,37 µM e mais de 60% a 300 µM (figura 1). Adiante, a AmB apresentou CI_{50} = 0,4 µM, com redução de aproximadamente 25% da viabilidade em 0,15 µM e redução máxima de 85% a 10 µM (figura 12).

Figura 12 – Atividade anti-*Leishmania* da quercetina e Anfotericina B



Atividade anti-*Leishmania in vitro* em promastigotas de *L. infantum* BRK | BR2000 da quercetina (A) e Anfotericina B (B) após 72 h de tratamento. Os dados representam a média ± desvio padrão (DP) de três experimentos independentes e foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey.

Em seguida, investigamos se a quercetina possuia alguma atividade sinérgica quando combinada com a Anfotericina B e para isso associamos diversas concentrações de quercetina (300, 150, 75 e 37,5 µM) com AmB (10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.15 e 0.07 µM). A atividade sinérgica entre duas moléculas é um fator importante a ser avaliado, pois permite diminuir as concentrações de cada composto, ao menos tempo que a atividade biológica contra o alvo é aumentada e as chances de resistência diminuídas (ARAÚJO et al., 2016). Para determinar a sinergia entre os compostos utilizamos o cálculo do Índice de Combinação (*Combination Index*, CI), em que CI < 1, CI = 1 e CI > 1 indicam sinergia, aditividade e antagonismo, respectivamente (DUARTE; VALE, 2022), de acordo com a equação descrita abaixo:

Figura 13 – Cálculo do Índice de Combinação de compostos

$$CI = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2}$$

Fonte: DUARTE; VALE, 2022. CI = Índice de Combinação; $(D)_1$ = Concentração da droga combinada 1 (ex.: quercetina); $(D)_2$ = Concentração da droga combinada 2 (ex.: AmB); $(Dx)_1$ = a dose do fármaco D_1 sozinho que inibe o crescimento das células em x%; $(Dx)_2$ = a dose do fármaco D_2 sozinho que inibe o crescimento das células em x%.

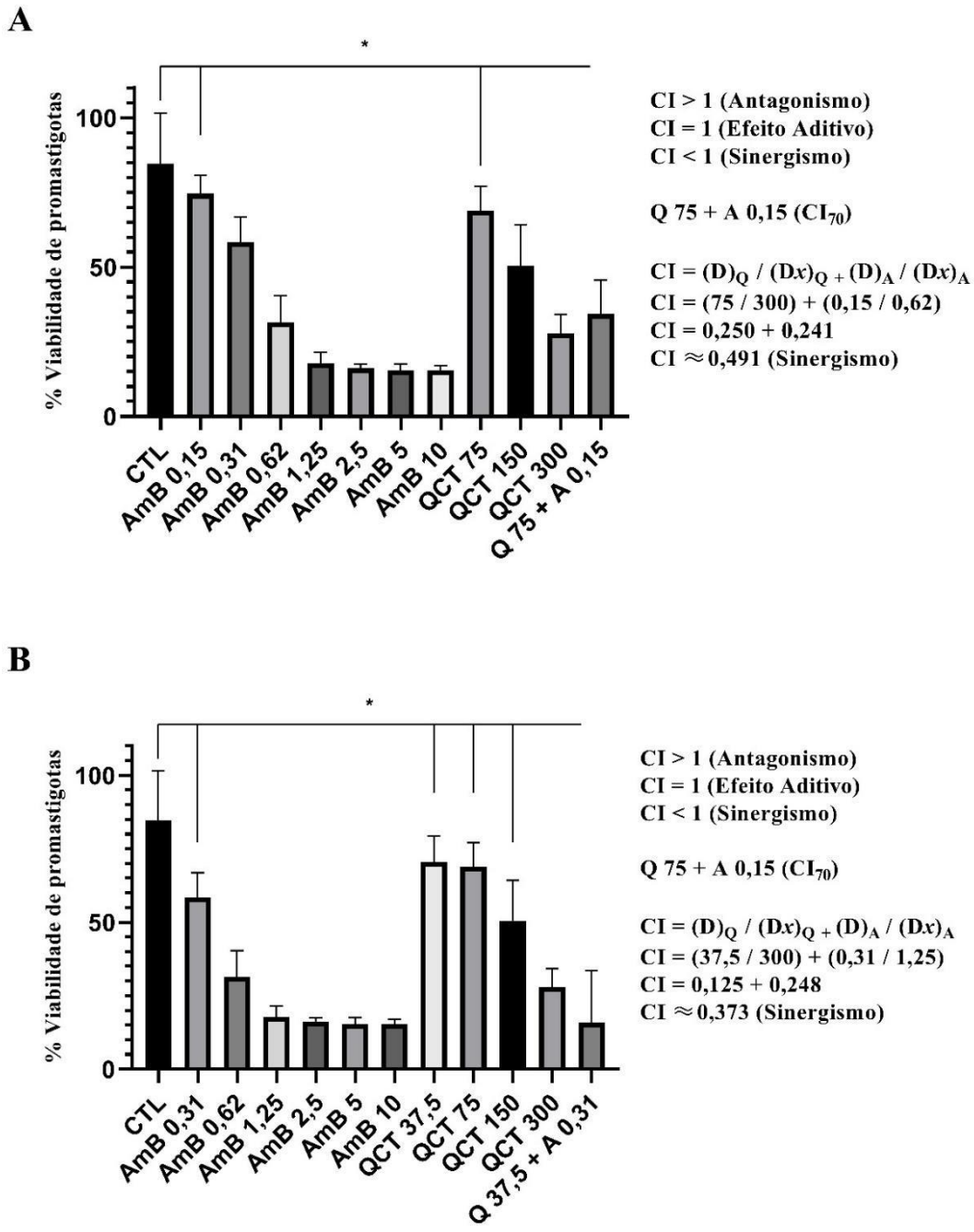
Baseado nos cálculos, observamos que a quercetina quando combinada à AmB apresentou atividade sinérgica contra promastigotas de *L. infantum* após 72 h de tratamento em duas combinações: quercetina 75 µM + AmB 0,15 µM (Q 75 + A 0,15) e quercetina 37,5 µM + AmB 0,31 µM (Q 37,5 + A 0,31). Nosso resultados demonstram que a quercetina isolada inibiu a viabilidade celular em cerca de 70% a 300 µM, a AmB isolada inibiu 70% da viabilidade a 0,62 µM e a combinação quercetina Q 75 + A 0,15 inibiu aproximadamente 70% da viabilidade. A partir da equação para o cálculo de CI, obtivemos que a combinação Q 75 + A 0,15 apresenta um CI ≈ 0,491, indicando atividade anti-*Leishmania* sinérgica entre os compostos. Além disso, a combinação Q 75 + A 0,15 apresentou atividade anti-*Leishmania* estatisticamente maior do que a quercetina e a AmB isoladas nas mesmas concentrações. Vale destacar também, que não houve diferença estatística entre a queda de viabilidade causada pela combinação Q 75 + A 0,15 e a quercetina isolada em concentrações maiores (150 e 300 µM). Bem como não houve diferença entre a queda de viabilidade causada pela combinação Q 75 + A 0,15 e a

Anfotericina B em concentrações maiores (0,31 a 10 µM). Portanto, aumentar as concentrações dos compostos isolados não foi mais eficaz para matar os parasitos do que quando combinados (figura 14A).

Já a segunda combinação dos compostos (Q 37,5 + A 0,31), diminuiu a viabilidade das promastigotas em aproximadamente 85%, enquanto 1,25 µM de AmB isolada também inibiu próximo de 85%. Já a quercetina isolada teve como maior resultado de inibição da viabilidade 70%, assim utilizamos essa concentração para calcular o CI da segunda combinação. Com isso, obtivemos que Q 37,5 + A 0,31 apresenta um CI ≈ 0,373, também indicando atividade sinérgica, com tendência a ser maior do que a primeira combinação. Ainda segundos os dados obtidos, a combinação Q 37,5 + A 0,31 foi significativamente mais promissora do que a AmB a 0,31 µM isolada e do que a quercetina em 37,5, 75 e 150 µM isolada. Ademais, do mesmo modo que foi observado na primeira combinação (Q 75 + A 0,15), a segunda combinação dos compostos também não apresentou diferença estatistica em relação a concentrações mais altas de quercetina e AmB, implicando mais uma vez que aumentar as concentrações dos compostos isolados não os tornou mais eficazes em matar os parasitos do que estando em conjunto (figura 14B).

Tais considerações são positivas, levando-se em conta que, diminuir a concentração de drogas altamente tóxicas como a AmB, obtendo-se o mesmo resultado terapêutico, através de terapias associadas, é de grande interesse para o desenvolvimento de um tratamento menos prejudicial aos pacientes.

Figura 14 – Atividade sinérgica da quercetina combinada à AmB em *L. infantum*



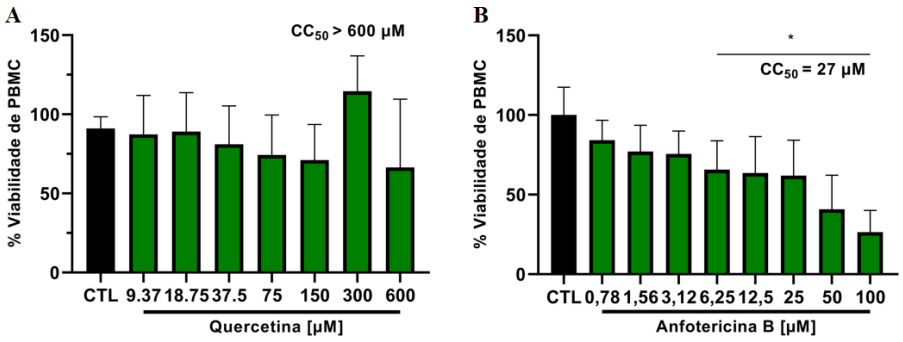
Atividade anti-*Leishmania in vitro* em promastigotas de *L. infantum* BRK | BR2000 da quercetina associada Anfotericina B após 72 h de tratamento. (A) Atividade da quercetina 75 µM + AmB 0,15 µM (Q 75 + A 0,15) comparada com concentrações de quercetina e AmB isoladas. (B) Atividade da quercetina 37,5 µM + AmB 0,31 µM (Q 37,5 + A 0,31) comparada com concentrações de quercetina e AmB isoladas. Quercetina (QCT); Anfotericina B (AmB); Índice de Combinação (CI). $(D)_Q$ = Concentração da quercetina combinada; $(D)_A$ = Concentração da AmB combinada; $(Dx)_Q$ = concentração de quercetina isolada que inibe o crescimento das células em 70%; $(Dx)_A$ = concentração de AmB isolada que inibe o crescimento das células em 70%. Os dados representam a média ± desvio padrão (DP) de três experimentos independentes e foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey.

5.2. CITOTOXICIDADE DA QUERCETINA EM CÉLULAS SANGUÍNEAS DE HUMANOS

Atualmente, a busca por novas terapias visa sobretudo solucionar problemas presentes em terapias já existentes, tais como: resistência do patógeno e efeitos adversos para os pacientes. No contexto da leishmaniose, a toxicidade de fármacos como a Anfotericina B já foi bem documentada na literatura, fato que se deve principalmente ao seu mecanismo de ação sobre ergosteróis de membranas celulares (CAROLUS et al., 2020; ROATT et al., 2020). Pensando nisso, avaliamos se há citotoxicidade da quercetina contra PBMC e eritrócitos humanos, a fim de trazer direcionamentos para uma nova terapia contra leishmaniose menos grave em comparação as tradicionais.

De acordo com nossos resultados, a quercetina, testada de 9,37 a 600 µM, não apresentou citotoxicidade contra PBMC em qualquer concentração após 24 h de tratamento, indicando uma Concentração Citotóxica Média (CC_{50}) > 600 µM. Em contrapartida, a AmB, testada de 0,78 a 100 µM, foi citotóxica a partir de 6,25 µM e apresentou CC_{50} = 27 µM (figura 15). Assim, levando-se em consideração o CC_{50} da AmB, a quercetina demonstrou ser pelo menos 22 vezes menos tóxica para PBMC, o que traz relevância para a sua introdução como droga adjuvante na terapia anti-*Leishmania*, objetivando diminuir as doses de uso da AmB e obter a mesma eficácia terapêutica.

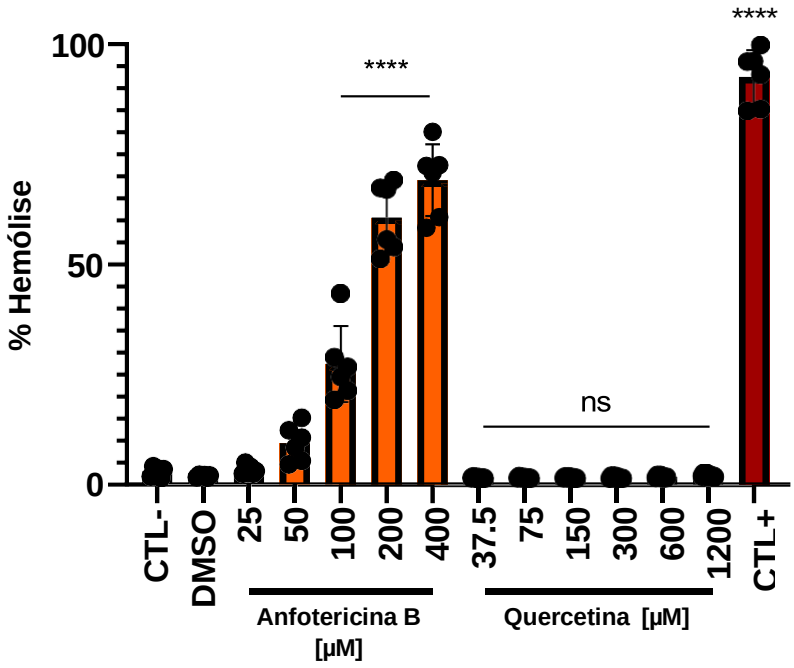
Figura 15 – Atividade citotóxica da quercetina e Anfotericina B em PBMC



Citotoxicidade *in vitro* da quercetina (A) e Anfotericina B (B) em células mononucleares de sangue periférico após 24 h de tratamento. Os dados representam a média ± desvio padrão (DP) de três experimentos independentes e foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey.

Adiante, também avaliamos se a quercetina era citotóxica para os eritrócitos humanos, haja vista a atividade hemolítica já observada da Anfotericina B (SERRANO et al., 2013 apud LIU et al., 2023). Com base nos dados obtidos, observamos que a quercetina também não apresentou citotoxicidade em qualquer concentração testada (37,5 a 1200 µM) contra eritrócitos. Por sua vez, a AmB apresentou atividade hemolítica de 27.5, 60 e 69% nas concentrações de 100, 200 e 400 µM, respectivamente (figura 16).

Figura 16 - Atividade citotóxica da quercetina e Anfotericina B em eritrócitos humanos



Citotoxicidade *in vitro* da quercetina e da Anfotericina B em eritrócitos humanos após 1 h de tratamento. CTL-: solução de tampão fosfato-salino; CTL+: água deionizada; DMSO: veículo. Os dados representam a média ± desvio padrão (DP) de três experimentos independentes e foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey.

Tomados esses dados em conjunto, evidencia-se mais uma vez a importância do desenvolvimento de terapias associadas, como uma forma de diminuir o uso de compostos de alta toxicidade.

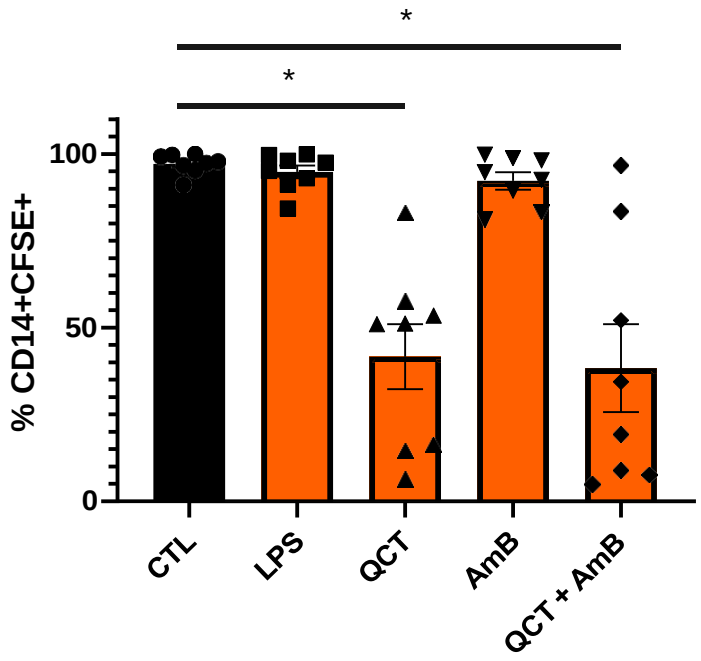
5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA QUERCETINA NA TAXA DE INFECÇÃO DE MONÓCITOS

5.3.2. Avaliação da taxa de infecção de monócitos

Diversos efeitos imunomoduladores da quercetina já foram observados durante a infecção por *Leishmania* spp. (MEMARIANI; MEMARIANI; GHASEMIAN, 2024). Além disso, a quercetina já demonstrou diminuir a infecção de macrófagos infectados por *L. braziliensis* (SANTOS et al., 2023). Aqui, investigamos a sua atividade junto à AmB na infecção de monócitos por *L. infantum*. Assim, a partir de todas as padronizações realizadas, promastigotas marcadas com CFSE+ foram colocadas para infectar monócitos de 8 indivíduos (CD14+) durante 3 horas. Após o período de infecção, analisamos em citômetro de fluxo a taxa de infecção de monócitos nas condições: apenas meio, LPS 5 µg/mL, quercetina 150 µM, AmB 5 µM e quercetina com AmB nas mesmas concentrações isoladas.

De acordo com os resultados obtidos, o grupo controle apresentou 97% de monócitos positivos para CFSE+, sendo essa a taxa de infecção máxima. Como a taxa de infecção foi bastante alta, os efeitos pró-inflamatórios do LPS não foram significativamente diferentes, demonstrando que o LPS não interfere nesse tipo de mecanismo. Em contrapartida a quercetina foi eficaz em diminuir a porcentagem de monócitos infectados (CD14+CFSE+), causando uma redução de aproximadamente 56% na entrada de promastigotas nos fagócitos. A AmB não apresentou diferença estatística na taxa de infecção comparando-se ao grupo controle. Ademais, a combinação dos compostos levou a uma redução de aproximadamente 60% na taxa de infecção, porém, sem diferença estatística com a quercetina isolada, indicando que a ação de diminuição da infecção foi orquestrada pela quercetina e a AmB não teve influência nesse aspecto (figura 17).

Figura 17 - Atividade da quercetina (QCT) e Anfotericina B (AmB) na infecção de monócitos (CD14+) por *L. Infatum* (CFSE+)



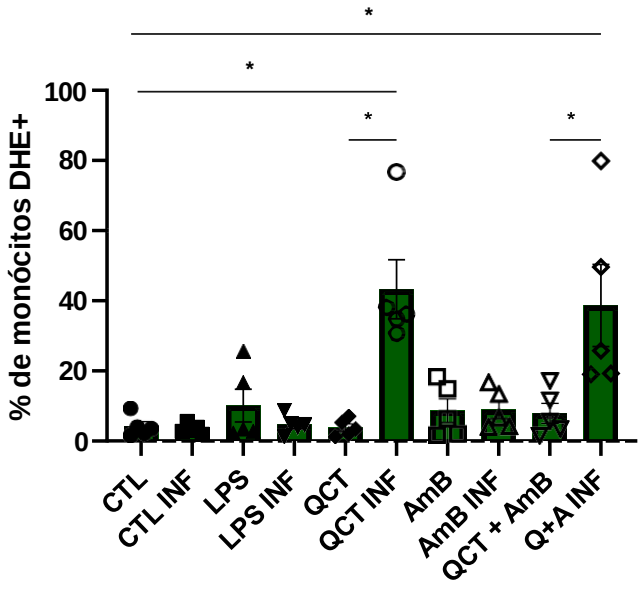
CTL: controle; QCT: quercetina; AmB: Anfotericina B; % CD14+CFSE+: taxa de monócitos (CD14+) infectados por *L. infatum* (CFSE+) após 3 h de tratamento. LPS: Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. Os dados representam a média ± erro padrão da média (n = 8) e foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey.

5.4. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROS E NO EM MONÓCITOS INFECTADOS POR *L. INFANTUM*

Além disso, a quercetina também já demonstrou aumentar a produção de EROs em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (FONSECA-SILVA et al., 2013; SANTOS et al., 2023). Com base nisso, investigamos se a quercetina junto à AmB atua da mesma forma na infecção de monócitos por *L. infantum*. Nossos resultados demonstraram que a infecção (CTL INF) não foi suficiente para aumentar a produção de EROs em monócitos, quando se comparado à monócitos não infectados (CTL). O LPS também não induziu EROs nos grupos não infectado (LPS) e infectado (LPS INF). Já a quercetina apresentou expressivo aumento da produção de EROs (43%) em monócitos infectados (QCT INF), comparando-se aos controles (CTL e CTL INF). Porém, a quercetina não induziu o aumento de superóxidos nos monócitos não infectados, indicando que o aumento da produção de EROs está relacionado a atuação da quercetina nas células infectadas. Adiante, a AmB não induziu o aumento da produção de EROs nem

em monócitos não infectados (AmB), nem em infectados (AmB INF). Em relação a combinação dos compostos, não houve aumento de oxidantes tóxicos nas células não infectadas (QCT + AmB). Contudo, observou-se um aumento significativo de EROs em monócitos infectados expostos à quercetina e AmB (Q + A INF). Portanto, a produção de EROs é induzida pela quercetina em monócitos infectados e parece não trazer o mesmo efeito em células não infectadas. Ademais, a AmB não influenciou sinergicamente na produção dos superóxidos (Figura 18).

Figura 18 - Atividade da quercetina (QCT) e Anfotericina B (AmB) na produção de EROs (DHE+) durante a infecção de monócitos (CD14+) por *L. Infatum*

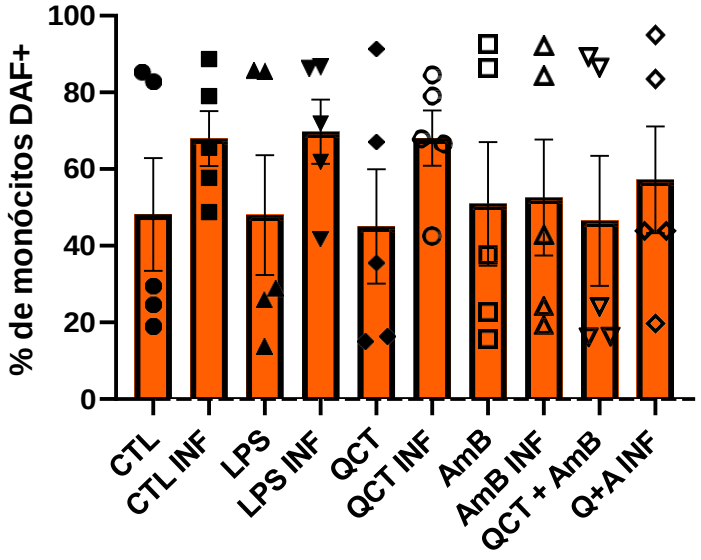


CTL: controle não infectado; CTL INF: controle infectado; LPS: Lipopolissacarídeo; LPS INF: Lipopolissacarídeo na infecção; QCT: quercetina; QCT INF: quercetina na infecção; AmB: Anfotericina B; AmB: Anfotericina B na infecção; QCT + AmB: quercetina mais Anfotericina B; Q+A INF: quercetina mais Anfotericina B na infecção. % de monócitos DHE+: taxa de monócitos (CD14+) infectados por *L. infatum* (CFSE+) e produtores de EROs (DHE+) após 3 h de tratamento. Os dados representam a média ± erro padrão da média (n = 5) e foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey.

Em seguida, buscamos avaliar se a quercetina e/ou sua combinação com a AmB seriam capazes de alterar os níveis de produção de oxido nítrico, devido a sua importância como agente microbicida para diversos patógenos tal como a *Leishmania* spp. De acordo com nossos resultados, a produção de NO não foi alterada por qualquer das condições testadas após 3 horas de tratamento. Observamos que existe uma tendência de aumento

da produção nos grupos de células infectadas sem tratamento (CTL INF) ou tratadas com LPS (LPS INF) ou quercetina (QCT INF) em relação ao controle não infectado (CTL), porém, sem diferença estatística. Além disso, a AmB sozinha ou associada à quercetina também não demonstrou alterar a produção de NO em qualquer uma das condições testadas (figura 19). Entretanto, faz-se necessário a realização de mais estudos com um maior número de pessoas e/ou maiores tempos de tratamento para a obtenção de dados mais robustos.

Figura 19 - Atividade da quercetina (QCT) e Anfotericina B (AmB) na produção de NO (DAF+) durante a infecção de monócitos (CD14+) por *L. Infatum*

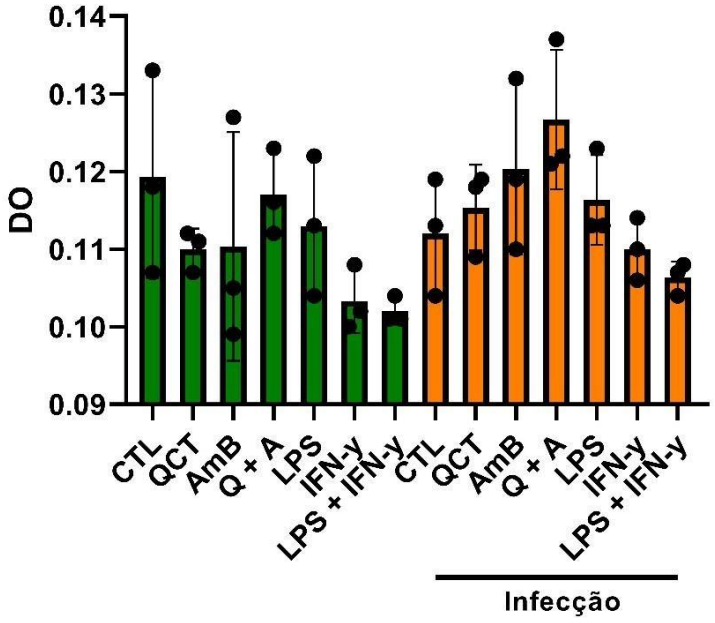


CTL: controle não infectado; CTL INF: controle infectado; LPS: Lipopolissacarídeo; LPS INF: Lipopolissacarídeo na infecção; QCT: quercetina; QCT INF: quercetina na infecção; AmB: Anfotericina B; AmB INF: Anfotericina B na infecção; QCT + AmB: quercetina mais Anfotericina B; Q+A INF: quercetina mais Anfotericina B na infecção. % de monócitos DAF+: taxa de monócitos (CD14+) infectados por *L. infatum* (CFSE+) e produtores de NO (DAF+) após 3 h de tratamento. Os dados representam a média ± erro padrão da média (n = 5) e foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey.

Apesar disso, ainda buscamos investigar a produção de NO através da metodologia de quantificação de nitrito por reação de Griess durante 24 horas de tratamento. Ademais, avaliamos as mesmas condições investigadas pela citometria, adicionando ainda um estímulo de IFN-γ e LPS+ IFN-γ nas células sem e com infecção. Contudo, segundo os resultados nenhuma das condições testadas levou a alterações significativas na produção de NO em PBMC. A condição quercetina com AmB na

infecção apresentou tendência de aumento de nitrito, porém, sem relevância estatística (figura 20). Tal resultado indica que o aumento do tempo não foi um fator determinante para se observar aumento ou diminuição de NO e que o estímulo por IFN-γ não trouxe diferenças significativas.

Figura 20 – Atividade da quercetina (QCT) e Anfotericina B (AmB) na produção de nitrito durante a infecção por *L. Infatum*



CTL: controle; LPS: Lipopolissacarídeo; IFN-γ: Interferon-gama; QCT: quercetina; AmB: Anfotericina B; Q+A: quercetina mais Anfotericina B. Produção de nitrito em PBMC infectada ou não por *L. infantum* após 24 h de tratamento. Os dados representam a média ± desvio padrão (n = 3) e foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey.

Tomados em conjunto, os resultados da citometria de fluxo e da reação de Griess demonstraram que as PBMC não tiveram sua produção de NO afetada por quaisquer tratamentos realizados. Todavia, a avaliação da produção em macrófagos derivados de monócitos é algo que pode ser avaliado futuramente.

5.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS EM PBMC DURANTE A INFECÇÃO POR *L. INFANTUM*

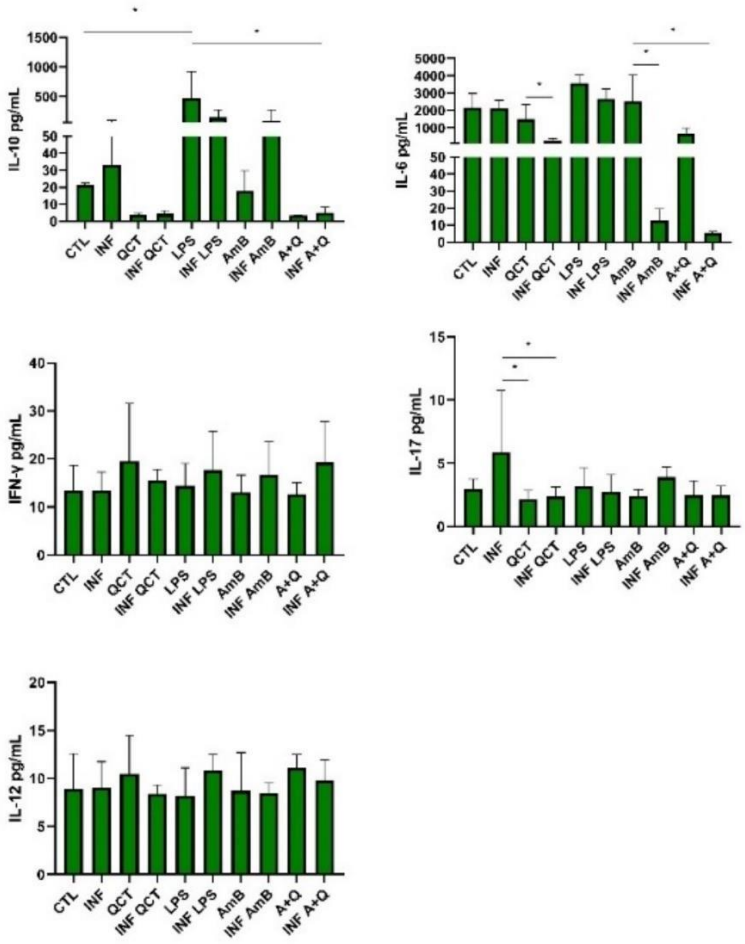
O perfil de citocinas durante a leishmaniose é bastante importante, pois influencia diretamente no curso da infecção (VOLPEDO et al., 2021; SAMANT et al., 2021). Além disso, a imunomodulação da quercetina já foi observada durante a infecção por *Leishmania* spp. (DAS et al., 2022; ORYAN; BEMANI; BAHRAMI, 2023). Em vista disso, aqui buscamos avaliar o perfil de citocinas em PBMC após 24 horas de infecção e se o tratamento com quercetina e AmB alterou a expressão dessas proteínas.

Segundo os resultados obtidos, a produção de IL-10 foi apenas estatisticamente significativa na condição com LPS sem infecção. Já nos tratamentos com quercetina e/ou AmB a produção de IL-10 não foi alterada de forma expressiva, mas apresentou tendência de queda na presença da quercetina. Entretanto na produção de IL-6, as moléculas demonstraram uma atividade inibitória contundente. A infecção não elevou os níveis de IL-6 que foram de 2170 pg/mL em células não infectadas sem tratamento e 2127 pg/mL em células infectadas sem tratamento. O LPS, por sua vez, apresentou uma tendência de aumento da produção da citocina, onde observamos 3567 pg/mL sem infecção e 2670 com infecção, comparado ao controle. Já com a adição da quercetina a produção de IL-6 caiu para 1487 pg/mL em células não infectadas e foi estatisticamente menor em células infectadas, sendo apenas 279 pg/mL de produção. Ademais, em células não infectadas e tratadas com AmB houve concentração de citocinas de 2530 pg/mL, caindo para 12 pg/mL em células infectadas tratadas com AmB. Por fim as concentrações de IL-6 também foram diminuídas quando as drogas foram associadas, sendo de 677 pg/mL em PBMC não infectada e 5 pg/mL nas infectadas (figura 21). Assim, os compostos atuaram de forma a inibir a produção de IL-6, citocina pró-inflamatória de importância para a manutenção do quadro patológico na leishmaniose.

A produção de IFN-γ também foi avaliada, porém, nenhuma das condições testadas apresentou diferença significativa em relação aos controles não infectado e infectado, indicando que os compostos provavelmente não interfiram nessa via de sinalização em PBMC na condição utilizada. Do mesmo modo, avaliamos a produção de IL-12, a fim de averiguar se os compostos influenciariam na produção de IFN-γ indiretamente. Contudo, assim como no IFN-γ, nenhuma das condições testadas levou a alterações na produção da IL-12, o que pode corroborar com os resultados de não

modulação das concentrações de IFN-γ. Finalmente, avaliamos a produção de IL-17 e segundo os nossos dados as células infectadas sem tratamento apresentaram uma tendência de aumentar a produção dessa citocina, comparando-se as células não infectadas e não tratadas. Ademais, a produção nas células infectadas sem tratamento foi estatisticamente maior do que nas condições infectado e não infectado tratados com quercetina e essa diferença não ocorreu com outras moléculas como LPS, AmB ou na associação quercetina com AmB, indicando que na quercetina isolada talvez tenha ocorrido uma pequena modulação negativa na produção da IL-17 e por isso houve significância estatística comparando-se ao grupo de células infectadas sem tratamento, que foi o grupo que houve maior concentração de IL-17 (figura 21).

Figura 21 – Dosagem de citocinas de PBMC infectada com *L. infantum*



CTL: controle não infectado; INF: controle infectado; LPS: Lipopolissacarídeo; INF LPS: Lipopolissacarídeo na infecção; QCT: quercetina; INF QCT: quercetina na infecção; AmB: Anfotericina B; INF AmB: Anfotericina B na infecção; A + Q: Anfotericina B mais quercetina; INF A+Q: Anfotericina B mais quercetina na infecção. Dosagem de citocinas (pg/mL) em sobrenadantes de PBMC com ou sem infecção após 24 h de tratamento. Os dados representam a média ± desvio padrão e foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey.

6. DISCUSSÃO

Ao longo dos anos a busca por novos compostos para o tratamento da leishmaniose se tornou cada vez mais intensa, algo que foi consequência direta dos diversos problemas relacionados as terapias convencionais (MUKHERJEE et al., 2021). A alta quantidade de efeitos adversos de fármacos como os antimoniais pentavalentes e Anfotericina B, fez com que a ciência, no campo da leishmaniose, avançasse principalmente no sentido de encontrar novos produtos terapêuticos de baixa toxicidade (MARTIN; LEE, 2024; DASH; BENIVAL; JINDAL, 2024). Nesse contexto, surge a quercetina, um metabólito secundário presente em plantas que já foi amplamente estudado para o tratamento de diversas doenças, tais como câncer, diabetes, Alzheimer, bacterioses, micoses e protozooses (SINGH et al., 2021; SOOFIYANI et al., 2021; ZU et al., 2021; NGUYEN; BHATTACHARYA, 2022).

Na leishmaniose a quercetina já demonstrou possuir atividade anti-*Leishmania* contra variadas espécies de *Leishmania* spp. Aqui buscamos evidenciar se a quercetina além de sua atividade anti-*Leishmania* poderia ter efeitos sinérgicos com a AmB. Para isso, testamos inicialmente a atividade citotóxica da quercetina contra culturas de *L. infantum* e nossos primeiros resultados mostraram que a quercetina possui atividade leishmanicida contra a *L. infantum*. Ademais, também já se foi observado efeito leishmanicida da quercetina contra *L. braziliensis* e *L. major*, causadoras de leishmaniose cutânea, e contra *L. donovani* e *L. infantum*, causadoras da leishmaniose visceral, o que corrobora com os nossos resultados (GARCIA et al., 2019; MEHWISH et al., 2021; ORYAN; BEMANI; BAHRAMI; 2023; CLEMENTE et al., 2024).

Além disso, nossos dados também estão de acordo com outros estudos como o de DA SILVA e colaboradores (2012), que já mostrou que a quercetina age como um inibidor da arginase de *L. (L.) amazonensis*, bloqueando o desenvolvimento do parasito (DA SILVA; DO CARMO MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012). Adicionalmente, a atividade anti-amastigota da quercetina em *L. braziliensis* revelou que o composto modula as frações de ferro lábil disponível dentro de macrófagos, inibindo a oferta desse nutriente para a proliferação e sobrevivência dos parasitos (CATANEO et al., 2019). Assim, o sequestro de ferro pela quercetina já foi observado em outro estudo, que indicou que a ação quelante de ferro do flavonoide estava associada a sua atividade anti-*Leishmania* (MACH; SUTAK, 2020 apud ASSOUAB et al., 2024).

Muitas terapias para o tratamento de diversas doenças se baseiam na combinação de compostos de ação já conhecida, a fim de investigar o potencial sinérgico existente entre as moléculas e trazer novas indicações terapêuticas. Com base nisso, a miltefosina, fármaco oral usado para tratar leishmaniose, já foi investigada em ação conjunta com o nifuratel, fármaco utilizado no tratamento de infecções urogenitais, e os resultados demonstraram uma atividade sinérgica entre os compostos contra formas amastigotas de *L. donovani* (MELCON-FERNANDEZ et al., 2023). Ademais, combinações de Nitazoxanida, um anti-helmíntico, com Anfotericina B, Glucantime®, miltefosina e sitamaquina, também já foram realizadas para avaliar seus efeitos contra formas amastigotas de *L. infantum* (MESQUITA; TEMPONE; REIMÃO, 2014). Neste trabalho, avaliamos a atividade sinérgica da quercetina e AmB contra promastigotas de *L. infantum*. Nossos resultados foram promissores e indicaram que os compostos possuem sinergismo para matar *L. infantum* em algumas combinações de concentrações.

A combinação de produtos naturais com anti-fúngicos, para o combate de infecções fúngicas invasivas e outras patologias já é bem conhecida. Compostos como a quercetina e a curcumina já foram associadas com o fluconazol e apresentaram interações sinérgicas contra *C. albicans* (AL ABOODY; MICKYMARAY, 2020). Além disso, outro produto natural bastante conhecido, o resveratrol, já foi associado à AmB e seus estudos *in vitro* demonstraram que a combinação dos compostos causou uma sinergia anti-amastigotas de *L. amazonensis* (FERREIRA et al., 2014). Mais recentemente, o 6-Gingerol, um dos principais componentes do gengibre, foi combinado à AmB para estudos de leishmaniose em modelos murinos, e a mistura do compostos apresentou potente atividade leishmanicida e efeitos imunomodulares positivos contra os parasitos (KEYHANI et al., 2021). Adiante, extratos de folhas de *Moringa oleifera* também apresentaram efeitos sinérgicos quando combinados com AmB, causando potente inibição contra promastigotas e amatigotas de *L. major* (HAMMI et al., 2020). Com essa perspectiva e diante dos resultados apresentados neste trabalho, acreditamos que associar a quercetina à AmB pode ser uma boa abordagem para melhorar o tratamento da leishmaniose ao se utilizar menores doses do anti-fúngico, pois poderia possibilitar uma terapia menos tóxica aos pacientes, com possibilidade de menor tempo de tratamento.

Antes de estudar os efeitos imunomoduladores da quercetina e AmB, buscamos evidenciar as concentrações citotóxicas de ambas em células humanas, objetivando trabalhar em uma janela terapêutica segura. Assim, nossos resultados mostraram que a

quercetina não foi tóxica para PBMC e eritrócitos até mesmo em 600 e 1200 µM, respectivamente. De forma semelhante SANTOS e sua equipe (2023) avaliaram a citotoxicidade da quercetina em macrófagos de hamster, demonstrando uma perda significativa de viabilidade celular apenas a 640 µM após 48 horas de tratamento. Do mesmo modo, a atividade hepato, neuro e cardioprotetora da quercetina já foi revisada na literatura, validando a segurança do composto no combate a diversas doenças (ALHARBI et al., 2025). Mais especificamente, também já se foi observado que a quercetina protege células mononucleares de sangue periférico humano do estresse oxidativo, genotoxicidade e inflamação induzida por ocratoxina A (PERIASAMY et al., 2016). Além disso, recentemente ajudamos a publicar que outros flavonoides, da sub-classe das chalconas, apresentaram baixa toxicidade contra hemácias, sendo aproximadamente 74 vezes mais seletivas contra *Leishmania*, e apesar de algumas moléculas terem sido tóxicas para PBMC, a chalcona CP04 apresentou uma boa margem de segurança, sendo pelo menos 9 vezes mais seletiva contra os parasitos (LEITE et al., 2024). Em contrapartida, a AmB foi tóxica para PBMC e eritrócitos, apresentando taxas de morte celular consideráveis. Esses dados estão de acordo com o trabalho de DA CÂMARA ROCHA et al., 2019 e com um trabalho publicado pelo nosso grupo, que também demonstrou a atividade citotóxica elevada da AmB em PBMC e eritrócitos (ALMEIDA et al., 2023). Em concordância com a literatura, nossos dados também apontam para a quercetina como um flavonoide seguro para células humanas e que pode ajudar a regular a administração da AmB.

Em seguida, nossos esforços foram focados em estudar os efeitos imunomoduladores da quercetina com a AmB em monócitos infectados por *L. infantum*. O efeito imunomodulador da quercetina já foi estudado em diversos cenários. Nesse contexto, um estudo revelou que a quercetina reduz o índice de infecção em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (FONSECA-SILVA et al., 2013). Do mesmo modo, NEVES et al., (2016), observaram que a quercetina foi eficiente em diminuir a taxa de infecção de monócitos desafiados com *L. amazonensis* após 24 horas. Ademais, o flavonoide também foi capaz de diminuir a quantidade de amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais de hamster infectados com *L. braziliensis* após 48 horas (SANTOS et al., 2023). Aqui, nossos estudos mostraram que a quercetina é capaz de diminuir a infecção de monócitos por *L. infantum* desde o início do processo infeccioso, diminuindo a internalização de promastigotas em até 60%. Já em relação a AmB,

BORGES et al., (2023) demonstraram que o anti-fúngico é capaz de diminuir a taxa de infecção de macrófagos por *L. amazonensis* após 48 horas de tratamento em 5 µM. Outro estudo mostrou a queda na taxa de infecção de macrófagos por *L. donovani* após tratamento com AmB, porém, o estudo revela que o tempo para atingir 50% da penetração máxima do fármaco foi de 55,72 h (VOAK et al., 2018). Assim, nossos estudos mostraram que a AmB não impediu a entrada de promastigotas em monócitos durante as 3 horas de infecção. Com isso, sugerimos que a AmB diminui a taxa de infecção em tempos mais prolongados mediante morte dos parasitos intracelulares, diferentemente da quercetina, que além de sua atividade anti-*Leishmania*, pareceu barrar as vias mecanísticas de internalização dos protozoários. Devido a isso também, a AmB não demonstrou sinergia com a quercetina em diminuir a entrada de promastigotas nos monócitos, evidenciando que essa foi uma atividade exclusiva do flavonoide.

Como já falado anteriormente, a *Leishmania* spp. possui mecanismos que alteram vias sinalizatórias importantes de defesa das células hospedeiras, em benefício próprio (ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012; DONG et al., 2021). Assim, a investigação dos efeitos imunomodulares da quercetina torna-se importante no combate a leishmaniose. Baseado nisso, em 2013, FONSECA-SILVA e colaboradores revelaram que a ação pró-oxidante da quercetina pode estar relacionada ao controle e morte de amastigotas intracelulares. Posterior a isso, a quercetina foi capaz de aumentar a liberação de EROs em 63% após 4 h, em neutrófilos infectados por *L. major* (BELKHELFA-SLIMANI; DJERDJOURI, 2017). Além disso, outro estudo já havia revelado que a quercetina induz a produção de EROs em promastigotas de *L. amazonensis*, indicando que o flavonoide atue na morte da *Leishmania* também por induzir a liberação de superóxidos nos próprios parasitos (FONSECA-SILVA et al., 2011). De forma mais ampla, a atividade pró-oxidativa da quercetina também já foi confirmada em células cancerosas (BISWAS et al., 2022) e em outros protozoários como o *Trypanossoma Cruzi*. Em *T. cruzi* a quercetina aumentou os níveis de EROs após 3 h de tratamento, evidenciado pela marcação dos tripanossomas com DHE (FARIA et al., 2017). Em nosso trabalho, confirmamos que a quercetina também induziu a produção de EROs em monócitos infectados por *L. infantum* após 3 h de tratamento. Além disso, também observamos que não houve aumento de superóxidos em células não infectadas, tal como relatado por FONSECA-SILVA et al., 2013. Com isso, nossos resultados ajudam a consolidar ainda mais a atividade anti-parasitária da

quercetina via liberação de superóxidos, demonstrando mais uma vez que o flavonoide pode ser promissor no tratamento da leishmaniose visceral.

Outro agente importante para o combate de parasitos intracelulares é o óxido nítrico e a *Leishmania* já demonstrou interferir em vias imunológicas que levam a sua produção (DONG et al., 2021). Nesse contexto, a quercetina já apresentou atividade moduladora positiva na produção de NO em tecido subcutâneo e exsudatos de camundongos BALB/c após 4 h de tratamento, apesar de ter sido menos eficiente do que o ácido cafeico (BELKHELFA-SLIMANI; DJERDJOURI, 2017). Outro estudo mostrou que a quercetina aumentou a produção de NO em macrófagos murinos derivados da medula óssea infectados com *L. donovani*, em concentrações de 250 µg/mL e 500 µg/mL após 72 h (MEHWISH et al., 2021). No entanto, o que encontramos foi que a quercetina não modulou a produção de NO em monócitos infectados por *L. infantum* em quaisquer do tempos de tratamento testados (3 e 24 h) a 150 µM.

Do mesmo modo, CATANEO et al., (2019) avaliou a expressão de iNOS e os níveis de NO de macrófagos infectados por *L. braziliensis* tratados com quercetina e observaram que o flavonoide não foi capaz de modular os níveis de NO, nem a expressão proteica da iNOS, destacando ainda que, repostas pró-inflamatórias exacerbadas contribuem para a patogênese da doença e que compostos como a quercetina devem controlar a progressão da infecção sem ativar vias inflamatórias exageradamente. Ademais, a produção de nitrito, por reação de Griess, já foi avaliada em macrófagos não infectados e infectados por *L. braziliensis* com tratamento de quercetina a 160 e 320 µM por 48 h, mas também não foi observada modulação por parte do composto (SANTOS et al., 2023). Um terceiro estudo avaliou a produção de agentes microbicidas em macrófagos murinos com amastigotas intracelulares tratados com quercetina e como resultado o composto não alterou a produção de NO, mas aumentou significativamente a liberação de EROs (SANTOS et al., 2012). Posteriormente outro estudo atribuiu a morte de *L. braziliensis* intracelulares pela via mecanística da produção de EROs, mas não de NO, em monócitos clássicos humanos ativados por IFN-γ (NOVAIS et al., 2014).

Tomados em conjunto, os dados da literatura apontam que a produção de NO induzida por quercetina durante a infecção por *Leishmania* spp. ainda não foi totalmente esclarecida. Entretanto, o aumento da produção de superóxidos induzida por quercetina parece estar mais estabelecido. Aqui nos mostramos que a quercetina na concentração de 150 µM modulou positivamente a produção de EROs, mas não modulou a produção de

NO em 3 ou 24 h de tratamento em monócitos infectados por *L. infantum*. Porém, é válido ressaltar que mais estudos são necessários para dar mais robustez aos dados. Assim, mais testes devem ser realizados no sentido de investigar outras concentrações do composto e tempos de tratamento distintos.

Em relação aos efeitos imunomoduladores sobre a produção de EROs e NO pela AmB, um estudo isolou uma linhagem clínica resistente à AmB e comparou os efeitos do anti-fúngico com outra linhagem sensível. Os resultados mostraram que a AmB induz produção de EROs bem mais significativa na linhagem sensível e que sua membrana também é mais suscetível a ação do fármaco do que a da linhagem resistente (PURKAIT et al., 2012). Além disso, o estresse oxidativo induzido pela AmB nos parasitos é eficiente em eliminá-los, porém, a investigação de um isolado clínico de *L. donovani* com superexpressão da ascorbato peroxidase, uma enzima fundamental do metabolismo antioxidante, mostrou que essa enzima confere resistência à produção de EROs e que o tratamento com um inibidor da enzima, promoveu aumento significativo de superóxidos nos parasitos resistentes (KUMAR et al., 2014). Mais recentemente a indução de EROs por AmB foi confirmada através de um estudo que utilizou nanopartículas de ouro com moléculas de AmB adsorvidas em sua superfície contra promastigotas de *L. donovani*. Ademais, o estudo ainda revela que a nanoformulação promoveu inibição da tripanotiona redutase, uma enzima antioxidante presente em tripanossomatídeos, mas ausente em mamíferos (SHARMA et al., 2024).

Adicionalmente, pesquisadores investigaram a ação do óleo de eugenol e da AmB, sozinhos ou associados, em macrófagos infectados por *L. donovani*. Os resultados mostraram que o eugenol induziu aumento de NO, mas AmB não. Porém, a associação dos compostos foi estatisticamente superior ao eugenol sozinho, indicando efeito sinérgico do eugenol com a AmB para produzir NO (KAR et al., 2021). Igualmente, já foi relatado que a combinação de lupeol, um produto natural da classe dos terpenos, com AmB induziu a produção de NO e a expressão de iNOS em camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* (DAS et al., 2021). Aqui, ao investigar a ação da AmB sobre a produção de EROs em 3 h de tratamento, não observamos modulação, porém, da quercetina sim, indicando que talvez a AmB precise de um maior tempo para induzir EROs e que analisar as moléculas em conjunto em um período de tempo maior pode ser válido no sentido de encontrar um efeito sinérgico para a produção de superóxidos. Do mesmo modo, AmB não modulou a produção de NO em 3 e 24 h de tratamento, porém,

sua combinação com a quercetina mostrou tendência de aumento em 24 h, indicando que outros tempos como 48 e 72h devem ser testados.

Após os resultados obtidos por citometria, buscamos investigar o perfil de citocinas dos sobrenadantes das populações de PBMC expostas à *L. infantum* e tratadas com quercetina e AmB. Na leishmaniose o perfil inflamatório apresentado por cada paciente é de grande importância para o curso da infecção. A construção imunológica criada a partir de diferentes tipos de células T auxiliares é um dos principais fatores que determina se o indivíduo será assintomático, apresentará sintomas leves ou um quadro grave da doença. Atualmente sabe-se que as respostas pró-inflamatórias de perfil Th1 são eficientes em eliminar amastigotas intracelulares, pois tornam os mecanismos microbicidas dos fagócitos mais ativos. Contrariamente, também sabe-se que respostas imunes Th2 possuem baixa eficácia no controle dos parasitos e levam ao desenvolvimento de quadros clínicos mais severos (JAFARZADEH et al., 2021; DIVENUTO et al., 2023; TIWARI et al., 2024). Todavia, a literatura ainda mostra que nem sempre uma alta atividade inflamatória pode ser eficaz para a cura da doença, haja vista que inflamações disfuncionais podem ocasionar mais danos do que benefícios e aumentar o tempo de cura dos pacientes (REVERTE; SNÄKÄ; FASEL, 2022; SENGUPTA et al., 2023; DE FRANCA et al., 2024).

Nesse contexto, já se foi relatado que a quercetina é capaz de diminuir as lesões, controlar a carga parasitária e aumentar a sobrevivência em modelos murinos (LAFLEUR et al., 2024). Em nosso trabalho avaliamos o perfil de citocinas de PBMC expostas a *L. infantum* durante 24 h de tratamento com quercetina e/ou AmB. Segundo os resultados que obtivemos, a quercetina modulou negativamente os níveis de IL-6 e IL-17, porém, não alterou a produção de IFN-γ, IL-10 e IL-12, apenas apresentando tendência para diminuição de IL-10.

De acordo com a literatura, a quercetina pode inibir a produção de IL-6 em neutrófilos, e camundongos com LC tratados com quercetina apresentaram níveis reduzidos dessa citocina pró-inflamatória, algo visto como benéfico para o tratamento da leishmaniose, pois apesar da IL-6 atuar como um sinalizador importante nos estágios iniciais do processo de cicatrização de feridas, recrutando fagócitos para o sítio inflamatório, sua atividade excessiva pode causar inflamação persistente, o que resulta na manutenção de feridas crônicas (KAPLANSKI et al., 2003 apud ORYAN; BEMANI; BAHRAMI, 2023). Ademais, a quercetina também já demonstrou seus efeitos anti-

inflamatórios atuando como inibidor da ativação de proteínas intracelulares como GP130, JAK1 e STAT3 induzida por IL-6, reduzindo o processo migratório e proliferativo de células de glioblastoma (MICHAUD-LEVESQUE; BOUSQUET-GAGNON; BÉLIVEAU, 2012). Outro estudo realizado em ratos com artrite gotosa, mostrou que o flavonoide diminuiu a expressão de IL-6, IL-17A e IL-17F (FENG et al., 2022). Em concordância, vimos que a quercetina modulou negativamente a produção de IL-6 e IL-17 em PBMC infectadas por *L. infantum* após 24 h. Em contrapartida, também é válido ressaltar que camundongos BALB/c infectados com *L.major* e tratados com quercetina, apresentaram redução da carga parasitária, diminuição da lesões e aumento dos níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN-γ e TNF (SANTOS et al., 2019). Nossos dados em conjunto com a literatura demonstram que a quercetina apresenta atividades anti-inflamatórias interessantes para o tratamento da leishmaniose, mas a quercetina também mostrou benefícios contra a doença ao induzir vias pró-inflamatórias. Portanto, é possível afirmar que o papel da quercetina na imunomodulação da leishmaniose ainda deve continuar a ser estudado e que talvez possa depender de diversos fatores, tais como: tempo de tratamento, concentração do composto, modelo de estudo e espécie de *Leishmania* causadora da doença.

Adiante, nossos resultados também mostraram que a quercetina não modulou a produção de IFN-γ, IL-10 e IL-12. Todavia, já se foi observado que a quercetina pode modular positivamente os níveis de citocinas como IFN-γ e IL-10 em macrófagos infectados por *L. donovani*, bem como diminuir TNF-α e aumentar a síntese de IL-10 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* após 24 h de tratamento (CATANEO et al., 2019; DAS et al., 2022). Ademais, como já citado, SANTOS e colaboradores (2019) demonstraram o aumento dos níveis de diversas citocinas pelo tratamento com quercetina na infecção por *L. major*, incluindo IL-10 e IFN-γ. Do mesmo modo, outro estudo já havia demonstrado que a quercetina induz a expressão de IFN-γ derivado de céluas Th1 e a regulação negativamente a IL-4 derivada de Th2 em PBMC (NAIR et al., 2002). Apesar disso, a literatura sobre a modulação da quercetina no perfil de citocinas na leishmaniose ainda é escassa e necessita de mais estudos.

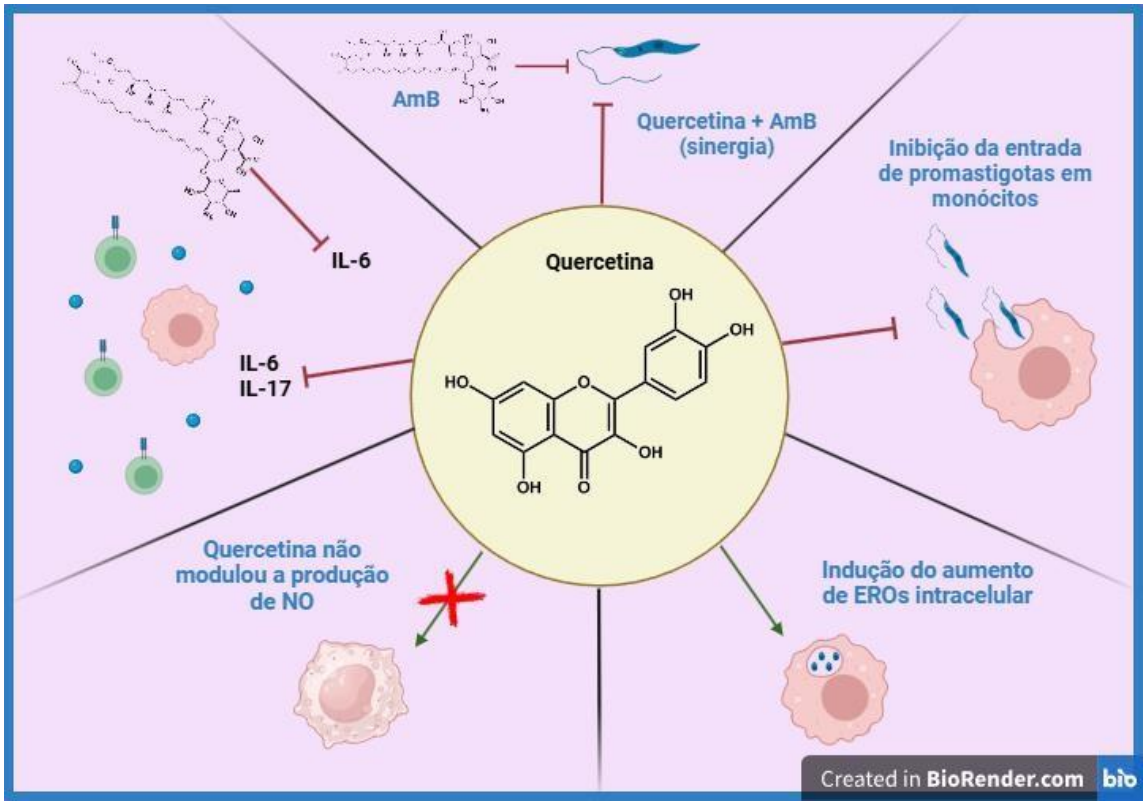
Por fim, a AmB também é capaz de regular a produção de citocinas e isso já foi observado em alguns estudos. DAS et al., (2021) relataram que o tratamento com AmB de Camundongos infectados por *L. donovani* reduziu os níveis de IL-10 e TGF-β, e sua combinação com o lupeol aumentou a produção de IFN-γ e IL-12. Ademais, na candidíase

orofaríngea a associação de AmB com paeonol, um composto fenólico, diminuiu a expressão de mRNA da Subunidade alfa do fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1α), IL-17A e IL-23 (PAN et al., 2022). Adicionalmente, a combinação do óleo de eugenol com a AmB também demonstrou aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN-γ e TNF-α, em macrófagos infectados *in vitro* e em camundongos *in vivo* (KAR et al., 2021). Na mesma perspectiva, outro estudo demonstrou que camundongos Balb/c infectados por *L. donovani* apresentam níveis diminuídos das citocinas Th17 (IL-17, IL-22 e IL-23) e níveis elevados de IL-6, IL-1β e TGF-β. Além disso, o estudo mostrou que o tratamento com AmB restaurou os níveis de IL-17 e IL-22 (KHATONIER et al., 2021). Em nossos estudos vimos que a AmB não modulou a produção de IL-6 em monócitos não infectados, porém, diminuiu os níveis de IL-6 na infecção, tanto sozinha quanto associada a quercetina. Além disso, AmB apresentou apenas uma tendência de aumento para IFN-γ na infecção e não modulou IL-10, IL12 e IL-17. Com isso, acreditamos que AmB module negativamente IL-6 durante a infecção de monócitos por *L. infantum* e que talvez possa modular IFN-γ em outras concentrações e/ou tempos de tratamento.

7. CONCLUSÃO

Muitos desafios ainda devem ser superados para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e menos tóxicas para o tratamento da leishmaniose. Nessa perspectiva, nosso trabalho vem propor e direcionar uma nova terapia para a leishmaniose, baseada na atividade sinérgica de um fármaco já comercializado com um produto natural de baixa toxicidade. Segundo os resultados do nosso estudo, a quercetina possui atividade anti-*Leishmania* e sua ação junto à anfotericina B apresentou efeitos sinérgicos. Além disso, a quercetina não foi tóxica para células humanas, enquanto a AmB é, indicando que uma terapia combinada onde menores doses de AmB podem ser compensadas pela quercetina é de grande valia. Ademais, a quercetina diminui a taxa de infecção de monócitos por *L. infantum*, porém, AmB não participou desse mecanismo. Em relação a produção de agentes microbicidas, o flavonoide induziu isoladamente uma maior liberação de EROs apenas em células infectadas, mas AmB também não atuou colaborando com isso de forma independente ou associada, o que pode indicar, baseado na literatura, que a AmB precise de mais tempo tanto para diminuir as taxas de infecção, quanto ajudar a elevar os níveis de EROs. Adiante, nenhuma das condições testadas modulou a produção de NO e os dados da literatura são controversos entre si. Entretanto, a combinação de AmB com outros produtos naturais já demonstrou aumentar os níveis de NO na infecção por *Leishmania* e aqui a combinação de AmB com quercetina apresentou tendência de aumento do NO em células infectadas após 24 h. Por fim, a quercetina modulou negativamente a produção de IL-6 e IL-17, e teve tendência para diminuir IL-10, mas não modulou IL-12 e IFN-γ. Do mesmo modo, AmB também modulou negativamente a expressão de IL-6 e teve tendência para aumento de IFN-γ, mas não pareceu modular IL-10, IL12 e IL-17 (figura 22). Portanto, nossos dados trazem novidades e direcionamentos em relação a quercetina e as suas interações com a AmB na infecção por *Leishmania*. Contudo, mais investigações sobre o flavonoide e suas interações com o anti-fúngico ainda devem ser avaliadas.

Figura 22 – Atividade anti-*Leishmania* e imunomoduladora da quercetina associada à AmB



A quercetina tem atividade anti-*Leishmania*, que é potencializada pela combinação com AmB. A quercetina também inibe a entrada de promastigotas em monócitos, aumenta a produção de EROs em células infectadas, não modula a produção de NO e diminui a expressão de IL-6 e IL-17. A AmB não participou da maioria desses mecanismos imunomoduladores, mas inibiu a produção de IL-6.

REFERÊNCIAS

ABADÍAS-GRANADO, I. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, v. 112, n. 7, p. 601-618, 2021.

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Basic immunology: functions and disorders of the immune system**. Elsevier Health Sciences, 2015.

ABDEL-HAFEZ, Yusri et al. Tolerability and epidemiology of nephrotoxicity associated with conventional amphotericin B therapy: a retrospective study in tertiary care centers in Palestine. **BMC nephrology**, v. 23, n. 1, p. 132, 2022.

ACUÑA, Stephanie Maia et al. Arginase expression modulates nitric oxide production in Leishmania (Leishmania) amazonensis. **PLoS One**, v. 12, n. 11, p. e0187186, 2017.

AGHABABAEI, Fatemeh; HADIDI, Milad. Recent advances in potential health benefits of quercetin. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 7, p. 1020, 2023.

AHMADI, Somayyeh et al. An update on Leishmania martiniquensis infections: Transmission, clinical characteristics, and treatment. **Parasite Epidemiology and Control**, p. e00386, 2024.

AL ABOODY, Mohammed Saleh; MICKYMARAY, Suresh. Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 45, 2020.

ALCÂNTARA, Laura M. et al. Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 430-439, 2018.

ALCOLEA, Pedro J. et al. Functional genomics in sand fly–derived Leishmania promastigotes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007288, 2019.

ALHARBI, Hajed Obaid A. et al. The Role of Quercetin, a Flavonoid in the Management of Pathogenesis Through Regulation of Oxidative Stress, Inflammation, and Biological Activities. **Biomolecules**, v. 15, n. 1, p. 151, 2025.

ALMEIDA, Fernanda S. et al. In vitro anti-Leishmania activity and molecular docking of spiroacridine compounds as potential multitarget agents against Leishmania infantum. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 49, p. 128289, 2021.

ALMEIDA, Fernanda Silva et al. Leishmanicidal activity of guanidine derivatives against leishmania infantum. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 3, p. 141, 2023.

ANSARI, Nasim Akhtar; SALUJA, Sumita; SALOTRA, Poonam. Elevated levels of interferon-γ, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clinical immunology**, v. 119, n. 3, p. 339-345, 2006.

ASSOUAB, Aicha et al. Cutaneous leishmaniasis and iron metabolism: current insights and challenges. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1488590, 2024.

BELKHELFA-SLIMANI, Radia; DJERDJOURI, Bahia. Caffeic acid and quercetin exert caspases-independent apoptotic effects on Leishmania major promastigotes, and reactivate the death of infected phagocytes derived from BALB/c mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 4, p. 321-331, 2017.

BENTZ, Alexandra B. A Review of quercetin: chemistry, antioxident properties, and bioavailability. **Journal of young investigators**, 2017.

BISWAS, Partha et al. A comprehensive analysis and anti-cancer activities of quercetin in ROS-mediated cancer and cancer stem cells. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 19, p. 11746, 2022.

BORGES, Beatriz Santana et al. In vitro anti-Leishmania activity of triclabendazole and its synergic effect with amphotericin B. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1044665, 2023.

BUTENKO, Anzhelika et al. Comparative genomics of Leishmania (Mundinia). **BMC genomics**, v. 20, p. 1-12, 2019.

CALVOPINA, Manuel et al. Relapse of new world diffuse cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Leishmania) mexicana after miltefosine treatment. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 6, p. 1074-1077, 2006.

CAMERON, Pamela et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by Leishmania mexicana amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-κB signaling pathway. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3297-3304, 2004.

CAROLUS, Hans et al. Amphotericin B and other polyenes—Discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020.

CARTER, Nicola S. et al. Natural products that target the arginase in Leishmania parasites hold therapeutic promise. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 267, 2021.

CATANEO, Allan Henrique Depieri et al. Quercetin promotes antipromastigote effect by increasing the ROS production and anti-amastigote by upregulating Nrf2/HO-1 expression, affecting iron availability. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 113, p. 108745, 2019.

CAVALCANTE, Tainá et al. The role of sialic acids in the establishment of infections by pathogens, with special focus on Leishmania. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 671913, 2021.

CECÍLIO, Pedro; CORDEIRO-DA-SILVA, Anabela; OLIVEIRA, Fabiano. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasites. **Communications biology**, v. 5, n. 1, p. 305, 2022.

CLEMENTE, Camila M. et al. Piperine, quercetin, and curcumin identified as promising natural products for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 123, n. 4, p. 1-15, 2024.

CLOS, Joachim; GRÜNEBAST, Janne; HOLM, Myrine. Promastigote-to-Amastigote conversion in leishmania spp.—a molecular view. **Pathogens**, v. 11, n. 9, p. 1052, 2022.

COSTA-DA-SILVA, Ana Caroline et al. Immune responses in leishmaniasis: an overview. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 7, n. 4, p. 54, 2022.

COUTINHO, João Victor Soares Coriolano et al. Visceral leishmaniasis and leishmaniasis-HIV coinfection: comparative study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 05, p. 670-674, 2017.

DA CÂMARA ROCHA, Juliana et al. Biological activity of Morita-Baylis-Hillman adduct homodimers in L. infantum and L. amazonensis: anti-Leishmania activity and cytotoxicity. **Parasitology research**, v. 118, p. 3067-3076, 2019.

DA SILVA, Edson Roberto; DO CARMO MAQUIAVELI, Claudia; MAGALHÃES, Prislaine Pupolin. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target Leishmania (Leishmania) amazonensis arginase. **Experimental parasitology**, v. 130, n. 3, p. 183-188, 2012.

DAS, Antu et al. Lupeol and amphotericin B mediate synergistic anti-leishmanial immunomodulatory effects in Leishmania donovani-infected BALB/c mice. **Cytokine**, v. 137, p. 155319, 2021.

DAS, Sabya Sachi et al. Therapeutic potential of quercetin-loaded nanoemulsion against experimental visceral leishmaniasis: in vitro/ex vivo studies and mechanistic insights. **Molecular Pharmaceutics**, v. 19, n. 9, p. 3367-3384, 2022.

DASH, Sanat Kumar; BENIVAL, Derajram; JINDAL, Anil B. Formulation Strategies to Overcome Amphotericin B Induced Toxicity. **Molecular Pharmaceutics**, v. 21, n. 11, p. 5392-5412, 2024.

DE FRANCA, Mariana Nobre Farias et al. CD4+ Th1 and Th17 responses and multifunctional CD8 T lymphocytes associated with cure or disease worsening in human visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1277557, 2024.

DE VRIES, Henry JC; SCHALLIG, Henk D. Cutaneous leishmaniasis: a 2022 updated narrative review into diagnosis and management developments. **American journal of clinical dermatology**, v. 23, n. 6, p. 823-840, 2022.

DESCOTEAUX, Albert; TURCO, Salvatore J. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1455, n. 2-3, p. 341-352, 1999.

DIVENUTO, Francesca et al. Role of Treg, Breg and other cytokine sets in host protection and immunopathology during human leishmaniasis: Are they potential valuable markers in clinical settings and vaccine evaluation?. **Acta Tropica**, v. 240, p. 106849, 2023.

DONG, George et al. Extracellular vesicles and leishmaniasis: Current knowledge and promising avenues for future development. **Molecular Immunology**, v. 135, p. 73-83, 2021.

DUARTE, Diana; VALE, Nuno. Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology. **Current Research in Pharmacology and Drug Discovery**, v. 3, p. 100110, 2022.

DUQUE, Guillermo Arango; DESCOTEAUX, Albert. Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means. **Current opinion in microbiology**, v. 26, p. 32-40, 2015.

FARIA, Robson Xavier et al. Plants of Brazilian restingas with tripanocide activity against Trypanosoma cruzi strains. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 49, p. 473-483, 2017.

FENG, Wei et al. Study on the effect and mechanism of quercetin in treating gout arthritis. **International immunopharmacology**, v. 111, p. 109112, 2022.

FERNÁNDEZ-FIGUEROA, Edith A. et al. Down-regulation of TLR and JAK/STAT pathway genes is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis: a gene expression analysis in NK cells from patients infected with Leishmania mexicana. PLoS neglected tropical diseases, v. 10, n. 3, p. e0004570, 2016.

FERREIRA, Christian et al. Resveratrol is active against Leishmania amazonensis: in vitro effect of its association with amphotericin B. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 6197-6208, 2014.

FONSECA-SILVA, Fernanda et al. Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of Leishmania amazonensis intracellular amastigotes. **Journal of natural products**, v. 76, n. 8, p. 1505-1508, 2013.

FONSECA-SILVA, Fernanda et al. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in Leishmania amazonensis. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e14666, 2011.

FORESTIER, Claire-Lise et al. Imaging host cell-Leishmania interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. **Cell host & microbe**, v. 9, n. 4, p. 319-330, 2011.

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

GARCIA, Andreza R. et al. Leishmania infantum arginase: biochemical characterization and inhibition by naturally occurring phenolic substances. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 34, n. 1, p. 1100-1109, 2019.

GILL, John et al. Hepatotoxicity possibly caused by amphotericin B. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 33, n. 6, p. 683-685, 1999.

GLUENZ, Eva; GINGER, Michael L.; MCKEAN, Paul G. Flagellum assembly and function during the Leishmania life cycle. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 4, p. 473-479, 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Infection Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GUEIRARD, Pascale et al. Trafficking of Leishmania donovani promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 1, p. 100-111, 2008.

HAMMI, K. M. et al. Antileishmanial activity of Moringa oleifera leaf extracts and potential synergy with amphotericin B. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 67-73, 2020.

HARKINS, Kelly M. et al. Phylogenomic reconstruction supports supercontinent origins for Leishmania. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 38, p. 101-109, 2016.

HIDALGO, Maria; SÁNCHEZ-MORENO, Concepción; DE PASCUAL-TERESA, Sonia. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Food chemistry**, v. 121, n. 3, p. 691-696, 2010.

INSELMANN, G.; INSELMANN, U.; HEIDEMANN, H. T. Amphotericin B and liver function. **European journal of internal medicine**, v. 13, n. 5, p. 288-292, 2002.

ISNARD, Amandine; SHIO, Marina T.; OLIVIER, Martin. Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 72, 2012.

JAFARINIA, Morteza et al. Quercetin with the potential effect on allergic diseases. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 16, p. 1-11, 2020.

JAFARZADEH, Abdollah et al. The importance of T cell-derived cytokines in post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Cytokine**, v. 147, p. 155321, 2021.

KAPLANSKI, Gilles et al. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends in immunology**, v. 24, n. 1, p. 25-29, 2003.

KAR, Amrita et al. Synergic effect of eugenol oleate with amphotericin B augments anti-leishmanial immune response in experimental visceral leishmaniasis in vitro and in vivo. **International Immunopharmacology**, v. 91, p. 107291, 2021.

KAUSAR, Gulafsha et al. Phenotypic and functional characteristics of monocyte subsets in the blood and bone marrow of Indian subjects with Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 4, p. e0012112, 2024.

KEMP et al. Interferon-γ-and Tumour Necrosis Factor-α-Producing Cells in Humans who are Immune to Cutaneous Leishmaniasis. **Scandinavian journal of immunology**, v. 49, n. 6, p. 655-659, 1999.

KEYHANI, Alireza et al. In vitro and in vivo therapeutic potentials of 6-gingerol in combination with amphotericin B for treatment of Leishmania major infection: Powerful synergistic and multifunctional effects. **International Immunopharmacology**, v. 101, p. 108274, 2021.

KHATONIER, Rasmita et al. Immunomodulatory role of Th17 pathway in experimental visceral leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 226, n. 6, p. 152148, 2021.

KONE, Abdoulaye K. et al. Visceral leishmaniasis in West Africa: clinical characteristics, vectors, and reservoirs. **Journal of Parasitology Research**, v. 2019, n. 1, p. 9282690, 2019.

KUMAR, Ashish et al. Ascorbate peroxidase, a key molecule regulating amphotericin B resistance in clinical isolates of Leishmania donovani. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 6172-6184, 2014.

KUMAR, G. Aditya et al. Leishmania donovani internalizes into host cells via caveolin-mediated endocytosis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 12636, 2019.

KUMAR, Rajiv; NYLÉN, Susanne. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 251, 2012.

KURKJIAN, Katie M. et al. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. **Cytometry Part A**, v. 69, n. 5, p. 353-358, 2006.

LAFLEUR, Andrea et al. Immunotherapeutic Strategies as Potential Treatment Options for Cutaneous Leishmaniasis. **Vaccines**, v. 12, n. 10, p. 1179, 2024.

LAGE, Paula S. et al. Antileishmanial activity and evaluation of the mechanism of action of strychnobiflavone flavonoid isolated from Strychnos pseudoquina against Leishmania infantum. **Parasitology research**, v. 114, p. 4625-4635, 2015.

LAINSON, R. et al. The leishmaniases in biology and medicine, vol. 1 (**biology and epidemiology**). 1987.

LAINSON, Ralph. Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, 2010.

LEAO, Selma De Souza et al. Intracellular Leishmania amazonensis amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 10, p. 3219-3231, 1995.

LEITE, Fernando Ferreira et al. In vitro and in silico evaluation of the anti-leishmania activity of synthetic chalcones. **Natural Product Research**, p. 1-12, 2024.

LEMOS, Ana Francisca Barroca. Avaliação da ativação do sistema complemento por extratos proteicos de Leishmania spp. 2017. Tese de Doutorado. **Instituto de Higiene e Medicina Tropical.**

LI, Yao et al. Quercetin, inflammation and immunity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 167, 2016

LIÉVIN-LE MOAL, Vanessa; LOISEAU, Philippe M. Leishmania hijacking of the macrophage intracellular compartments. **The FEBS journal**, v. 283, n. 4, p. 598-607, 2016.

LIU, Lingbo et al. Effect of Amphotericin B on the thermodynamic stability, aggregation state, hemolysis and antifungal activity of Amphotericin B-nonionic surfactant micellar system. **Journal of Molecular Liquids**, v. 376, p. 121486, 2023.

LODGE, Robert; DESCOTEAUX, Albert. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of Leishmania. **Clinical Immunology**, v. 114, n. 3, p. 256-265, 2005.

LYSENKO, A. Ja. Distribution of leishmaniasis in the Old World. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 44, n. 4, p. 515, 1971.

MACH, Jan; SUTAK, Robert. Iron in parasitic protists–from uptake to storage and where we can interfere. **Metallomics**, v. 12, n. 9, p. 1335-1347, 2020.

MAKSOUD, Semer; EL HOKAYEM, Joelle. The cytokine/chemokine response in Leishmania/HIV infection and co-infection. **Heliyon**, v. 9, n. 4, 2023.

MARTIN, Rachel; LEE, Vincent R. Antimony Toxicity. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2024.

MAURÍCIO, Isabel L. Leishmania taxonomy. **The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases**, p. 15-30, 2018.

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

MCGWIRE, B. Satoskar; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.

MEHWISH, Shaila et al. Bioflavonoid-induced apoptosis and DNA damage in amastigotes and promastigotes of Leishmania donovani: deciphering the mode of action. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5843, 2021.

MELCON-FERNANDEZ, Estela et al. Miltefosine and nifuratel combination: a promising therapy for the treatment of Leishmania donovani visceral leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1635, 2023.

MEMARIANI, Hamed; MEMARIANI, Mojtaba; GHASEMIAN, Abdolmajid. Quercetin as a promising antiprotozoan phytochemical: current knowledge and future research avenues. **BioMed Research International**, v. 2024, n. 1, p. 7632408, 2024.

MESQUITA, Juliana T.; TEMPONE, Andre G.; REIMÃO, Juliana Q. Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime®, miltefosine and sitamaquine against Leishmania (Leishmania) infantum intracellular amastigotes. **Acta tropica**, v. 130, p. 112-116, 2014.

MICHAUD-LEVESQUE, Jonathan; BOUSQUET-GAGNON, Nathalie; BÉLIVEAU, Richard. Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration. **Experimental cell research**, v. 318, n. 8, p. 925-935, 2012.

MOHAJERI, Maryam et al. Synthesis and in vitro leishmanicidal activities of six quercetin derivatives. **Advanced Biomedical Research**, v. 7, 2018.

MOMEN, Hooman; CUPOLILLO, Elisa. Speculations on the origin and evolution of the genus Leishmania. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 583-588, 2000.

MUKHERJEE, Budhaditya et al. Probing the molecular mechanism of aggressive infection by antimony resistant Leishmania donovani. **Cytokine**, v. 145, p. 155245, 2021.

MULE, Simon Ngao et al. Protein glycosylation in Leishmania spp. **Molecular Omics**, v. 16, n. 5, p. 407-424, 2020.

MURAKAMI, Akira; ASHIDA, Hitoshi; TERAO, Junji. Multitargeted cancer prevention by quercetin. **Cancer letters**, v. 269, n. 2, p. 315-325, 2008.

MURRAY, Peter J. Macrophage polarization. **Annual review of physiology**, v. 79, n. 1, p. 541-566, 2017.

NAIR, Madhavan PN et al. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFNγ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1593, n. 1, p. 29-36, 2002.

NERY, Raphaela Lisboa Andrade et al. Leishmania spp. genetic factors associated with cutaneous leishmaniasis antimony pentavalent drug resistance: a systematic review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 119, p. e230240, 2024.

NEVES, D. P. et al. Parasitologia Humana. 13a edição. Rio de Janeiro: **Livraria Atheneu**, 2016.

NEVES, Pâmela Gabriella Rodrigues Das. Avaliação in vitro da quercetina como potencial agente anti-leishmania. 2016.

NGUYEN, Thi Lan Anh; BHATTACHARYA, Debanjana. Antimicrobial activity of quercetin: an approach to its mechanistic principle. **Molecules**, v. 27, n. 8, p. 2494, 2022.

NISHIMURO, Haruno et al. Estimated daily intake and seasonal food sources of quercetin in Japan. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2345-2358, 2015.

NIX, David E. Cardiotoxicity induced by antifungal drugs. **Current Fungal Infection Reports**, v. 8, p. 129-138, 2014.

NOVAIS, Fernanda O. et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of Leishmania braziliensis by reactive oxygen species. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. 8, p. 1288-1296, 2014.

NYLÉN, Susanne et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+ CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 4, p. 805-817, 2007.

ORYAN, Ahmad; BEMANI, Effat; BAHRAMI, Somayeh. Anti-leishmanial, immunomodulatory and anti-oxidative activity of quercetin against cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 13, n. 1, p. 26-34, 2023.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). LEISHMANIASIS: Epidemiological report on the Region of the Americas No. 13, December 2024. Disponível em: < https://iris.paho.org/handle/10665.2/63165>. Acesso em: 17 jan. 2025.

PAN, Min et al. Paeonol enhances treatment of fluconazole and amphotericin B against oropharyngeal candidiasis through HIF-1α related IL-17 signaling. **Medical Mycology**, v. 60, n. 3, p. myac011, 2022.

PASSOS, Sara et al. Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in Leishmania braziliensis infections. **The Journal of infectious diseases**, v. 211, n. 2, p. 274-282, 2015.

PERIASAMY, Ramyaa et al. Quercetin protects human peripheral blood mononuclear cells from OTA-induced oxidative stress, genotoxicity, and inflammation. **Environmental toxicology**, v. 31, n. 7, p. 855-865, 2016.

PURKAIT, Bidyut et al. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of Leishmania donovani. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1031-1041, 2012.

REVERTE, Marta; SNÄKÄ, Tiia; FASEL, Nicolas. The dangerous liaisons in the oxidative stress response to leishmania infection. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 409, 2022.

RITTER, Uwe; FRISCHKNECHT, Freddy; VAN ZANDBERGEN, Ger. Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites?. **Trends in parasitology**, v. 25, n. 11, p. 505-510, 2009.

ROATT, Bruno Mendes et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 8965-8977, 2020.

ROCHA, Juliana da Câmara et al. Investigação da atividade biológicas dos adutos de Morita-Baylis-Hillman sobre Leishmania spp. 2018.

RODRÍGUEZ, Nilda E. et al. Stage-specific pathways of Leishmania infantum chagasi entry and phagosome maturation in macrophages. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e19000, 2011.

RODRÍGUEZ, Nilda E.; GAUR, Upasna; WILSON, Mary E. Role of caveolae in Leishmania chagasi phagocytosis and intracellular survival in macrophages. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1106-1120, 2006.

ROGERS, Matthew E.; DE PABLOS, Luis Miguel; SUNTER, Jack D. Gels and cells: the Leishmania biofilm as a space and place for parasite transmission. **Trends in parasitology**, 2024.

ROSSI, Matteo; FASEL, Nicolas. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions!. **International immunology**, v. 30, n. 3, p. 103-111, 2018.

RUANG-AREERATE, Toon et al. Genetic variation and geographic distribution of Leishmania orientalis and Leishmania martiniquensis among Leishmania/HIV co-infection in Thailand. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 23094, 2023.

SAMANT, Mukesh et al. Role of cytokines in experimental and human visceral leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 624009, 2021.

SANTOS, Rosiane Freire dos et al. Ação terapêutica e moduladora da quercetina na leishmaniose tegumentar experimental por Leishmania braziliensis e Leishmania major. 2019.

SANTOS, Rosiane Freire dos et al. Atividade do flavonóide quercetina em Leishmania braziliensis usando hamster como modelo de infecção. 2012.

SANTOS, Rosiane Freire dos et al. Therapeutic effect of oral quercetin in hamsters infected with Leishmania Viannia braziliensis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1059168, 2023.

SATO, Shin; MUKAI, Yuuka. Modulation of chronic inflammation by quercetin: The beneficial effects on obesity. **Journal of inflammation research**, p. 421-431, 2020.

SAUNDERS, Eleanor C.; MCCONVILLE, Malcolm J. Immunometabolism of Leishmania granulomas. **Immunology and cell biology**, v. 98, n. 10, p. 832-844, 2020.

SCARPINI, Sara et al. Visceral leishmaniasis: Epidemiology, diagnosis, and treatment regimens in different geographical areas with a focus on pediatrics. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1887, 2022.

SÉGUIN, Olivier; DESCOTEAUX, Albert. Leishmania, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 1-6, 2016.

SEN, Gargi et al. Quercetin interferes with iron metabolism in Leishmania donovani and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1066-1075, 2008.

SENGUPTA, Ritika et al. Immune dysregulation and inflammation causing hypopigmentation in post kala-azar dermal leishmaniasis: partners in crime?. **Trends in parasitology**, 2023.

SERAFIM, Tiago D. et al. Leishmaniasis: the act of transmission. **Trends in parasitology**, v. 37, n. 11, p. 976-987, 2021.

SERRANO, Dolores R. et al. Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. **International journal of pharmaceutics**, v. 447, n. 1-2, p. 38-46, 2013.

SEVERINO, Patrícia et al. Cutaneous/mucocutaneous leishmaniasis treatment for wound healing: classical versus new treatment approaches. **Microbiology Research**, v. 13, n. 4, p. 836-852, 2022.

SHARMA, Kikku et al. Development of Amphotericin B Decorated Gold Nanoparticles as a Promising Antileishmanial Nanoconjugate. **ACS Applied Bio Materials**, v. 7, n. 9, p. 6239-6248, 2024.

SHIRZADI, Mohammad Reza. Lipsosomal amphotericin B: a review of its properties, function, and use for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Research and reports in tropical medicine**, p. 11-18, 2019.

SILVA-SILVA, João Victor et al. Antileishmanial activity of flavones-rich fraction from Arrabidaea chica Verlot (Bignoniaceae). **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 703985, 2021.

SINGH, Priyanka et al. The role of quercetin in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 166, p. 10-19, 2021.

SIQUEIRA-NETO, Jair L. et al. Cysteine proteases in protozoan parasites. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 8, p. e0006512, 2018.

SONG, Xiaoli; WANG, Yali; GAO, Liguo. Mechanism of antioxidant properties of quercetin and quercetin-DNA complex. **Journal of molecular modeling**, v. 26, p. 1-8, 2020.

SOOFIYANI, Saiedeh Razi et al. Quercetin as a novel therapeutic approach for lymphoma. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, n. 1, p. 3157867, 2021.

SRIVASTAVA, Saumya et al. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasites & vectors**, v. 10, p. 1-11, 2017.

SUNYOTO, Temmy; POTET, Julien; BOELAERT, Marleen. Why miltefosine—a life-saving drug for leishmaniasis—is unavailable to people who need it the most. **BMJ global health**, v. 3, n. 3, p. e000709, 2018.

TASDEMIR, Deniz et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1352-1364, 2006.

TICHA, Lucie et al. Development of various Leishmania (Sauroleishmania) tarentolae strains in three Phlebotomus species. **Microorganisms**, v. 9, n. 11, p. 2256, 2021.

TIWARI, Rahul et al. The development and maintenance of immunity against visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1486407, 2024.

TUON, Felipe Francisco; AMATO NETO, Vicente; SABBAGA AMATO, Valdir. Leishmania: origin, evolution and future since the Precambrian. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 158-166, 2008.

VALIGUROVÁ, Andrea; KOLÁŘOVÁ, Iva. Unrevealing the mystery of latent leishmaniasis: What cells can host leishmania?. **Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 246, 2023.

VAN ZANDBERGEN, Ger et al. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 37, p. 13837-13842, 2006.

VOAK, Andrew A. et al. Pharmacodynamics and cellular accumulation of amphotericin B and miltefosine in Leishmania donovani-infected primary macrophages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 5, p. 1314-1323, 2018.

VOLPEDO, Greta et al. Determinants of innate immunity in visceral leishmaniasis and their implication in vaccine development. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 748325, 2021.

VOLPEDO, Greta et al. Mechanisms of immunopathogenesis in cutaneous leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 685296, 2021.

WANG, Cheng et al. Macrophage polarization and its role in liver disease. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 803037, 2021.

WHO. **World Health Organization**. Leishmaniasis. Disponível em: < https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 15 jan. 2025.

ZENG, Yan et al. Activity of quercetin and kaempferol against Streptococcus mutans biofilm. **Archives of oral biology**, v. 98, p. 9-16, 2019.

ZERPA, O. et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. **British journal of Dermatology**, v. 156, n. 6, p. 1328-1335, 2007.

ZHANG, Yuejuan et al. Discovery of Quercetin and Its Analogs as Potent OXA-48 BetaLactamase Inhibitors. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 926104, 2022.

ZIJLSTRA, Eduard E. The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 464, 2016.

ZU, Guoxiu et al. Mechanism of quercetin therapeutic targets for Alzheimer disease and type 2 diabetes mellitus. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 22959, 2021.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Departamento de Biologia Celular e Molecular CBiotec

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: ***Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática***

Pesquisadora: Tatjana Keesen de Souza Lima

I. Esclarecimentos sobre a pesquisa

Estamos convidando você para participar como voluntário de uma pesquisa sobre calazar ou leishmaniose visceral. Esta é uma doença que afeta milhares de pessoas por ano, principalmente populações de baixa renda vivendo em áreas de risco. Devido a isso, a falta de políticas públicas e o desinteresse da indústria em investir no combate a leishmaniose levam a baixa disponibilidade de terapêuticas mais eficientes presentes no mercado, levando-se em conta que os atuais fármacos de referência disponíveis para o tratamento dessa patologia apresentam altas taxas de toxicidade para o corpo.

Em face do exposto, nessa pesquisa nós pretendemos realizar o estudo *in vitro* (sem aplicação de compostos em seres vivos) de um composto que possa atuar no tratamento da leishmaniose visceral. Para isso, iremos realizar a coleta de sangue de indivíduos saudáveis no intuito de ver a atuação dessa molécula sobre Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) infectadas com *Leishmania infantum*, a fim de avaliar sua atividade imunomoduladora. Caso você aceite em participar do estudo você deverá permitir a coleta do seu sangue para a realização dos experimentos.

Vamos a seguir, explicar a você para que usaremos cada material coletado e os riscos e desconforto que poderão existir.

Na coleta de sangue, serão coletados por uma pessoa treinada aproximadamente 15-20 mL de sangue, usando-se material estéril e descartável. Os riscos e desconfortos que você correrá nessa coleta são mínimos e poderá ser desmaio, sangramentos, manchas arroxeadas ou infecção no local da coleta. Iremos minimizar este risco com cuidados na realização deste procedimento, que são a limpeza no local da coleta usando-se álcool e pressionando o local de coleta por alguns minutos depois da retirada da agulha. Após a coleta, o sangue será submetido a extração de PBMC, que são seus linfócitos e monócitos Essas células serão infectadas com os parasitas *Leishmania in vitro* e submetidas a diferentes tratamentos com moléculas de controle e teste, para análise da atividade do nosso composto de interesse no contexto da infecção. Ademais, todos os materiais biológicos utilizados neste trabalho serão utilizados somente para pesquisa.

Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Os benefícios da sua participação nesta pesquisa é que você irá facilitar a busca pela melhoria dos estudos na pesquisa de novos fármacos que sejam capazes de combater a leishmaniose de forma mais segura e eficaz, podendo no futuro contribuir com informações que poderão ser utilizadas na busca da melhoria no tratamento da doença e/ou da cura.

Garantimos que todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Caso você tenha interesse nos resultados da pesquisa basta solicitar ao pesquisador responsável.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária, você não será pago por participar do estudo. No entanto, caso você tenha algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, e se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito à indenização.

Você ficará com uma cópia deste documento e toda dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá entrar em contato com a Drª Tatjana Keesen de Souza Lima, no Centro de Biotecnologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária- João Pessoa - PB - Brasil - CEP: 58051-900 Fone: (83) 3216-7173.

Dúvidas a respeito de questões éticas desta pesquisa poderão ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFPB do hospital universitário Lauro Wanderley (CEP/HULW)- Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW- 4°andar.Campus I-Cidade Universitária-Bairro: Castelo Branco-CEP:58059-900-João Pessoa-PB- FAX (083) 32167522- CNPJ:24098477/007-05- Telefone: (083) 32167964- E-mail:comitedeetica@hulw.ufpb.br.

OBS.: NÃO participe desta pesquisa caso você esteja no período de ciclo menstrual, ou tenha consumido bebida alcóolica nas últimas 48 horas, ou esteja com algum sintoma de infecção corrente, ou esteja fazendo uso de medicamentos como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), antibióticos e/ou corticoides.

Possui alguma(s) comorbidade(s)? **Alguma vez já foi diagnosticado com leishmaniose?**

SIM ( ) NÃO ( ) **SIM ( ) NÃO ( )**

Se sim, qual(is) comorbidade(s)?_____

_____

Se sim, qual(is) leishmaniose(s)? _____

Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será desenvolvida, os riscos e benefícios envolvidos, bem como os meus direitos, e concordo em participar voluntariamente do estudo "***Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática***" autorizando o uso do meu sangue para a realização deste estudo.

Participantes da pesquisa:

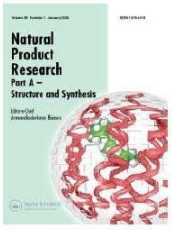
_____**data ____/____/___**

Voluntário

_____**data ____/____/___**

Pesquisador

APÊNDICE B - Artigo publicado em tema correlato à dissertação



Natural Product Research
Formerly Natural Product Letters

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: www.tandfonline.com/journals/gnpl20

In vitro and *in silico* evaluation of the anti-leishmania activity of synthetic chalcones

Fernando Ferreira Leite, Luis Cezar Rodrigues, Bruno Hanrry Melo de Oliveira, Gabrielly Diniz Duarte, Maria Denise Leite Ferreira, Natália Ferreira de Sousa, Shayenne Eduarda Ramos Vanderley, Leonardo Lima Cardoso, Tatjana Souza Lima Keesen, Rodrigo Santos Aquino de Araújo, Luciana Scotti, Marcus Tullius Scotti & Francisco Jaime Bezerra Mendonça-Junior

To cite this article: Fernando Ferreira Leite, Luis Cezar Rodrigues, Bruno Hanrry Melo de Oliveira, Gabrielly Diniz Duarte, Maria Denise Leite Ferreira, Natália Ferreira de Sousa, Shayenne Eduarda Ramos Vanderley, Leonardo Lima Cardoso, Tatjana Souza Lima Keesen, Rodrigo Santos Aquino de Araújo, Luciana Scotti, Marcus Tullius Scotti & Francisco Jaime Bezerra Mendonça-Junior (11 Sep 2024): *In vitro* and *in silico* evaluation of the anti-leishmania activity of synthetic chalcones, Natural Product Research, DOI: 10.1080/14786419.2024.2401499

To link to this article: https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2401499

View supplementary material

Published online: 11 Sep 2024.

Submit your article to this journal

Article views: 117

View related articles

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gnpl20

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospiral Universitário Lauro Wanderley/UFPB

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
LAURO WANDERLEY/UFPB

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática

Pesquisador: Tatjana Keesen de Souza Lima
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 17813013.8.0000.5183
Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 404.854
Data da Relatoria: 24/09/2013

Apresentação do Projeto:
A leishmaniose visceral é uma doença endêmica na região do nordeste incluindo o estado da Paraíba e possui um forte impacto na população. O modelo epidemiológico deixou de ser totalmente rural e esta doença se tornou prevalente também em zonas urbanas e peri-urbanas. O projeto de pesquisa tem como proposta estudar a leishmaniose que é uma doença infecciosa causada por várias espécies de protozoários do gênero Leishmania.
Serão selecionados 3 grupos de indivíduos: 1) com leishmaniose visceral com sintomatologia e 2)indivíduos assintomáticos, com sorologia positiva e sem sintomatologia clínica, além de 3)indivíduos com sorologia negativa e com nenhuma sintomatologia. Os pacientes com leishmaniose visceral serão provenientes de áreas endêmicas da Paraíba. O diagnóstico da doença será baseado em achados clínicos e testes laboratoriais, padrão utilizados nos centros de referência, incluindo demonstração parasitológica e presença de anticorpos anti-leishmania. Os indivíduos não infectados e assintomáticos serão selecionados de acordo com uma anamnese detalhada e exames sorológicos. Todos os indivíduos que contribuirão para a realização deste trabalho participarão voluntariamente da pesquisa, sendo esclarecidos sobre a importância do trabalho e assinarão o termo de consentimento esclarecido (TCLE). Após

Endereço: HULW-4º andar - Campus I - UFPB
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900
UF: PB **Município:**
Telefone: (833)216--7302 **Fax:** (833)216--7522 **E-mail:** iaponiracortez@yahoo.com.br; cephulw@hotmail.