

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

RAFAELA MIRANDA BARBOSA

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E LEISHMANICIDA DE NANOPARTÍCULAS  
DE ÓXIDO DE ZINCO DOPADAS COM PRATA**

UBERABA

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

RAFAELA MIRANDA BARBOSA

**Atividade imunomoduladora e leishmanicida de nanopartículas de óxido de zinco dopadas com prata**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical e Infectologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anielle Christine Almeida Silva

UBERABA

2021

**Catálogo na fonte:**

**Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

B211a Barbosa, Rafaela Miranda  
Atividade imunomoduladora e leishmanicida de nanopartículas de óxido de zinco dopadas com prata / Rafaela Miranda Barbosa. -- 2021.  
71 p. : il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Infectologia) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021  
Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva  
Coorientadora: Profa. Dra. Anielle Christine Almeida Silva

1. Leishmaniose cutânea. 2. Nanopartículas multifuncionais. 3. Imunomodulação. 4. Óxido de zinco. 5. Prata I. Silva, Marcos Vinicius da. I. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.928.5

RAFAELA MIRANDA BARBOSA

**Atividade imunomoduladora e leishmanicida de nanopartículas de óxido de zinco dopadas com prata**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical e Infectologia.

17 de dezembro de 2021.

Banca examinadora:

---

**Dr. Jonatas da Silva Catarino**  
Yale University

---

**Dr<sup>a</sup>. Thaís Soares Farnesi de Assunção**  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

UBERABA

2021

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Flávio e Angélica, pelo apoio que sempre me deram para que eu pudesse alcançar meus objetivos, por acreditaram em mim e me fazerem acreditar que sou capaz. Aos meus irmãos, Kaique e Enzo, por todo amor e carinho, fundamental nesta trajetória.

Agradeço aos meus amigos que sempre estiveram do meu lado quando eu mais precisei, me dando apoio mesmo que de longe, em especial, Isa e Gabi. Agradeço à Jai e ao Marvin, que compartilharam morada comigo em Uberaba e estiveram sempre dispostos para me acolher nos dias bons e difíceis com muito amor e carinho. Felipe - e Ares e Bento -, obrigada por nunca ter medido esforços para me apoiar na minha carreira e por ter estado, pacientemente, presente e prestativo nesses últimos meses difíceis tornando meus dias mais felizes e leves.

Sou muito grata a todos os funcionários da UFTM que me ajudam direta ou indiretamente: alunos, professores, técnicos, profissionais de limpeza, secretários, entre tantos outros que estão envolvidos no desenvolvimento dessa pesquisa. Ao meu orientador, Marcos, um profissional sem igual e a quem tenho profundo respeito, admiração e gratidão por todos os ensinamentos e lições que me foram passados com tanta paciência, calma e sabedoria.

Por fim, agradeço a todos que encontrei durante essa caminhada e que fizeram o caminho ser mais leve de ser percorrido.

## RESUMO

Nas últimas décadas, o uso de nanopartículas (NP) em pesquisas biomédicas cresce exponencialmente, especialmente no uso contra patógenos intracelulares - como os causadores das leishmanioses – e na modulação de células imunes. Nesse contexto, a leishmaniose tegumentar (LT), transmitida pelos flebótomos e que atingem os tegumentos, ocasionam um importante conjunto de manifestações clínicas as quais tem sido um relevante problema de saúde pública. A LT causa desde lesões únicas ou múltiplas nos tegumentos, podendo prejudicar a qualidade de vida do indivíduo, até lesões desfigurantes e com risco de vida. Por ano, são estimados de 700 mil a 1,2 milhão de novos casos de LT e, ainda assim, existem poucos estudos e ou tratamentos contra essa patologia. Nesse contexto, o parasito intracelular *Leishmania (L.) braziliensis* tem sido um dos principais causadores desse grupo de doenças. Sabe-se que um dos principais preditores da gravidade da infecção por parasitos do gênero *Leishmania* spp. é o sistema imune (SI) do hospedeiro, portanto terapias que objetivam a sua modulação imunológica podem ser usadas para limitar e combater tais doenças. O presente estudo propôs-se a testar NP de óxido de zinco (ZnO) puras ou NP de ZnO híbridas dopadas com 5%, 9% ou 11% de prata (Ag) (ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag, respectivamente) quanto à sua capacidade de inibição de cepas de *L. braziliensis* e, também, observar o potencial imunomodulatório dessas NP. Nossos achados mostraram que todas as NP testadas apresentam seletividade para ocasionar a morte de promastigotas de *L. braziliensis* quando comparado a células RAW 264.7, além de apresentarem capacidade de inibir o crescimento e replicação do parasito em questão. ZnO:9Ag foi a NP que apresentou melhor potencial leishmanicida (IC<sub>50</sub>=7,93µg/mL), com capacidade de inibir o crescimento do parasito desde o terceiro dia de tratamento. Consoante a isso, as NP, em especial ZnO:9Ag, apresentaram capacidade de modular o SI para um perfil pró-inflamatório, com aumento de moléculas de superfícies, indicando a montagem de uma resposta inflamatória de células T e aumento da produção de citocinas inflamatórias. Estes resultados indicam que essas NP, especialmente ZnO:9Ag, são potenciais alvos terapêuticos para tratar doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* spp., em especial, *L. braziliensis*. carecem de mais estudos para elucidar demais aspectos tanto do SI com essas nanoformulações quanto da relação parasito e NP.

## ABSTRACT

In recent decades, the use of nanoparticles (NP) in biomedical research has grown exponentially, especially against intracellular pathogens - such as those causing leishmaniasis - and in the modulation of immune cells. In this context, tegumentary leishmaniasis TL, transmitted by sandflies and affecting the integuments, cause an important set of clinical manifestations which has been a relevant public health problem. TL causes from single or multiple lesions in the integuments, which can impair the individual's quality of life, to disfiguring and life-threatening lesions. Every year, there are an estimated 700 thousand to 1.2 million new cases of TL and, even so, there are few studies or treatments against this pathology. In this context, the intracellular parasite *L. braziliensis* has been one of the main causes of this group of diseases. It is known that one of the main predictors of the severity of infection by parasites of the *L.* genus is the host's immune system (IS), therefore therapies aimed at its immune modulation can be used to limit and combat such diseases. The present study proposed to test pure zinc oxide NP (ZnO) or hybrid ZnO NP doped with 5%, 9% or 11% silver (Ag) (ZnO:5Ag, ZnO:9Ag and ZnO:11Ag, respectively) as to its capacity to inhibit *L. braziliensis* strains and also to observe the immunomodulatory potential of these NPs. Our findings showed that all tested NPs have selectivity to cause the death of *L. braziliensis* promastigotes when compared to RAW 264.7 cells, in addition to their ability to inhibit the growth and replication of the parasite in question. ZnO:9Ag was the NP with the best leishmanicidal potential (IC<sub>50</sub> = 7,93 µg/mL), with the ability to inhibit the growth of the parasite from the third day of treatment. Accordingly, NPs, especially ZnO:9Ag, were able to modulate the IS to a pro-inflammatory profile, with an increase in surface molecules, indicating the assembly of an inflammatory response of T cells and increased production of inflammatory cytokines. These results indicate that these NP, especially ZnO:9Ag, are potential therapeutic targets to treat diseases caused by parasites of the genus *L.*, in particular, *L. braziliensis*. Further studies are needed to elucidate other aspects of both the SI with these nanoformulations and the relationship between parasite and NP.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Manifestações clínicas da LT.

**Figura 2** - Ciclo da leishmaniose.

**Figura 3** - Diluição e solvatação das nanopartículas.

**Figura 4** – NP de ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag são capazes de inibir a proliferação das formas promastigotas de *L. braziliensis*.

**Figura 5** – Efeito das NP na expressão das moléculas CD69, anexina-V e CD73 em linfócitos T.

**Figura 6** – As NP promovem aumento na expressão de receptores de TNF- $\alpha$  em linfócitos T.

**Figura 7** – As NP impactam diferencialmente na expressão de CD210 em LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup>.

**Figura 8** – PD1 é expresso de maneira distinta em linfócitos tratados com as diferentes NP.

**Figura 9** – Efeito do tratamento de PBMCs com NP sob a produção de citocinas.

**Figura 10** – ZnO:9Ag e ZnO:11Ag aumentam a produção de NO no sobrenadante de PBMCs.



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Índice de seletividade das diferentes NP testadas em células RAW 264.7 e *L. braziliensis*.

## LISTA DE SIGLAS

TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
Ag	Prata
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
Au	Ouro
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
DIP	Departamento de Imunologia e Parasitologia
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FDA	Food and Drug Administration
IC <sub>50</sub>	50% da concentração inibitória máxima
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
JAK1	Janus quinase 1
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose tegumentar
LTCD <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Linfócitos T CD <sub>4</sub> <sup>+</sup>
LTCD <sub>8</sub> <sup>+</sup>	Linfócitos T CD <sub>8</sub> <sup>+</sup>
LV	Leishmaniose visceral
MHC I	Complexo principal de histocompatibilidade do tipo I
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade do tipo II
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear – $\kappa$ B
NK	Células natural killer
Nm	Nanometros
NO	Óxido nítrico
NP	Nanopartículas
O	Oxigênio
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PD-1	Proteína de morte celular programa 1

PFA	Paraformaldeído
Pg/ml	Picogramas por mililitro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPMI 10%	Roswell Park Memorial Institute com 10% de soro fetal bovino
Schneider 10%	Meio Schneider suplementado com 10% de SFB
SFB	Soro fetal bovino
SI	Sistema imune
STAT-3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
TC	Linfócito T citotóxico
TCreg	Linfócito T citotóxico regulatório
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
TNFR1	Receptor 1 de TNF
TNFR2	Receptor 2 de TNF
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Linfócitos T regulatório
Tyk2	Tirosina quinase 2
UFAL	Universidade Federal do Alagoas
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
ZnO	Óxido de zinco
ZnO:11Ag	Nanoformulação híbrida de ZnO com 11% de Ag
ZnO:5Ag	Nanoformulação híbrida de ZnO com 5% de Ag
ZnO:9Ag	Nanoformulação híbrida de ZnO com 9% de Ag
ZnO:Ag	Nanoformulação híbrida de óxido de zinco e prata

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
<b>2.1 Nanotecnologia</b> .....	15
<b>2.1.1 Síntese de nanopartículas</b> .....	15
<b>2.1.2 Composição das nanopartículas</b> .....	16
<b>2.1.2.1 Nanoformulações de óxido de zinco e de prata</b> .....	16
<b>2.2 O sistema imune</b> .....	18
<b>2.3 Citocinas, marcadores celulares e receptores</b> .....	20
<b>2.4 Leishmanioses</b> .....	22
<b>2.5 Leishmaniose tegumentar</b> .....	23
<b>2.5.1 Epidemiologia da leishmaniose tegumentar</b> .....	23
<b>2.5.2 Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar</b> .....	23
<b>2.5.2.1 Leishmaniose cutânea localizada (LCL)</b> .....	24
<b>2.5.2.2 Leishmaniose cutânea difusa (LCD)</b> .....	25
<b>2.5.2.3 Leishmaniose mucocutânea (LMC)</b> .....	25
<b>2.5.3 Agentes etiológicos e ciclo biológico na leishmaniose tegumentar</b> .....	25
<b>2.5.4 Imunopatologia da leishmaniose tegumentar</b> .....	27
<b>2.5.5 Tratamentos e desafios</b> .....	30
<b>2.6 Nanopartículas para tratamento de doenças parasitárias</b> .....	30
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3.1 Objetivos específicos</b> .....	32
<b>4 JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
<b>5.1 Tipo de estudo</b> .....	34
<b>5.2 Cultivo de células</b> .....	34
<b>5.2.1 Cultivo de RAW 264.7</b> .....	34
<b>5.2.2 Cultivo de <i>Leishmania braziliensis</i></b> .....	34
<b>5.3 Preparação das nanopartículas</b> .....	35
<b>5.3.1 Obtenção das nanopartículas</b> .....	35

5.3.2 Diluição e solvatação .....	35
5.4 Ensaio de viabilidade com resazurina e estabelecimento da CC50 e IC50 ....	36
5.5 Curva de crescimento de <i>Leishmania braziliensis</i> .....	37
5.6 Obtenção e tratamento de PBMCs .....	38
5.7 Citometria de fluxo .....	38
5.8 Dosagem de citocinas e óxido nítrico .....	39
5.9 Análises estatísticas .....	41
6 RESULTADOS .....	42
6.1 As nanopartículas de óxido de zinco dopadas com prata demonstraram bom índice de seletividade para a <i>Leishmania brasiliensis</i> .....	42
6.2 As nanopartículas de ZnO, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag apresentaram potencial de reduzir a proliferação de promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i> .....	43
6.3 Avaliação de moléculas de superfície em linfócitos T .....	44
6.3.1 NPs são capazes de ativar LTCD4+ e LTCD8+ e induzir baixos níveis citotóxicos nas menores concentrações .....	44
6.3.2 As nanopartículas de ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag mostraram-se como potentes indutoras da expressão de TNFR1 e TNFR2 .....	47
6.3.3 LTCD4+ e LTCD8+ expressando CD210 quando tratados com ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag .....	48
6.3.4 LTCD4+ e LTCD8+ expressando PD1 quando tratados com ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag .....	49
6.4 As nanopartículas de ZnO dopadas com Ag induzem um perfil de secreção de citocinas pró-inflamatórias em PBMCs .....	50
6.5 Quantificação de óxido nítrico no sobrenadante de culturas de PBMCs tratadas com nanopartículas .....	52
7 DISCUSSÃO .....	54
8 CONCLUSÃO .....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de NP nas terapias e pesquisas biomédicas vem crescendo exponencialmente nas últimas décadas, especialmente em virtude de suas propriedades biológicas como biossensores, transportadores de drogas, atividades antitumorais e propriedades antimicrobianas (KHAN; MUSARRAT; AL-KHEDHAIRY, 2016; KHAN; SAEED; KHAN, 2019). O sucesso do uso desses compostos depende de estudos acerca da síntese, composição e montagem dessas NP (DREXLER, 2006; KHAN; SAEED; KHAN, 2019; DO CARMO NETO *et al.*, 2021).

Ademais, as NP metálicas – como de ZnO e Ag e as nanoformulações híbridas de ZnO e Ag (ZnO:Ag) – vem sendo cada dia mais utilizadas no campo biomédico como agentes antimicrobianos, antitumorais e imunomoduladoras além de serem consideradas como seguras para uso pela *Food and Drug Administration* (FDA) (MISHRA *et al.*, 2017; KHAN; SAEED; KHAN, 2019; USFDA, 2020).

Além disso, é sabido que o SI é um conjunto tecidos, órgãos e células cuja função é proteger o organismo de danos causados por substâncias patogênicas, incluindo os microrganismos (CSABA, 2019). Para a eliminação de patógenos intracelulares – como são os agentes causadores das leishmanioses – o organismo orchestra um conjunto de respostas imunes inatas e adaptativas para destruir o agente agressor e restaurar a homeostase (YATIM; LAKKIS, 2015).

Dentro desse contexto, as leishmanioses são doenças negligenciadas causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania spp.* que são transmitidos pelas fêmeas dos flebotomíneos e apresentam a capacidade de romper essa homeostase do hospedeiro. [RUIZ-POSTIGO *et al.*, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2021]. Estimativas indicam que, por ano, o número de novos casos de LT variam de 0,7 a 1,2 milhão, o que denota a doença como um importante problema de saúde pública sendo que o Brasil é um dos 8 países com maior prevalência de casos de leishmaniose e a *L. braziliensis* é a espécie prevalente nesses doentes [DE OLIVEIRA; BRODSKY, 2012; SCOTT; NOVAIS, 2016; ANVERSA *et al.*, 2018; CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2020].

Já é sabido que a LT se configura como uma importante patologia no qual os tegumentos são atingidos e podem causar desde lesões localizadas até formas generalizadas ocasionando problemas que vão desde o prejuízo nas relações sociais até lesões com risco de vida ao hospedeiro (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012; ARENAS *et al.*, 2017; ANVERSA *et al.*, 2018).

Ademais, os problemas relacionados à LT se estendem aos tratamentos. Dentre os medicamentos preconizados para tratar a LT estão os antimoniais pentavalentes, estibogluconato de sódio, antimoniato de N-metilglucamina e desoxicolato de Anfotericina B (BRASIL, 2017; ANVERSA *et al.*, 2018). Todavia, o uso dessas medicações está associado à alta toxicidade, muitos efeitos colaterais e elevado custo, além da necessidade de avaliação individualizada dos pacientes para avaliar aspectos relacionados aos sintomas clínicos, fatores genéticos e imunes do hospedeiro bem como as características do parasito para estabelecer um possível tratamento (BRASIL, 2017; ANVERSA *et al.*, 2018). Devido à estas dificuldades, muitos pacientes optam por descontinuar o tratamento fazendo com que as lesões persistam e que surjam parasitos resistentes às drogas disponíveis no mercado (ANVERSA *et al.*, 2018).

Tudo isso, somado às dificuldades de estratégias para a prevenção e tratamento das leishmanioses, é de suma importância estabelecer novas propostas terapêuticas para tratamento das LT e as NP híbridas de ZnO e Ag são candidatos promissores.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Nanotecnologia

O conceito de nanotecnologia surgiu em 1959 com o físico, americano e ganhador do Prêmio Nobel de física, Richard Feynman que é entendida como o uso de tecnologias em nanoescala (1 a 100 nm) objetivando modular materiais quanto a sua composição, forma e tamanho para atingir os objetivos propostos [NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE (NNI), 2014; BAYDA *et al.*, 2020; USFDA, 2020].

As NP são muito estudadas por possuírem diversas vantagens quando comparadas às demais alternativas presentes no mercado. Entre essas vantagens, estão: baixo custo, estabilidade, possibilidade de armazenamento a longo prazo e também capacidade de suportar condições adversas como as variações de temperaturas (KHAN; MUSARRAT; AL-KHEDHAIRY, 2016).

É notório que a ciência vem avançando para fazer com que os anseios da humanidade sejam cada dia mais atendidos. Dentro deste contexto, a nanociência tomou grandes proporções desde o início do século XXI fazendo com que a nanotecnologia ficasse cada vez mais presente no dia a dia do ser humano nos mais diversos âmbitos: química, física, biologia, engenharia e, especialmente, no campo biomédico (KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

Um ponto importante dessas NP é que muitas delas tem seu uso definido como seguro pela FDA, o que colabora para que sejam cada vez mais implementadas nas ciências biomedicina e no desenvolvimento de novas terapias, já que apresentam propriedades biológicas importantes como a capacidade de atuar como biossensores, transportadores de drogas, atividades antitumorais, propriedades antimicrobianas e diversos outros aspectos que são amplamente revisados na literatura (KHAN; MUSARRAT; AL-KHEDHAIRY, 2016; USFDA, 2020).

#### 2.1.1 Síntese de nanopartículas

De modo geral, existem dois principais modos de produção de NP *Bottom-up* e *Top-down* (DREXLER, 2006). *Top-down* consiste na quebra de um determinado material por meio de diferentes técnicas como foto ablação, deposição de vapor



químico, deposição de vapor físico e outras técnicas de decomposição, até que o material atinja o tamanho e a forma desejada (KHAN; SAEED; KHAN, 2019; DO CARMO NETO *et al.*, 2021). *Bottom-up* utiliza o fluxo inverso, em que átomo por átomo são juntados de forma ordenada por meio de interações físico-químicas que podem ser gerenciadas por meio de técnicas como a redução ou oxidação, síntese verde (a partir de fontes biológicas), bioquímica, coprecipitação, sólido-gel entre outras (BAYDA *et al.*, 2020).

Além disso, é sabido que diferentes partículas reagem de maneira distintas em diferentes organismos, sendo que a forma e tamanho destas são de suma importância para ditar suas diferenças (BARANOV, *et al.*, 2021). Dessa forma, NP com composições parecidas, mas com formas e/ou tamanhos diferentes, também podem apresentar diferenças quanto sua resposta no organismo, especialmente no que diz respeito ao SI (SUN, *et al.*, 2013). Um exemplo disso é que NP de hidroxiapatita em formato de agulha apresentam toxicidade mais elevada quando comparado a NP do mesmo material, mas em formato esférico (LEBRE, *et al.*, 2017). Essa toxicidade aumentada está associada à formação de perfurações em organelas celulares, ocorrendo o extravasamento destas ao citoplasma e causando danos às células em questão (LEBRE, *et al.*, 2017).

### **2.1.2 Composição das nanopartículas**

As NP são partículas em escala nanométrica que podem assumir diferentes formas, tamanhos e composições dependendo do que se objetiva com seu uso. Algumas classes de NP são mais bem estudadas, dentre elas estão as NP baseadas em carbono (KHAN; MUSARRAT; AL-KHEDHAIRY, 2016), NP de cerâmica (THOMAS *et al.*, 2015), NP poliméricas (ABOUELMAGD *et al.*, 2016) e NP baseadas em lipídeos (KHAN; SAEED; KHAN, 2019). No decorrer dos anos, as NP metálicas e as de óxidos metálicos vem, cada vez mais, tomando espaço nas pesquisas biomédicas.

#### **2.1.2.1 Nanoformulações de óxido de zinco e de prata**

As NP metálicas e NP de óxidos metálicos são aquelas elaboradas a partir de precursores metálicos ou com metais e oxigênio (O) e compõem importantes materiais de ponta devido às suas propriedades ópticas e biológicas, ganhando espaço nas pesquisas biomédicas por suas propriedades antitumorais, antimicrobianas e imunomoduladoras (KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

Uma NP muito estudada na atualidade é a de ZnO devido às suas propriedades biológicas, especialmente, como agente antimicrobiano além de apresentar alta segurança em sua administração, conforme descrito pelo FDA (JIN, et al., 2009; (MISHRA et al., 2017; NAZIR, et al., 2019; USFDA, 2020). Ensaio de citotoxicidade celular corroboram com esses dados pois mostraram a eficácia de NP de ZnO na destruição de patógenos em uma dose inferior àquela necessária para causar danos nas células saudáveis (NAZIR, et al., 2019). Pesquisas indicam que o mecanismo de ação dessas NP é devido a liberação de íons de zinco no meio intracelular induzindo a geração de ROS, que, por sua vez, ocasionam a morte de microrganismos fagocitados pelas células imunes (ESPITIA, et al., 2012).

Uma importante variável que deve ser analisada na utilização das NP é a escolha do método de produção desses materiais. A metodologia escolhida deve ser pensada de acordo com a finalidade de desejada, visto que diferentes processos de síntese produzem diferentes NP, que, por sua vez, podem possuir diferentes formas e tamanhos com ações biológicas distintas (MISHRA et al., 2017; KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

Além do zinco, a prata (Ag) também é muito utilizada na produção de NP. Suas aplicações são amplas e, assim como as NP de ZnO, também apresentam importantes atividades antimicrobianas (ZHANG et al., 2016; ULAETO, et al., 2020). Ademais, Hamed e colaboradores (2017) elaboraram um estudo que trouxe dados importante sobre a segurança de NP de Ag, com resultados apontando para um bom índice de seletividade de modo que são capazes de combater patógenos e, ao mesmo tempo, não causar danos às células saudáveis (HAMED, et al., 2017).

Nessa direção, alguns estudos testaram a dopagem NP de ZnO com diferentes quantidades de NP de Ag, formando uma nanoformulação híbrida de ZnO:Ag e demonstraram resultados promissores, destacando sua eficácia como agente bactericida (FONSECA et al., 2019), leishmanicida (NADHMAN et al., 2016) e, até mesmo, como protetores de radiação ultravioleta (ABADI et al., 2018).

## 2.2 O sistema Imune

O SI configura-se como uma rede complexa e interligada que tem como papel principal proteger o organismo de agentes patogênicos (como bactérias, fungos e protozoários), e também de células próprias que podem ser possivelmente danosas ao hospedeiro (cânceres), objetivando manter a homeostase do organismo (CSABA, 2019; LICHTMAN, 2015).

Os fagócitos (macrófagos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas) são importantes células do SI inato que atuam fagocitando agentes invasores e usando de mecanismos como espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) para destruí-los através dos estímulos gerados pelos próprios corpos estranhos, e também por estímulos provenientes de outras células, como o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (LICHTMAN, 2015; YATIM; LAKKIS, 2015). Todavia, alguns patógenos desenvolveram estratégias para evadir desses mecanismos de defesa e usar a maquinaria do hospedeiro para dar continuidade ao seu ciclo (YATIM; LAKKIS, 2015). A exemplo disso, observa-se que as espécies *Leishmania spp.* são capazes de escapar do fagolisossomo dos macrófagos e modular o SI ao seu favor para favorecer sua replicação (LICHTMAN, 2015; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

Os linfócitos são células do SI adaptativo e apresentam capacidade de reconhecer uma ampla gama de antígenos e responder a eles de maneira específica (LICHTMAN, 2015). Estes são divididos em dois grandes grupos: linfócitos B e linfócitos T, que compartilham a mesma linhagem hematopoiética, linfoide, mas exercem funções distintas com receptores para antígenos estruturalmente e morfologicamente diferentes (LICHTMAN, 2015).

Os linfócitos B são responsáveis pela imunidade humoral e apresentam anticorpos em sua superfície que reconhecem uma imensa variedade de epítopos antigênicos (LEBIEN; TEDDER, 2008). Quando essas células se ligam ao seu antígeno equivalente, estas são ativadas, diferenciando-se em plasmócitos e passam a secretar anticorpos que opsonizam o antígeno facilitando sua eliminação através do estímulo de diferentes frentes imunes (LEBIEN; TEDDER, 2008). Quando essas células são caracterizadas por métodos laboratoriais, geralmente, é usado a marcação de moléculas de superfície como CD20 (LEBIEN; TEDDER, 2008).

Já os linfócitos T participam da imunidade celular e apresentam a capacidade de se diferenciar em perfis de resposta distintos, que orquestram respostas diferentes dependendo do estímulo (ROMAGNANI, 1999; BRETSCHER, 2019). Os linfócitos T *helper* (Th) são um conjunto de células T que expressam em sua superfície a molécula CD4 e, também, podem ser chamados de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (LTCD4<sup>+</sup>) e apresentam capacidade de diferenciarem-se em perfis de resposta distintos dependendo da proteína antigênica que foi apresentada pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) do tipo II (MHC II) das células apresentadoras de antígenos (APCs) (ROMAGNANI, 1999; BRETSCHER, 2019). Esses perfis de respostas envolvem interleucinas (ILs) que modulam o SI para que ele reaja de maneira adequada aos patógenos e para que a homeostase seja reestabelecida e mantida.

O perfil Th1 é direcionado pela IL-12 e pelo IFN- $\gamma$  que, após o reconhecimento do epítipo antigênico, atua diferenciando células T *naive* para este perfil e tornam o processo de fagocitose e destruição de antígenos intracelulares mais eficiente (ROMAGNANI, 1999; BRETSCHER, 2019). Já os linfócitos do perfil Th2 são induzidos pela IL-4 e secretam especialmente IL-4, IL-5 e IL-13, que atuam na defesa contra helmintos, reações alérgicas e reparo tecidual através da ativação da resposta imune humoral, mastócitos, eosinófilos basófilos, macrófagos do perfil alternativo, entre outros mecanismos imunes (NAKAYAMA et al., 2017; BRETSCHER, 2019). No que diz respeito ao perfil Th17, a IL-17, IL-22, IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) atuam promovendo respostas imunes contra bactérias e fungos extracelulares, mas também compactuam para o surgimento de doenças autoimunes em decorrência da inflamação gerada (LUCKHEERAM et al., 2012). As células T do perfil regulatório (Treg) secretam, principalmente, a IL-10 que atua no fino equilíbrio imunológico com a finalidade de conter respostas inflamatórias exacerbadas e garantir que o organismo retorne a homeostase após o processo inflamatório (BLUESTONE, 2011). Além desses perfis que já foram extensamente elucidados, existem outros perfis – como Th9 e Th22 - que ainda não são amplamente compreendidos, mas sabe-se que exercem papel importante na patogenia de diversas doenças (SAIGUSA et al., 2020).

Na superfície dos linfócitos T citotóxicos (TCs) está presente a molécula CD8 que faz com eles também sejam chamados de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (LTCD8<sup>+</sup>), constituindo uma parte essencial do SI adaptativo, sendo ativados por antígenos apresentados através do complexo principal de histocompatibilidade do tipo I (MHC I)

(LICHTMAN, 2015). Os LTCD8<sup>+</sup> também apresentam perfis de resposta similares aos TCD4<sup>+</sup> sendo que, os mais amplamente descritos e conhecidos são denominados TC1, TC2, TC17 e TC regulatório (TCreg) (SHRIKANT et al., 2010). Dentro desse contexto, é sabido que os TC1 é o perfil mais estudado e estabelecido de todos os subgrupos e atua com efeito citotóxico direto nas células doentes causando a morte destas, constituindo um mecanismo do SI para controlar infecções intracelulares e matar células com características tumorais (SHRIKANT et al., 2010; LICHTMAN, 2015).

### **2.3 Citocinas, marcadores celulares e receptores**

O SI modula os perfis de resposta imune de maneira fina, com predomínio de uma em relação a outra dependendo do antígeno que o organismo está respondendo. Mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios estão sempre presentes para fazer essa modulação e são produzidos por uma variedade de células que tem capacidade de regular outras através dos mais diversos mecanismos, em especial, os que envolvem citocinas e receptores (LICHTMAN, 2015).

A IL-10 é uma importante citocina secretada por uma ampla gama de leucócitos – como linfócitos, monócitos e células dendríticas - e apresenta multifuncionalidades dependendo do contexto que está inserida. Seu papel mais estudado é o anti-inflamatório através da ligação com seu receptor CD210 (também conhecido como IL-10R) que promove a ativação de Janus quinase 1 (JAK1) e tirosina quinase 2 (Tyk2), que induzem a fosforilação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT-3) e a ativação de genes alvo que levam, finalmente, à expressão de efetores anti-inflamatórios (ZHU et al., 2017). Sua produção adequada está relacionada ao controle da resposta inflamatória trazendo benefícios ao organismo - como demonstrado em doenças inflamatórias intestinais, tendo como exemplo a colite ulcerosa (TATIYA-APHIRADEE; CHATUPHONPRASERT; JARUKAMJORN, 2019). Ademais, sua deficiência está associada aos processos inflamatórios crônicos (SUN et al., 2018) que, conforme revisado por Glocker e colaboradores em 2012, há estudos recentes mostrando que doenças inflamatórias intestinais podem ter origem em decorrência de mutações na IL-10 ou em seu receptor que levam à perda da função dessa citocina causando enterocolite intratável grave em bebês e crianças pequenas. Todavia, sua

produção excessiva é, também, um problema. Níveis elevados de IL-10 estão correlacionados com uma resposta ineficaz para eliminação de patógenos pela acentuada imunossupressão e exaustão de células T fazendo com que as defesas imunes não sejam adequadas para combater patógenos promovendo o estabelecimento de infecções crônicas (BLACKBURN; WHERRY, 2007). Um exemplo clássico dessa ação nociva do excesso de IL-10 no organismo é observada na LV, causada por *L. infantum*, em que a produção exacerbada e descontinuada dessa citocina leva a inibição dos mecanismos efetores responsáveis pela destruição do parasito, bem como, exaustão de linfócitos T que fazem com que ocorra a sobrevivência, crescimento do parasito e progressão da doença (TOEPP; PETERSEN, 2020).

O TNF- $\alpha$  é uma importante citocina inflamatória capaz de modular o SI através da ligação e ativação de dois receptores distintos: o receptor 1 de TNF (TNFR1) e o receptor 2 de TNF (TNFR2), sendo que ambos estão relacionados com o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que promove a sobrevivência e proliferação celular (IDRISS; NAISMITH, 2000; JAROSZ-GRIFFITHS et al., 2019). No entanto, o TNFR1 também é capaz de iniciar vias de morte celular que promovem a apoptose e necroptose, dependendo do estado metabólico da célula (IDRISS; NAISMITH, 2000; JAROSZ-GRIFFITHS et al., 2019). Apesar de essencial nas repostas imunes contra diversos antígenos - como patógenos e células tumorais - a sinalização ou ativação descontrolada ocasionada por TNF- $\alpha$  estão ligadas à um aumento da atividade inflamatória que se correlaciona ao surgimento e seguimento de doenças e distúrbios relacionados a processos inflamatórios aberrantes (IDRISS; NAISMITH, 2000; JAROSZ-GRIFFITHS et al., 2019).

A molécula de ativação CD69 é uma proteína de membrana presente em linfócitos e é descrita na literatura como um marcador clássico de ativação dessas células por sua expressão na superfície se dar logo após o estímulo (CIBRIÁN; SÁNCHEZ-MADRID, 2017). O papel exato da molécula de CD69 nas células ativadas ainda não é bem elucidado, mas, evidências experimentais acumuladas sugerem que essa proteína pode determinar padrões de liberação de citocinas, *homing*, proliferação, ativação e migração de linfócitos (CIBRIÁN; SÁNCHEZ-MADRID, 2017). A enzima CD73 está presente na superfície das células e apresenta funções específicas dependendo do contexto que está inserida, sendo que, em células T

ativadas, fornece sinais de proliferação e influencia na migração dessas células (RESTA; THOMPSON, 1997).

A proteína de morte celular programada 1 (PD1) atua como uma molécula de membrana superficial que age como inibidor da resposta imune inflamatória e se configura como um bom marcador de exaustão celular (YI et al., 2018). Quando essa molécula é ativada por seu ligante, as vias de sinalização, ativação, proliferação e diferenciação dos linfócitos T são inibidas (YI et al., 2018). Apesar de ser uma via indispensável para manter a tolerância imunológica e diminuir o dano tecidual causado por mediadores inflamatórios excessivos, sua expressão desequilibrada está associada a infecções por agentes infecciosos intracelulares e progressão de células tumorais (YI et al., 2018).

A apoptose, ou morte celular programada, é um mecanismo envolvido em inúmeros processos biológicos normais e patogênicos (NIU; CHEN, 2010). As células saudáveis apresentam uma simetria de moléculas – em especial, os fosfolípídios – que se apresentam, de forma ordenada, no interior e exterior da membrana plasmática, sendo a fosfatidilserina uma dessas moléculas que é expressa na face interna da membrana plasmática em células saudáveis (VAN ENGELAND et al., 1998; NIU; CHEN, 2010). Quando a célula tem os mecanismos de morte ativados, ocorre a ativação de caspases que modulam a maquinaria celular e a fosfatidilserina é exposta para o meio extracelular fazendo com que as células imunes reconheçam que essas células como alvo para eliminação (VAN ENGELAND et al., 1998). Assim, a anexina-V (marcada com fluoróforo) é usada nas pesquisas biomédicas para avaliar a taxa de apoptose, uma vez que apresenta capacidade de se ligar às moléculas de fosfatidilserina expostas no meio extracelular das membranas plasmáticas (VAN ENGELAND et al., 1998).

## **2.4 Leishmanioses**

As leishmanioses consistem em um conjunto de doenças negligenciadas causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania spp.*, os quais são transmitidos ao hospedeiro vertebrado através do repasto sanguíneo de fêmeas infectadas dos flebotomíneos no momento do repasto sanguíneo, levando a contaminação do indivíduo (WHO, 2021). Existem duas principais formas de

leishmaniose: a LV e LT. A ocorrência destas doenças está intimamente relacionada a diferentes fatores, tais como localidade, pobreza, deslocamentos constantes e SI desregulado. Salienta ainda que, a falta de recursos financeiros também contribui para o surgimento e evolução clínica do doente, visto que, em muitos casos, não tem o tratamento adequado acessível nos postos de saúde, acarretando um problema de saúde pública (WHO, 2021).

## **2.5 Leishmaniose Tegumentar**

### **2.5.1 Epidemiologia da leishmaniose tegumentar**

As leishmanioses apresentam distribuição global, presentes em cerca de 89 países, sendo consideradas endêmicas em regiões tropicais e subtropicais, abrangendo partes da Ásia, África, Américas e Mediterrâneo (REITHINGER et al., 2007); (ARENAS et al., 2017). Estimativas indicam que, por ano, o número de novos casos de LT variam de 0,7 a 1,2 milhão, e cerca de um terço dos casos de LT ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo e oeste da Ásia (ANVERSA et al., 2018; CDC, 2020).

Ainda assim, no Brasil, em 2019, foram confirmados mais de 15 mil novos casos de LT com predominância em adultos jovens na região Norte. Portanto, essa doença deve ser tratada como um problema de saúde pública de alta magnitude, atingindo, principalmente, populações de baixa renda, com más condições de moradia e com deficiências imunológicas e nutricionais (LISBOA et al., 2021). Suas manifestações clínicas constituem um quadro de alta morbidade, mas baixa mortalidade, fazendo com que, muitas vezes, a doença seja minimizada. No entanto, a população atingida não tratada adequadamente sofrem do estigma social decorrente das deformidades e cicatrizes desfigurantes (LISBOA et al., 2021).

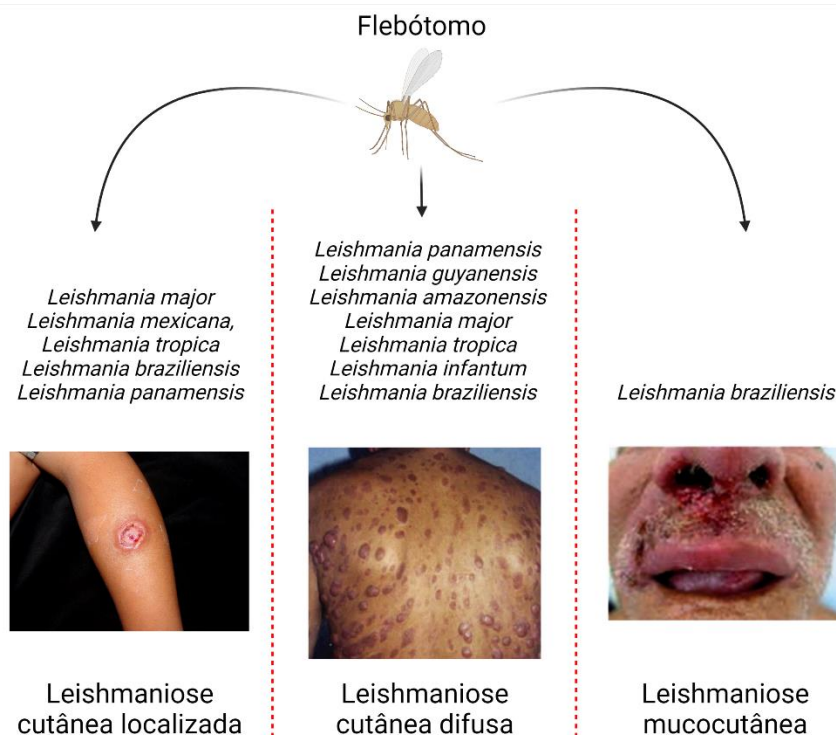
### **2.5.2 Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar**

A LT é dita como o grupo de doenças que abrangem as lesões causadas por parasitas do gênero *Leishmania* spp. que acometem os tegumentos, ou seja, a pele e as mucosas do indivíduo (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012). As manifestações



clínicas da LT e seus aspectos fisiopatológicos podem ser divididos em grupos de doenças, dependendo do agente etiológico (Figura 1).

**Figura 1 – Manifestações clínicas da LT.**



**Fonte:** adaptado de ARENAS et al., 2017.

Manifestações clínicas da leishmaniose e as principais espécies de *L.* que as causam.

### 2.5.2.1 Leishmaniose cutânea localizada (LCL)

A LCL é a forma prevalente da LT caracterizada por lesões ulcerativas indolores, sendo que a quantidade e tamanho das lesões podem variar de indivíduo para indivíduo. Muitos apresentam regressão e cura das lesões em um período de 2 a 15 meses dependendo da espécie de *L.*, mas outros podem apresentar lesões persistentes, de difícil cicatrização e, até mesmo, infecções secundárias em decorrência da úlcera formada, além da existência de possíveis cicatrizes (REITHINGER *et al.*, 2007). As principais espécies causadoras da doença são: *L. major*, *L. mexicana*, *L. tropica*, *L. braziliensis* e *L. panamensis* (REITHINGER *et al.*, 2007).

### **2.5.2.2 Leishmaniose cutânea difusa (LCD)**

Por outro lado, a LCD é representada por lesões nodulares não ulcerativas que se espalham por todo o corpo do indivíduo após o inóculo do parasito. Tais nódulos podem ser formados pela infecção por *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. major*, *L. tropica*, *L. infantum*, sendo que *L. braziliensis* é a espécie mais associada a essa manifestação clínica sem resolução espontânea e de difícil tratamento (REITHINGER et al., 2007).

### **2.5.2.3 Leishmaniose mucocutânea (LMC)**

Por fim, há a LMC, considerada a forma mais grave da LT, causada, especialmente, por *L. braziliensis*. Esta caracteriza-se por lesões desfigurantes nas mucosas orais e nasais, e apresentam risco de vida para o doente (REITHINGER et al., 2007). Nesses casos, o parasita passa por disseminação linfática ou hematogênica, resultando em uma exacerbada inflamação dos tecidos. E ainda, não apresenta cura espontânea e está associada a infecções bacterianas secundárias graves (REITHINGER et al., 2007).

### **2.5.3 Agentes etiológicos e ciclo biológico na leishmaniose tegumentar**

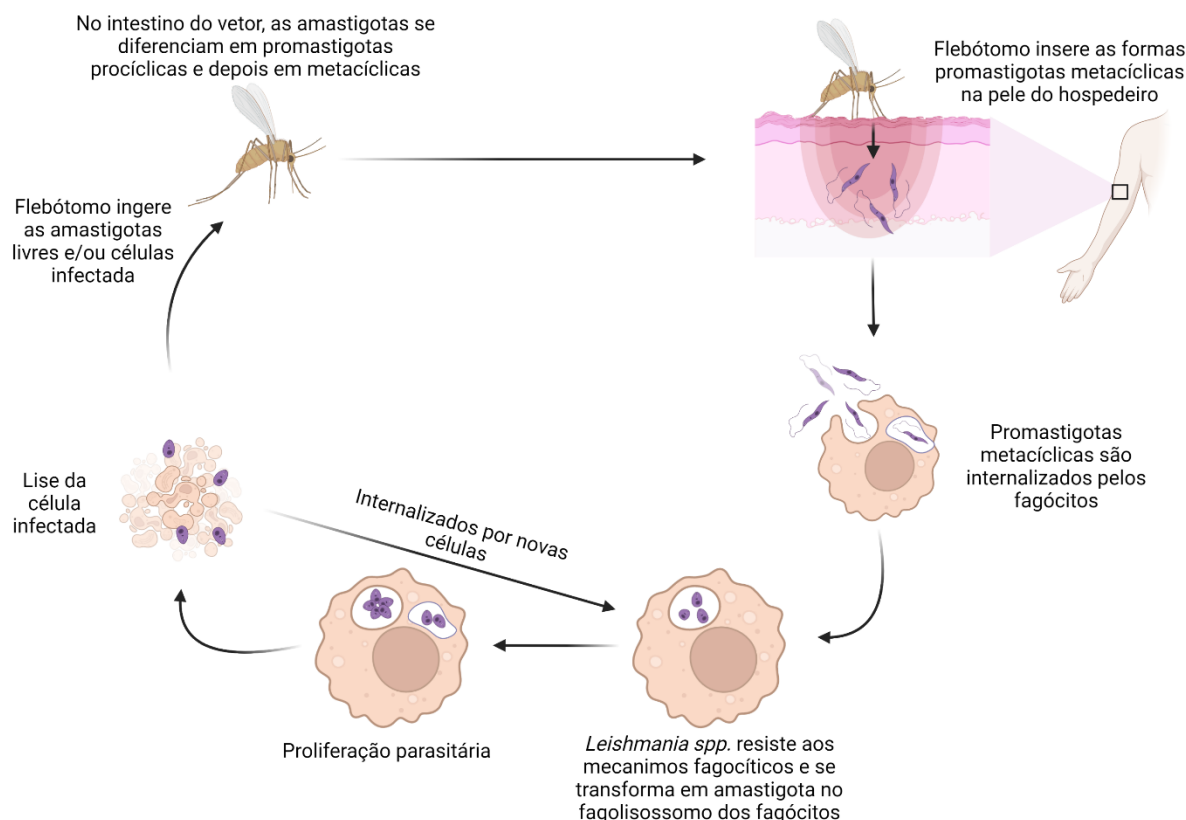
A espécie do agente etiológico causador das leishmanioses pode ser diferente de acordo com a região observada. No Velho Mundo (Ásia, África e mediterrâneo), as principais espécies de parasitos causadores de doenças em humanos são *L. major*, *L. tropica*, e *L. aethiopica*, as quais são transmitidas por flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* (ARENAS et al., 2017; ANVERSA et al., 2018). Já no Novo Mundo (Américas), as principais espécies são *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* e são transmitidas por flebótomos do gênero *Lutzomyia* (ANVERSA et al., 2018; ARENAS et al., 2017). A *L. braziliensis* é a espécie predominante nas regiões do Brasil, onde a LT é endêmica e se configura como um importante patógeno a ser estudado por causar diferentes manifestações clínicas dependendo do SI do hospedeiro (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012).

O ciclo se inicia quando as fêmeas dos flebotomíneos realizarem o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado contaminado com *Leishmania spp.* O aparelho bucal da fêmea dos flebotomos é relativamente curto e rígido; e ocasionam pequenas dilacerações nos tecidos e vasos sanguíneos do hospedeiro, formando um pequeno poço de sangue no qual ela se alimenta (PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012). Nesse momento, se o hospedeiro estiver contaminado, serão ingeridas formas parasitárias esféricas, ovais e imóveis - denominadas amastigotas - presentes no sangue, linfa intersticial e interior dos fagócitos que irão para o intestino do vetor (BATES; ROGERS, 2005; ANVERSA et al., 2018). Neste local, os parasitos passam por uma série de modificações e se transformam, respectivamente, nas formas promastigotas procíclicas, promastigotas nectomonas, promastigotas paramastigotas, promastigotas haptomonas até que, por fim, atingem a forma final infectante, promastigotas metacíclicas, que serão ejetadas junto a saliva em novo hospedeiro vertebrado no momento que o inseto realizar o novo repasto sanguíneo (BATES; ROGERS, 2005; PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012; ANVERSA et al., 2018).

No hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas são, primeiramente, internalizadas pelos fagócitos e se diferenciam em amastigotas (KAYE; SCOTT, 2011). Todavia, esses protozoários desenvolveram mecanismos de evasão para burlar as respostas imunológicas do hospedeiro e, assim, transformam os fagócitos em reservatórios hostis para sua sobrevivência, desenvolvimento e replicação. Para isso, duas das moléculas usadas pelo parasita, por exemplo, lipofosfoglicano (LPG) e a metaloprotease GP63, são capazes de clivar as proteínas para controlar o ambiente do fagolisossomo e fatores de transcrição para reduzir a ação microbicida dessas células (KAYE; SCOTT, 2011).

Depois que as amastigotas se estabelecem nos fagócitos, estas replicam-se no interior das células até romper o compartimento celular e, posteriormente, amastigotas ficam livres no meio extracelular para serem fagocitadas por outras células e continuar o ciclo biológico do parasito (KAYE; SCOTT, 2011).

**Figura 2 - Ciclo da leishmaniose.**



**Fonte:** da autora, 2021. Produzido via BioRender.

No momento em que a fêmea do flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo, esta regurgita as formas móveis do parasito, denominadas promastigotas metacíclicas, pelo seu aparelho bucal. Nesse momento, há um processo inflamatório local, com o recrutamento de células imunes inatas que realizarão a fagocitose do parasito. Todavia, esses microrganismos do gênero *Leishmania spp.* apresentam a capacidade sobreviver aos mecanismos da fagocitose e encontram nessas células imunes um ambiente favorável para sua sobrevivência. O patógeno sofre uma série de modificações, perde o flagelo, e se diferencia na forma oval, denominada amastigota, o qual prolifera-se no interior dessas células até que a célula é lisada e os parasitos liberados para o meio extracelular para infectar outras células. O ciclo é continuado quando uma fêmea do flebótomo ingere essas formas amastigotas ou os fagócitos contendo essas formas. No intestino do vetor, as amastigotas encontram um ambiente adequado para se diferenciar em promastigota procíclica e, posteriormente, em promastigota metacíclica, que é a forma infectante do parasito.

#### 2.5.4 Imunopatologia da leishmaniose tegumentar

O controle de parasitos intracelulares pelo SI exige, de maneira geral, mecanismos celulares que potencializem o efeito de células imunes inatas (LICHTMAN, 2015). Isso ocorre por uma resposta imune adaptativa celular que, por sua vez, é estimulada quando células do SI inato reconhecem os patógenos intracelulares (como *Leishmania spp.*) e passam a produzir citocinas como IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que favorecem a diferenciação de LTCD4<sup>+</sup> no perfil Th1 (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013). Esses, por sua vez, produzem mais dessas citocinas

que, além de continuarem a via de retroalimentação positiva, estimulam as células fagocíticas – como os macrófagos – a potencializarem seus mecanismos de fagocitose e digestão através da indução de NO e ROS, com a finalidade de promover a destruição de patógenos (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013). Ainda assim, citocinas relacionadas ao perfil de resposta Th2 trabalham na direção contrária, seja estimulando mecanismos diferentes e/ou atuando como regulatórias, no intuito de impedir que os mecanismos de destruição fujam do controle e passem a destruir células saudáveis, que pode acarretar dano tecidual (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013). Esse perfil de resposta está associado à produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e a inibição dos mecanismos fagocíticos. Logo, favorece a persistência do parasito no hospedeiro (ANVERSA et al., 2018; BARBOSA et al., 2019). Além disso, o perfil Th17 tem sido cada vez mais explorado no contexto da fisiopatologia das leishmanioses, visto que contribui para a persistência da inflamação e dano tecidual (ANVERSA et al., 2018).

Contudo, as respostas pró e anti-inflamatória precisam atuar juntas para controlar a disseminação parasitária e, ao mesmo tempo, prevenir o processo de lesão tecidual pela dicotomia Th1/Th2 regulada (ANVERSA et al., 2018). No entanto, somente esse paralelo das respostas imunes adaptativas não é conclusiva para explicar a resistência ou suscetibilidade à doença em humanos, que pode ser fortemente influenciada por fatores como desnutrição, supressão imunológica e, inevitavelmente, os componentes genéticos do hospedeiro (ANVERSA et al., 2018). Conforme revisado por Kaye e Scott (2011), a IL-10 configura-se como uma importante citocina para regular esse processo e modular o SI, permitindo que a resposta seja robusta o suficiente para promover o controle do parasito, mas não excessiva para evitar danos lesivos aos tecidos do hospedeiro. Todavia, a IL-10 também pode ser prejudicial ao hospedeiro no controle da infecção por parasitos do gênero *Leishmania spp.*, pois apresenta capacidade de suprimir a apresentação de antígenos, bem como a ativação de mecanismos efetores para destruição do patógeno, como a produção de NO, o que pode levar ao estabelecimento da infecção por meio da persistência do parasito no organismo (AGYINGI et al., 2020).

As manifestações clínicas mais graves da LT – LCD e LMC – estão correlacionadas com dois aspectos extremos da resposta imune e, em ambas, pode-se dizer que as repostas imunes celulares e adaptativas estão intimamente correlacionados a estes quadros clínicos (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Na LMC, o parasito consegue disseminar para a mucosa da nasofaringe e o organismo pode responder orquestrando um perfil de resposta extremamente inflamatório e agressivo para tentar controlar aquela disseminação parasitária, característico da LMC (SCOTT; NOVAIS, 2016). O resultado é uma alta produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , ROS, NO e alta atividade de LTCD8<sup>+</sup> (SCOTT; NOVAIS, 2016). Em contrapartida, há baixos níveis de células regulatórias, bem como drástica diminuição de IL-10, IL-4, IL-5 e células do perfil Th2 que remete a uma baixa carga parasitária no local da lesão, mas com extenso dano tecidual gerado pelos excessivos mediadores inflamatórios das células que reagem, exageradamente, aos produtos do parasito, causando as lesões desfigurantes (SCOTT; NOVAIS, 2016).

No entanto, pacientes com LCD apresentam uma resposta voltada para o outro extremo. Há uma precária resposta do perfil de resposta Th1 – e conseqüentemente, baixa produção de citocinas inflamatórias – e pouca atividade de LTCD8<sup>+</sup>, que faz com que as células não consigam responder com os mecanismos adequados para controlar a replicação parasitária (SCOTT; NOVAIS, 2016). Esse quadro está relacionado com uma alta produção de IL-4 e IL-10 que modulam negativamente os mecanismos efetores da fagocitose que são essenciais para destruição dos parasitos em questão e há uma alta produção de mediadores da resposta imune humoral que não são eficientes para bloquear a infecção de novas células (SCOTT; NOVAIS, 2016). O resultado é a disseminação linfática e/ou hematogênica dos parasitos para diversos locais do corpo, formando nódulos lotados de parasitos (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Ainda assim, há pacientes infectados que desenvolvem a LC ou são assintomáticos, os quais estão no centro do espectro com um perfil mais regulado do SI. Estes respondem melhor aos tratamentos (quando necessário) e, quando as lesões surgem, elas estão relacionadas com uma resposta inflamatória local, geralmente, na área em que o parasito foi inoculado pelo flebótomo (SCOTT; NOVAIS, 2016).

### **2.5.5 Tratamentos e desafios**

Os medicamentos de escolha preconizados para tratamento dos doentes são: antimonial pentavalentes, estibogluconato de sódio, antimoniato de N-

metilglucamina e desoxicolato de Anfotericina B. Todavia, esses medicamentos apresentam alta toxicidade, muitos efeitos colaterais e um alto custo (ANVERSA et al., 2018). Além disso, pacientes portadores de infecções com parasitos resistentes às drogas disponíveis para tratamento já foram relatados na literatura, dificultando ainda mais o controle da doença (ANVERSA et al., 2018).

Tudo isso, somado às dificuldades de prevenção e tratamento da doença, é de suma importância estabelecer novas opções terapêuticas para as LT.

## **2.6 Nanopartículas para tratamento de doenças parasitárias**

Nos últimos tempos, as NP vem sendo, cada vez mais, usadas em uma ampla gama de tratamentos, incluindo tratamentos de doenças parasitárias e, mesmo que ainda não seja um assunto completamente elucidado, sabe-se que muitas dessas NP são capazes de ter ação direta sobre os parasitos ou mesmo, modular o SI para combater os patógenos (FANTI et al., 2018; SUMAIRA et al., 2018; ALTI et al., 2020; DO CARMO NETO, et al., 2021).

Conforme revisado por Do Carmo Neto e colaboradores (2021), as NP metálicas constituem um recurso valioso para a elaboração de um possível tratamento para as leishmanioses e que pode contribuir, substancialmente, para avanços nessa área. As NP de ZnO e Ag se destacam entre as NP metálicas como possíveis agentes leishmanicidas pelas suas características físico-químicas e ações tóxicas em diferentes cepas de *Leishmania spp.* (JEBALI; KAZEMI, 2013; DELAVARI et al., 2014; ALI et al., 2017; JAN et al., 2020; DO CARMO NETO, et al., 2021).

Há muito tempo, existem relatos que a humanidade vem usufruindo da atividade de íons de Ag como agente microbiano no tratamento de úlceras, feridas e desinfecção de instrumentos (XU et al., 2020). Hoje, diversos estudos utilizam desse saber milenar para compreender melhor os mecanismos envolvidos na utilização deste metal e fazer com que a utilização da Ag seja otimizada através, principalmente, da síntese de NP de Ag para que estas sejam usadas em uma infinidade de doenças, incluindo aquelas causadas por protozoários do gênero *Leishmania spp.* (OVAIS, et al., 2017; ALMAYOUF, et al., 2020).

Sabendo da propriedade leishmanicida dessas NP isoladas – de ZnO e Ag - surgiram estudos pensando na possibilidade dessas moléculas trabalharem de forma

sinérgica para combater parasitos causadores das leishmanioses. Hameed e colaboradores, em 2019, realizaram um elegante estudo e mostraram que NP de ZnO dopadas com Ag foram mais eficazes contra *L. tropica* do que aquelas NP de ZnO puras. Com isso, efeito desse composto para tratar infecções causadas por parasitos do gênero *Leishmania spp* parece promissor.

Apesar dessas nanoformulações apresentarem efeito citotóxico controlado em células saudáveis do organismo, doses mais elevadas podem apresentar toxicidade e ocasionar efeitos colaterais, e, por esse motivo, o uso dessas NP deve ser mais bem elucidado (BONDARENKO, et al, 2013). Além disso, é importante conhecer e estabelecer a metodologia da síntese das NP, pois abordagens metodológicas distintas exercem diferentes atividades biológicas (ULLAH et al., 2018; DO CARMO NETO, et al., 2021).

Dessa forma, é imprescindível conhecer mais sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos antiparasitários da dopagem de NP de ZnO com Ag e sua segurança, inclusive sobre parasitos causadores das LT, como a *L. braziliensis*, a fim de estabelecer novas opções terapêuticas. Salienta-se que o potencial bactericida dessas NP, já descrito na literatura, pode favorecer ainda mais o seu uso no combate das infecções secundárias geradas por algumas das manifestações clínicas da LT (ROSENBERG, et al., 2020).



### 3 OBJETIVOS

Avaliar o potencial imunomodulatório sobre células imunes saudáveis, além da atividade leishmanicida de NP de ZnO dopadas ou não com diferentes quantidades de Ag.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Definir a toxicidade de NP de ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag, ZnO:11Ag em *L. braziliensis* e RAW 264.7, bem como definir a concentração citotóxica para 50% desses macrófagos (CC50) e a concentração capaz de inibir 50% dos parasitos (IC50);
- Avaliar a curva de crescimento de *L. braziliensis* tratadas com NP de ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag, ZnO:11Ag;
- Determinar o percentual de ativação, apoptose e exaustão de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) tratadas com NP de ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag;
- Analisar a expressão de moléculas de superfícies (CD4, CD8, CD69, anexina-V, CD210, CD73, TNFR1, TNFR2 e PD1) em PBMCs tratadas com NP de ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag, ZnO:11Ag;
- Avaliar a produção de mediadores imunológicos (NO, IFN- $\gamma$ , TNF –  $\alpha$ , IL-4 e IL-10) em PBMCs tratados com ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag, ZnO:11Ag.

## 4 JUSTIFICATIVA

Atualmente, é notório que o avanço no entendimento do SI e das patologias, bem como o desenvolvimento de terapias para as mais diversas doenças vem contribuindo substancialmente para que o ser humano tenha uma melhor qualidade de vida.

Ainda assim, a LT é um importante conjunto de patologias com diferentes manifestações clínicas que atingem os tegumentos, causando elevada morbidade e diminuição da qualidade de vida dos doentes. E ainda, a espécie *L. braziliensis* se correlaciona com o surgimento e progressão de várias dessas manifestações, além dessa espécie ser a predominante nas regiões do Brasil, onde a LT é endêmica (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012; RUIZ-POSTIGO et al., 2021).

Além da LT ser considerada um importante problema de saúde pública, é considerada uma doença negligenciada, havendo a necessidade de explorar mais tanto os seus aspectos fisiopatológicos quanto novas terapias mais eficazes e com menos efeitos colaterais para os acometidos pelas diferentes formas clínicas de LT. Pensando nisso, mesmo que o mecanismo leishmanicida das NP metálicas – como as NP de ZnO dopadas ou não com Ag - não estejam completamente estabelecidos, elas se mostraram potentes indutores de respostas imunes que podem ser úteis para modular o SI e combater os parasitos causadores da LT, especialmente a *L. braziliensis* (DO CARMO NETO, et al., 2021).

Portanto, o presente trabalho busca estudar os efeitos imunomoduladores de NP de ZnO dopadas com Ag e correlacioná-los com uma possível atividade leishmanicida que pode trilhar no caminho do desenvolvimento de novas opções terapêuticas para casos de LT, além de contribuir para o entendimento da ação dessas NP sobre as células imunes.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Tipo de estudo

Trata-se um de estudo do tipo experimental no qual foram avaliados os aspectos imunomoduladores e leishmanicida de NP de ZnO dopadas ou não com diferentes porcentagens de Ag (5%, 9% e 11%). Os experimentos foram realizados nos laboratórios de imunologia e parasitologia no Departamento de Imunologia e Parasitologia (DIP) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) em Uberaba, Minas Gerais.

### 5.2 Cultivo de células

#### 5.2.1 Cultivo de RAW 264.7

Para a realização dos experimentos, utilizou-se macrófagos murinos RAW 264.7 mantidos em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (RPMI 10%) e 40µg/mL de gentamicina, cultivados em garrafas de cultivo celular e mantidas em estufa a 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

No momento do repique celular ou da realização dos experimentos, as células foram desprendidas das garrafas utilizando salina e tripsina/EDTA 1X. Uma alíquota foi diluída em líquido Turkey para contagem na câmara de Neubauer e ajustou-se para as concentrações desejadas.

#### 5.2.2 Cultivo de *Leishmania braziliensis*

Para o estudo, utilizou-se cepas de *L. braziliensis* (IOCL-566) mantidas em meio Schneider suplementado com 10% de SFB (Schneider 10%), cultivadas em garrafas de cultura a 26°C em estufa BOD. Para a realização dos experimentos, utilizou-se os parasitos na fase estacionária de crescimento no quinto dia de cultura.

As formas infecciosas de *L. braziliensis* promastigotas metacíclicas foram isoladas da cultura em fase estacionária utilizando-se centrifugação de 800 G por 4 minutos em uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi, então, submetido a uma nova centrifugação de 2000 G por 35 minutos, também a 4°C. Esse processo garantiu que as leishmanias mortas e debris, assim como os possíveis cristais formados no meio, fossem descartados, de modo que não interferissem na qualidade do experimento. Posteriormente, as *L. braziliensis* foram diluídas em paraformaldeído (PFA) 0,4%, contados em câmara de Neubauer e as concentrações ajustadas para cada experimento.

### **5.3 Preparação das nanopartículas**

#### **5.3.1 Obtenção das nanopartículas**

As NP usadas no presente estudo foram cedidas através da colaboração de pesquisadores da Universidade Federal do Alagoas (UFAL). Estes materiais consistem em NP de ZnO dopadas ou não com diferentes porcentagens de Ag, os quais foram sintetizados pelo método de coprecipitação. Foram testadas as seguintes NP: ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag. Vale ressaltar que as porcentagens de Ag nas nanoformulações foram estudadas e documentadas em estudos anteriores do grupo de pesquisa (FONSECA, et al., 2019).

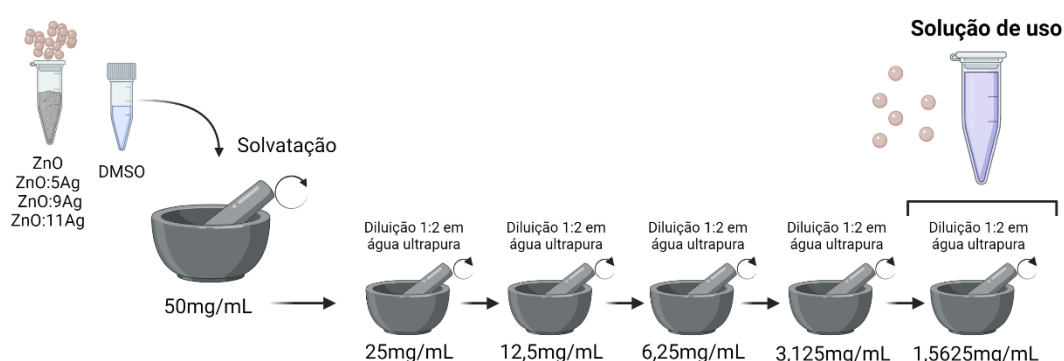
#### **5.3.2 Diluição e solvatação**

Com o auxílio de um almofariz de ágata e pistilo, as NP foram solvatadas, primeiramente em dimetilsulfóxido (DMSO), e, em seguida, em água ultrapura (H<sub>2</sub>O<sub>up</sub>), de forma que ficassem devidamente dispersas no solvente. Utilizou-se a fricção para fazer valer os princípios de forças eletrostáticas, que garantem a separação das partículas e a formação de uma película de solvente no seu entorno. Este processo garantiu que os possíveis efeitos biológicos estivessem otimizados. Para isso, os compostos (ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag) foram pesados em

balança de alta precisão, garantindo sua esterilidade. Posteriormente, foi adicionado DMSO até que cada composto estivesse com uma concentração de 50 mg/mL. Essa solução foi, então, colocada no almofariz de pedra lisa não porosa. Com o auxílio do pistilo, fez-se a fricção do material de modo que ocorresse a quebra mecânica das partes do composto, bem como a formação de uma camada de íons no entorno das moléculas.

Após a preparação desta primeira solução, prosseguiu-se com a diluição seriada de 1:2 em H<sub>2</sub>Oup até que a solução final de cada composto estivesse na concentração de 1,56 mg/mL (dose da alíquota padrão que foi posteriormente diluída de acordo com cada experimento), sempre realizando a solvatação entre cada diluição (Figura 3).

**Figura 3 - Diluição e solvatação das nanopartículas.**



**Fonte:** da autora, 2021. Produzido via BioRender.

#### 5.4 Ensaio de viabilidade com resazurina e estabelecimento da CC50 e IC50

*L. braziliensis* em fase estacionária foram contadas e plaqueadas na concentração de  $2,5 \times 10^6$ /mL ( $5 \times 10^5$  parasitos por poço) em placas de cultura de 96 poços com fundo chato. Os compostos ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag foram preparados e adicionados nas culturas de parasitos de modo que as concentrações finais fossem de 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL. Após a adição dos compostos, os parasitos foram incubados por 24 horas na estufa BOD a 26°C. Além

disso, foi utilizado o controle de Anfotericina B nas concentrações de 4 µg/mL, 0,8 µg/mL e 0,16 µg/mL.

Paralelamente, utilizou-se células RAW 264.7 na concentração de  $2,5 \times 10^6$ /mL ( $5 \times 10^5$  células por poço) em placas de cultura de 96 poços com fundo chato. Para estas células aderentes, aguardou-se o tempo de 4 horas para a sua completa aderência na placa, e, posteriormente, o meio foi retirado e os tratamentos adicionados (ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag). Para ambos os tratamentos foram utilizadas as NP de modo que as concentrações finais fossem de 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL. Posteriormente, as células RAW 264.7 foram incubadas por 24 horas na estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Todas as doses das NP estabelecidas para teste foram feitas em triplicata e com os devidos controles em cada uma das placas (células e meio como controle positivo e somente meio como controle negativo).

Após o devido tempo de tratamento, foram adicionados 5 µL de resazurina (C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>4</sub>) na concentração de 2,5 mg/mL por poço, e foram realizadas as leituras no leitor de fluorescência EnSpire® (Perkin Elmer, Alemanha) com excitação à 550 nm e emissão à 590 nm. Com os resultados obtidos, foi calculado o índice de seletividade para cada NP que é calculado pela razão entre a CC<sub>50</sub> e a IC<sub>50</sub> (PEÑA-MORÁN et al., 2016)

### **5.5 Curva de crescimento de *Leishmania braziliensis***

Os parasitos, com 5 dias de cultura, foram devidamente centrifugados e ressuspensos na concentração de  $2,5 \times 10^6$ /mL em Schneider 10%. Foram plaqueados 500 µL dessa solução em placas de cultura de 48 poços. Após isso, os tratamentos foram adicionados em triplicata (ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag, ZnO:11Ag), bem como os controles (Anfotericina B à 2 µg/mL como controle negativo e Schneider 10% como controle positivo). Após isso, procedeu-se com a contagem dos parasitos, a cada 24 horas, durante 5 dias de cultura, com a finalidade de avaliar como o tratamento influenciou na taxa de replicação parasitária.

## 5.6 Obtenção e tratamento de PBMCs

Foi coletado aproximadamente 20 mL de sangue total (com anticoagulante heparina) de um doador saudável voluntário, participante do projeto aprovado no comitê de ética em pesquisa sob o número CAAE 31484220.0.0000.8667. Posteriormente, os PBMCs foram separados utilizando Ficoll-Paque PLUS® (densidade 1.077 g/mL) por meio de centrifugação por 20 minutos à 1500 G à 25°C. Após isso, seguiu-se com duas lavagens em meio RPMI incompleto por 7 minutos à 900 G e à 25°C em cada lavagem. Posteriormente, as células foram ressuspensas em RPMI 10%, suficiente para que fosse atingido a quantidade de  $2 \times 10^6$  células/mL. Foram adicionadas 250  $\mu$ L dessa solução, por poço, em placas de 48 poços. Posteriormente, foram adicionadas as NP de ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag nas concentrações finais de 50  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ g/mL, 12,5  $\mu$ g/mL e 6,25  $\mu$ g/mL. Os controles utilizados foram as culturas de PBMCs somente com RPMI 10% (sem tratamento) e PBMCs estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28, uma vez que esses marcadores são capazes de promover a proliferação e ativação inespecífica.

Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas e os controles em sextuplicatas, ambos mantidos em placas de cultura de 48 poços por 72 horas na estufa à 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

## 5.7 Citometria de fluxo

Após a cultura e tratamento dos PBMCs nas placas de cultura, seguiu-se com centrifugação a 1200 G por 7 minutos à 25°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado. Posteriormente, foi realizado a inibição de marcações inespecíficas com 200  $\mu$ L de PBS contendo soro AB inativado, à 10% em cada condição, por 30 minutos. Após esse tempo, o conteúdo dos poços foi dividido para confecção das marcações pré-estabelecidas e foi adicionado 100  $\mu$ L de PBS 1X seguida de centrifugação a 1200 G por 7 minutos à 25°C. Após este processo, o sobrenadante foi descartado e procedeu-se com a marcação das células com os devidos mix de anticorpos.

Foram realizados 4 mix de anticorpos diferentes (todos BD Biosciences, EUA), além do controle sem marcação:

- Marcação 1: anti-CD4 (PE-Cy7), anti-CD8 (AF-488), anti-CD69 (PE) e anti-anexina-V (APC);
- Marcação 2: anti-CD4 (PE-Cy7), anti-CD8 (AF-488), anti-TNFR1 (PE), anti-TNFR2 (APC);
- Marcação 3: anti-CD4 (PE-Cy7), anti-CD8 (AF-488), anti-CD210 (PE), anti-CD73 (APC);
- Marcação 4: anti-CD4 (PE-Cy7), anti-CD8 (AF-488), anti-PD1 (PE).

Procedeu-se com a incubação por 30 minutos, no escuro, seguida da adição de 100  $\mu$ L de PBS 1X, centrifugação a 1200 G por 7 minutos à 25°C. O sobrenadante foi descartado e todas as condições, marcadas e não marcadas, foram fixados com PFA 1% (com exceção das análises que buscavam avaliação a anexina-V). Posteriormente, foram adquiridos 50 mil eventos por citometria de fluxo (FACS Canto II, BD Biosciences), os quais foram analisados com o software FlowJo (FlowJo LLC, OR, USA).

### **5.8 Dosagem de citocinas e óxido nítrico**

Para a realização da dosagem de citocinas e NO, foram utilizados os sobrenadantes das culturas de PBMCs (diluídas 1:2) tratadas com as NP de ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag nas concentrações finais de 50  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ g/mL, 12,5  $\mu$ g/mL e 6,25  $\mu$ g/mL, bem como os controles de PBMCs e meio RPMI 10% (sem tratamento) e PBMCs estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28.

A técnica utilizada para dosagem de citocinas foi o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA,) usando anticorpos de kits comerciais de IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (R&D Systems, EUA) e IL-4 (BD Biosciences).

Primeiramente, placas de 96 poços com fundo chato foram sensibilizadas com os anticorpos de captura dos kits de cada citocina. Estes anticorpos foram diluídos conforme a recomendação do fabricante, sendo que IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  estavam na diluição de 1:120 e IL-4 na diluição de 1:150 (diluídos em PBS 1X e tampão coating



de pH 9,5, respectivamente). Foram adicionados 50µL dessas soluções nos respectivos poços das placas e estas foram incubadas *overnight* a 4°C.

Posteriormente, lavou-se as placas no lavador de ELISA utilizando PBS 1X Tween 0,05%, seguido do bloqueio das marcações inespecíficas, utilizando 100 µl de PBS 1X BSA 1% em cada poço e incubação na câmara úmida por 4 horas.

Após este período, a solução de bloqueio foi retirada, as placas lavadas, e foram adicionados 50 µL dos sobrenadantes das culturas de células tratadas com as nanopartículas (em triplicata), diluídas 1:2 em PBS 1X BSA 1%. Concomitantemente, foram preparados e adicionados 50 µL dos padrões de cada citocina (sempre em duplicata) para confeccionar a curva padrão. O primeiro ponto foi de 2000 pg/mL para IL-10, 1000 pg/mL para TNF- $\alpha$ , 600 pg/mL para IFN- $\gamma$  e 500 pg/mL para IL-4, seguidos de 6 pontos com diluições seriadas à 1:2 e, também, foram preparados os poços sem a presença de amostras ou do padrão, representando o controle negativo (branco), em duplicata. As placas foram incubadas *overnight* a 4°C.

Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes no lavador de ELISA utilizando usando PBS 1X Tween 0,05% e foram adicionados 50 µL dos anticorpos de detecção diluídos em PBS 1X BSA 1% de acordo com a recomendação fabricante (1:60 para IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e 1:100 para IL-4). As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 3 horas.

Depois deste tempo, a enzima estreptavidina foi diluída em PBS 1X BSA 1% em 1:40. Foram adicionados 50 µL desta solução por poço e as placas foram incubadas por mais 30 minutos. Posteriormente, lavou-se as placas e adicionou-se 50 µL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Após 15 minutos, foi adicionado 25 µL de ácido sulfúrico 1M. A leitura dos resultados foi realizada utilizando EnSpire® (Perkin Elmer, Alemanha) com leituras de fluorescência de excitação à 495 nm e emissão à 525 nm e os resultados foram corrigidos levando em conta a diluição das amostras (1:2).

## 5.9 Dosagem de óxido nítrico

Para a dosagem de NO foi utilizado o reagente de Griess modificado (Sigma®, número de catálogo: G4410, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para tal, as amostras foram diluídas 1:2 em PBS 1X e foram adicionados 50 µL destas em placas de 96 poços com fundo chato. Para a realização da curva padrão, foi utilizado NaNO<sub>2</sub> na concentração de 200 µM, seguida de 6 diluições seriadas, além do controle negativo (somente PBS 1X).

Em seguida, foram adicionados 50 µL do reagente de Griess modificado e aguardados 15 minutos da reação. Os resultados foram obtidos utilizando o equipamento EnSpire® (Perkin Elmer, Alemanha) com a leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram corrigidos levando em conta a diluição das amostras (1:2).

### **5.9 Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram organizados no programa Microsoft Excel (2013) e as análises estatísticas foram realizadas utilizando primeiramente o programa Graphpad Prism 7.00, pelo Teste de Shapiro-Wilk para normalidade, e em seguida, com base nos resultados obtidos, utilizou-se o Teste T ou Mann Whitney, exceto para as curvas de crescimento, avaliadas pelo Teste Two Way ANOVA. Valores das análises considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 As nanopartículas de óxido de zinco dopadas com prata demonstraram bom índice de seletividade para a *Leishmania braziliensis*

Inicialmente, foi avaliada a atividade leishmanicida das NP de ZnO dopadas ou não com Ag em cepas de *L. braziliensis*. Em paralelo, também foi testado a toxicidade celular para macrófagos murinos RAW 264.7 utilizando o ensaio de resazurina nos tempos de 24 horas para, então, realizar a determinação do índice de seletividade de cada NP.

Observamos que todas as NP testadas foram mais tóxicas para *L. braziliensis* quando comparado às células RAW 264.7 (Tabela 1), sugerindo que são mais seletivas para ocasionar a morte de parasitos do que células saudáveis. Das NP estudadas, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag foram as que apresentaram índice de seletividade maior que 10 e, por essa razão, apresentaram potencial de seletividade elevado para combater o patógeno quando comparado às células saudáveis (PEÑA-MORÁN et al., 2016)

**Tabela 1 – Índice de seletividade das diferentes NP testadas em células RAW 264.7 e *L. braziliensis*.**

NP	Célula-alvo	CC50/IC50 (µg/mL)	Índice de Seletividade
ZnO	RAW 264.7	1232	1,33
	<i>L. braziliensis</i>	927,9	
ZnO:5Ag	RAW 264.7	1330	3,35
	<i>L. braziliensis</i>	397	
ZnO:9Ag	RAW 264.7	412,6	52,03
	<i>L. braziliensis</i>	7,93	
ZnO:11Ag	RAW 264.7	312,4	20,38
	<i>L. braziliensis</i>	15,33	

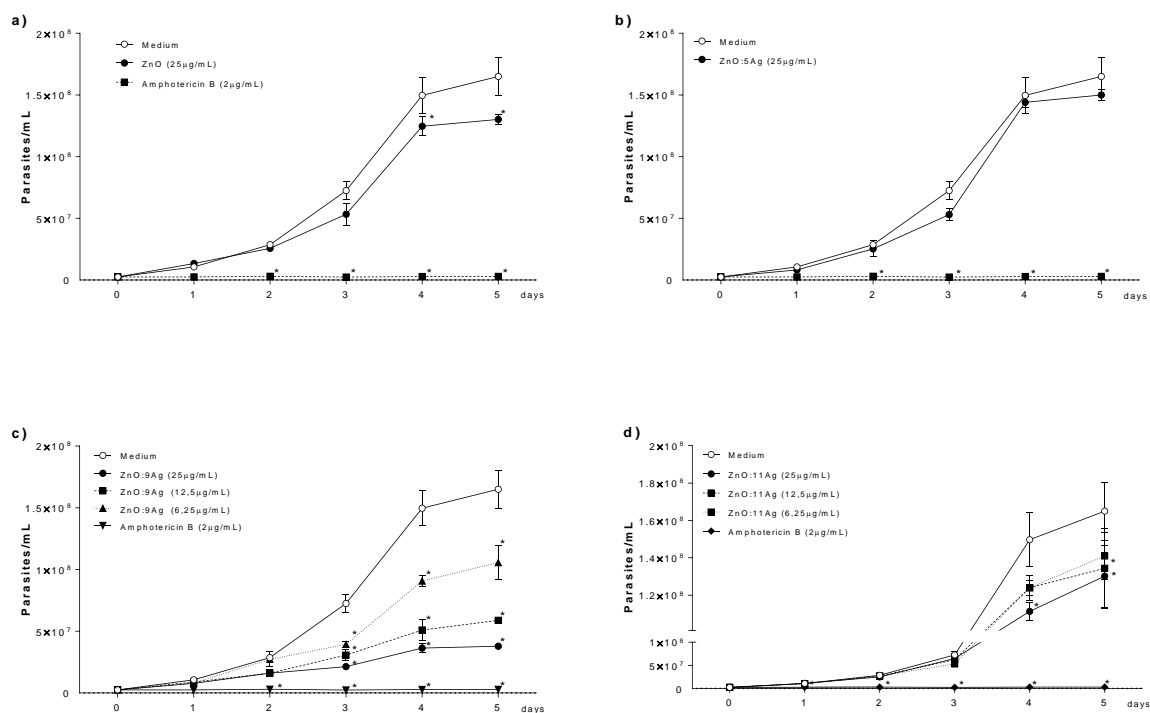
Fonte: da autora, 2021.

## **6.2 As nanopartículas de ZnO, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag apresentaram potencial de reduzir a proliferação de promastigotas de *Leishmania braziliensis***

Para observar o efeito inibitório das NP sobre a proliferação dos parasitos, foram realizadas curvas de crescimento de *L. braziliensis* nas formas promastigotas metacíclicas tratadas com as diferentes NP durante 5 dias. Culturas sem tratamento e tratadas com Anfotericina B (2 µg/mL) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente (Figura 4).

As NP de ZnO e ZnO:11Ag à 25 µg/mL inibiram a proliferação das promastigotas metacíclicas a partir do 4<sup>o</sup> dia de tratamento (Figuras 4a e 4d), enquanto ZnO:11Ag à 12,5 µg/mL inibiu a proliferação dos parasitos a partir do 5<sup>o</sup> dia (Figura 4d) e a NP de ZnO:9Ag foi a única capaz de inibir a proliferação a partir do 3<sup>o</sup> dia, mesmo na dose mais baixa, de 6,25 µg/mL (Figura 4c).

**Figura 4 – NP de ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag são capazes de inibir a proliferação das formas promastigotas de *L. braziliensis*.**



Fonte: da autora, 2021.

A avaliação da proliferação de *L. braziliensis* foi determinada pela contagem dos parasitos em câmara de Neubauer após fixação com PFA 0,2% gelado, a cada 24 horas, por um período de 5 dias. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  SEM e foram considerados significativos para  $P < 0,05$  (\*) no teste Two Way ANOVA de múltiplas comparações quando comparado com o grupo controle sem tratamento (Medium). **a)** O tratamento com ZnO à 25  $\mu\text{g/mL}$  reduziu significativamente a proliferação de promastigotas de *L. braziliensis* a partir do dia 4. **b)** No que diz respeito ao tratamento dos parasitos com ZnO:5Ag, não houve diferença significativa da proliferação das formas promastigotas em nenhum dos dias analisados. **c)** Quanto ao tratamento com ZnO:9Ag observou-se redução da proliferação das promastigotas de *L. braziliensis* desde o terceiro dia de tratamento para as 3 doses testadas. **d)** Na avaliação do tratamento com ZnO:11Ag, foi vista diminuição da proliferação das formas promastigotas a partir do dia 4 na dose de 25  $\mu\text{g/mL}$  e no dia 5 na dose de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ .

### 6.3 Avaliação de moléculas de superfície em linfócitos T

#### 6.3.1 NPs são capazes de ativar LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup> e induzir baixos níveis citotóxicos nas menores concentrações

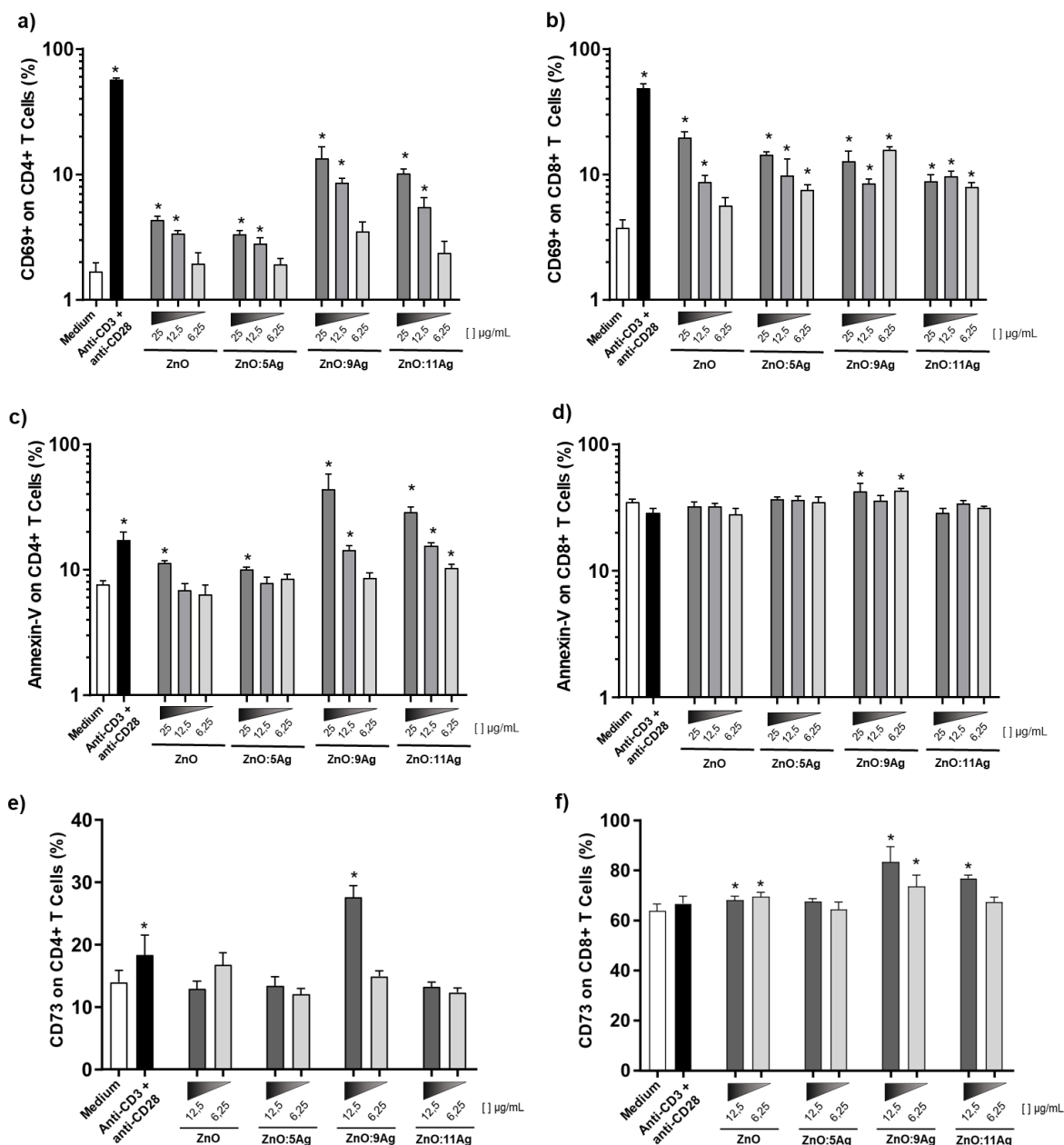
Primeiramente, a ativação de LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup> foi avaliada a partir da expressão da molécula de superfície CD69 em culturas de PBMCs tratados com as NP de ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag nas doses de 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e 6,25  $\mu\text{g/mL}$  e os resultados evidenciaram que todas as NP testadas foram capazes de aumentar esse marcador de ativação celular (Figuras 5a e 5b).

Ainda assim, com o intuito de avaliar a citotoxicidade do tratamento com as NP em LTC4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup>, foi realizada a marcação com anexina-V (Figura 5c e 5d) nessas culturas de PBMCs. A marcação desta molécula foi significativamente maior em LTCD4<sup>+</sup> tratados com ZnO e ZnO:5Ag na dose de 25 µg/mL, em ZnO:9Ag nas doses de 25 µg/mL e 12,5 µg/mL e em ZnO:11Ag nas três doses testadas (25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL) (Figura 5c). Quanto aos linfócitos LTCD8<sup>+</sup>, somente ZnO:9Ag apresentou expressão significativamente maior que o grupo controle (Figura 5d). Mesmo que a dose de 25 µg/mL tenha estimulado a expressão de CD69, a marcação de anexina-V nos linfócitos foi alta, evidenciando uma possível elevada taxa de morte celular dessas células saudáveis, e, por essa razão, esta dose foi excluída das demais análises.

Posteriormente, a ativação celular foi avaliada por outra molécula, a CD73, nas doses de 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL. A expressão de CD73 foi aumentada em LTCD4<sup>+</sup> tratados com ZnO:9Ag na dose de 12,5 µg/mL (Figura 5e) e em LTCD8<sup>+</sup> nos tratamentos com ZnO, ZnO:9Ag (doses de 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL) e ZnO:11Ag (dose de 12,5 µg/mL) (Figura 5f).

Esses dados em conjunto fornecem bons indícios que os tratamentos aqui utilizados podem atuar estimulando vias da ativação de células T, sugerindo que a utilização de NP de ZnO dopadas ou não com Ag podem apresentar importantes atividades imunomoduladoras.

**Figura 5 – Efeito das NP na expressão das moléculas CD69, anexina-V e CD73 em linfócitos T.**



Fonte: da autora, 2021.

Marcação de CD69 (Figuras 5a e 5b), anexina-V (5c e 5d) e CD73 (5e e 5f) em LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup> foi avaliada em PBMCs tratados com NP em diferentes doses por 72 horas por meio de citometria de fluxo. Os resultados foram expressos em média da intensidade de fluorescência  $\pm$  SEM para CD69 e anexina-V e  $\pm$  SD para CD73. Resultados considerados significativos para  $P < 0,05$  (\*) quando comparado à cultura de células controle sem tratamento (Medium) pelo Teste T não pareado para CD69 e anexina-V e Teste de Mann-Whitney para CD73. Células tratadas com estímulos anti-CD3 e anti-CD28 foram utilizadas como controle positivo. **a)** A citometria de fluxo mostrou que as doses de 25  $\mu\text{g/mL}$  e 12,5  $\mu\text{g/mL}$  de todas as NP testadas são capazes de aumentar, significativamente, a expressão do marcador de ativação celular CD69 em LTCD4<sup>+</sup>, sendo que ZnO:9Ag e ZnO:11Ag são as que promovem os maiores aumentos de ativação celular. **b)** A ativação celular de LTCD8<sup>+</sup> marcada por células CD69<sup>+</sup> foi significativamente maior em todos os tratamentos e doses, com exceção do tratamento com ZnO à 6,25  $\mu\text{g/mL}$ . **c)** Todas as NP na dose de 25  $\mu\text{g/mL}$  induziram marcação aumentada de anexina-V em LTCD4<sup>+</sup> quando comparada ao grupo controle sem tratamento. A dose de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  foi potencialmente tóxica em LTCD4<sup>+</sup> nas NP ZnO:9Ag e ZnO:11Ag, enquanto a dose de 6,25  $\mu\text{g/mL}$  aumentou significativamente a marcação de anexina-V somente no tratamento com ZnO:11Ag. **d)** Em LTCD8<sup>+</sup> foi visto que a maioria das NP testadas e doses não aumentaram, significativamente, a

marcação de anexina-V, com exceção de ZnO:9Ag nas doses de 25 µg/mL e 6,25 µg/mL. e) A NP de ZnO:9Ag na dose de 12,5 µg/mL foi a única capaz de aumentar a expressão da molécula CD73 em LTCD4<sup>+</sup>. f) Já em LTCD8<sup>+</sup>, ZnO e ZnO:9Ag nas doses de 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL e ZnO:11Ag na dose de 12,5 µg/mL foram capazes de aumentar essa molécula indicadora de ativação celular.

### **6.3.2 As nanopartículas de ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag mostraram-se como potentes indutoras da expressão de TNFR1 e TNFR2**

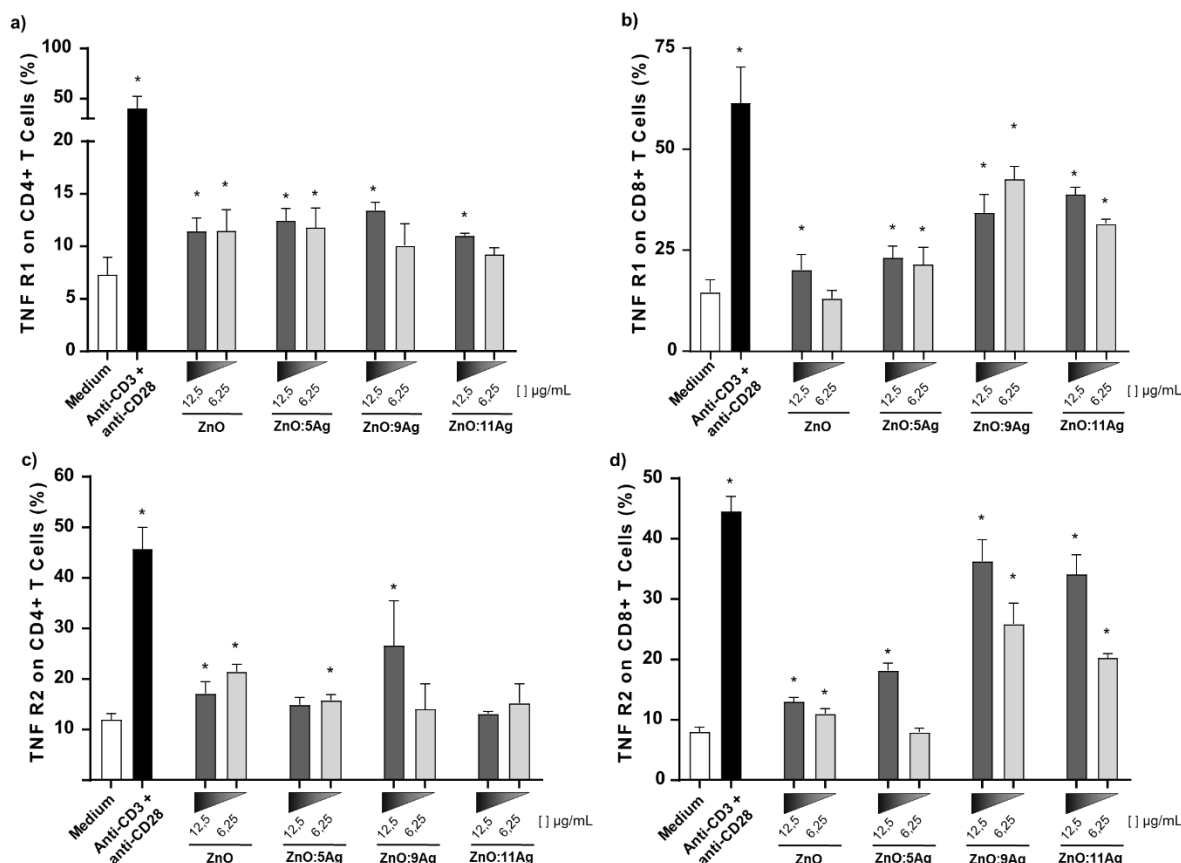
Tendo em mente a importância de uma resposta inflamatória eficaz e adequada para o controle de agentes infecciosos, é imprescindível que as células imunes sejam capazes de produzir estímulos inflamatórios e a responder, configurando uma via de retroalimentação positiva potente o suficiente para destruir determinado agente agressor. Diante disso, avaliou-se a expressão de TNFR1 e TNFR2 em PBMCs saudáveis em contato as NP de ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag.

Para LTCD4<sup>+</sup> observou-se que TNFR1 (Figura 6a) foi significativamente mais expresso nas células tratadas com todas as NP testadas nas doses de 12,5 µg/mL, e ZnO e ZnO:5Ag ainda na dose mais baixa, de 6,25 µg/mL. Já o TNFR2 foi mais expresso em LTCD4<sup>+</sup> tratados com ZnO nas doses de 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL, enquanto, em ZnO:5Ag, esse valor foi maior com o tratamento na dose de 6,25 µg/mL e em ZnO:9Ag na dose de 12,5 µg/mL (Figura 6c).

Nos LTCD8<sup>+</sup> observou-se que todas as NP e doses testadas foram capazes de aumentar a expressão de TNFR1 e TNFR2 (com exceção de ZnO na dose de 6,25 µg/mL para TNFR1 e ZnO:5Ag na dose de 6,25 µg/mL para TNFR2) (Figuras 6b e 6d). Cabe destacar aqui que os tratamentos com ZnO:9Ag e ZnO:11Ag foram os mais potentes para realizar aumento da expressão desses receptores, visto que LTCD8<sup>+</sup> chegaram a expressar quase três vezes mais receptores para TNF-α do que o grupo controle sem tratamento (Figuras 6b e 6d).

**Figura 6 – As NP promovem aumento na expressão de receptores de TNF-α em linfócitos T.**





Fonte: da autora, 2021.

Expressão de TNFR1 e TNFR2 em LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup> foi avaliada em PBMCs tratados com NP em diferentes doses por 72 horas por meio de citometria de fluxo. Os resultados foram expressos em média da intensidade de fluorescência  $\pm$  SD. Resultados considerados significativos para  $P < 0,05$  (\*) quando comparado à cultura de células controle sem tratamento (Medium) pelo Teste de Mann-Whitney. Células tratadas com estímulos anti-CD3 e anti-CD28 foram utilizadas como controle positivo. **a)** Todas as NP e doses testadas (exceto ZnO:11Ag na dose de 6,25 µg/mL) foram capazes de estimular, positivamente, a expressão de TNFR1 em LTCD4<sup>+</sup>. **b)** Nos LTCD8<sup>+</sup> foi visto algo parecido, em que todas as NP e doses testadas (com exceção de ZnO na dose de 6,25 µg/mL) se mostraram eficazes no aumento da expressão de TNFR1, sendo que essa produção foi mais significativa nas células tratadas com ZnO:9Ag. **c)** No que diz respeito a expressão de TNFR2, os LTCD4<sup>+</sup> tiveram expressão significativamente maior quando tratados com ZnO (doses de 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL), ZnO:5Ag (dose de 6,25 µg/mL) e ZnO:9Ag (dose de 12,5 µg/mL). **d)** LTCD8<sup>+</sup> expressaram mais TNFR2 quando comparado ao grupo controle em todas as NP testadas e de maneira dose dependente, sendo ZnO:9Ag e ZnO:11Ag na dose de 12,5 µg/mL foram as que tiveram maior atividade.

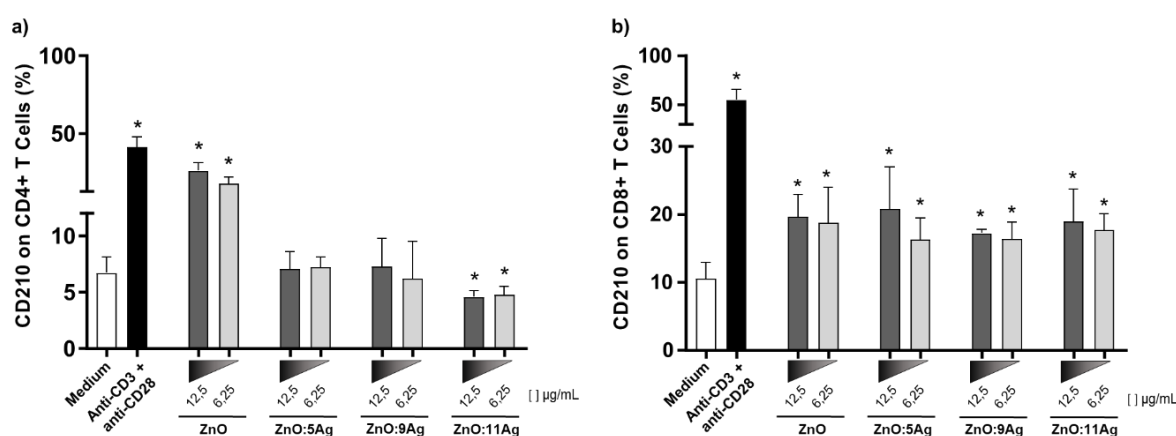
### 6.3.3 LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup> expressando CD210 quando tratados com ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag

Células T foram tratadas com ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag nas doses de 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL por 72h e os níveis de CD210 foram analisados. Os resultados mostraram que a NP de ZnO aumentou, significativamente, a expressão dos receptores de IL-10 em todas as doses testadas, enquanto ZnO:5Ag e ZnO:9Ag

não tiveram diferença significativa na produção desses receptores quando comparados ao grupo controle. Em contrapartida, ZnO:11Ag diminuiu LTCD4<sup>+</sup> CD210<sup>+</sup> de forma significativa quando comparado ao grupo controle (Figura 7a).

Por outro lado, todas as NP foram capazes de aumentar, significativamente, a expressão de CD210 em LTCD8<sup>+</sup> nas duas doses analisadas (Figura 7). Com isso, podemos sugerir que esses LTCD8<sup>+</sup> estão mais aptas a irem em direção a um perfil regulatório quando comparado aos LTCD4<sup>+</sup>.

**Figura 7 – As NP impactam diferencialmente na expressão de CD210 em LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup>.**



**Fonte:** da autora, 2021.

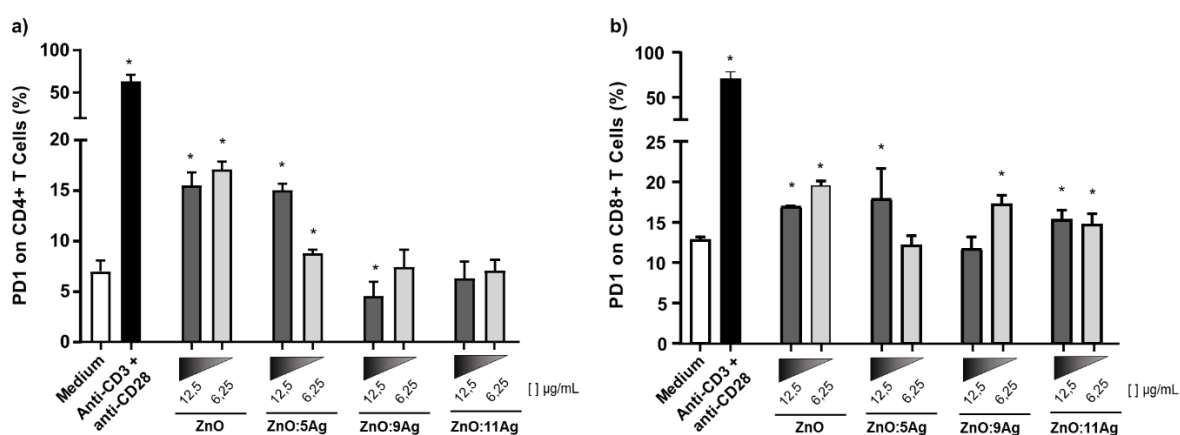
Expressão de CD210 em LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup> foi avaliada em PBMCs tratados com NP em diferentes doses por 72 horas por meio de citometria de fluxo. Os resultados foram expressos em média da intensidade de fluorescência  $\pm$  SD. Resultados considerados significativos para  $P < 0,05$  (\*) quando comparado à cultura de células controle sem tratamento (Medium) pelo Teste de Mann-Whitney. Células tratadas com estímulos anti-CD3 e anti-CD28 foram utilizadas como controle positivo. **a)** ZnO aumentou, significativamente, a expressão de CD210 em LTCD4<sup>+</sup> enquanto ZnO:11Ag diminuiu, mostrando que a porcentagem de Ag tem uma boa influência nesse processo. **b)** Em LTCD8<sup>+</sup>, todas as NP se mostraram eficientes para promover o aumento significativo de CD210 nessas células.

### **6.3.4 LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup> expressando PD1 quando tratados com ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag**

Sabendo que a molécula PD1 também atua no SI inibindo as respostas inflamatórias e nos mecanismos de exaustão, buscamos observar como é sua expressão em LT tratados por 72h com as NP de ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag nas doses de 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL (Figura 8).

Em LTCD4<sup>+</sup> foi observado que ZnO e ZnO:5Ag foram capazes de regular positivamente a expressão dessa molécula e a NP de ZnO:9Ag foi a única capaz de gerar uma diminuição da expressão desta molécula (Figura 8a). Em contrapartida, nos LTCD8<sup>+</sup> foi visto que todas as NP apresentam capacidade de aumentar a expressão de PD1, mas não de maneira dose dependente (Figura 8b).

**Figura 8 – PD1 é expresso de maneira distinta em linfócitos tratados com as diferentes NP.**



**Fonte:** da autora, 2021.

Expressão de PD1 em LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup> foi avaliada em PBMCs tratados com NP em diferentes doses por 72 horas por meio de citometria de fluxo. Os resultados foram expressos em média da intensidade de fluorescência  $\pm$  SD. Resultados considerados significativos para  $P < 0,05$  (\*) quando comparado à cultura de células controle sem tratamento (Medium) pelo Teste de Mann-Whitney. Células tratadas com estímulos anti-CD3 e anti-CD28 foram utilizadas como controle positivo. **a)** ZnO e ZnO:5Ag aumentam a expressão de PD1 em LTCD4<sup>+</sup> enquanto ZnO:9Ag é capaz de diminuir. **b)** Todas as NP testadas foram capazes de aumentar a expressão de PD1, mas, não de maneira dose dependente.

#### 6.4 As nanopartículas de ZnO dopadas com Ag induzem um perfil de secreção de citocinas pró-inflamatórias em PBMCs

A quantificação do nível das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$  foi dosada no sobrenadante dos PBMCs tratadas com ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag nas doses de 12,5  $\mu$ g/mL e 6,25  $\mu$ g/mL por 72h (Figura 9).

No que diz respeito à produção de TNF- $\alpha$  foi observado que além dos LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup> presentes nas culturas de PBMCs tratados expressarem mais receptores de superfície TNFR1 e TNFR2 (Figura 6), o sobrenadante dessas culturas também mostra altas concentrações de TNF- $\alpha$  (Figura 9a), indicando que pode haver uma

retroalimentação e provável estimulação de outras células imunes. Especificamente, as NP de ZnO e ZnO:5Ag se mostraram capazes de estimular a produção dessa citocina de maneira dose dependente. No entanto, NP de ZnO:9Ag e ZnO:11Ag apesar de apresentarem capacidade de aumentar a produção de TNF- $\alpha$ , este aumento não foi dose dependente.

No que diz respeito à produção de IFN- $\gamma$  (Figura 9e), ZnO e ZnO:5Ag – nas duas doses testadas – foram capazes de aumentar a produção desta citocina de maneira dose dependente, mostrando que essas NP – ao contrário de ZnO:9Ag e ZnO:11g – são capazes de influenciar no aumento da produção de IFN- $\gamma$ .

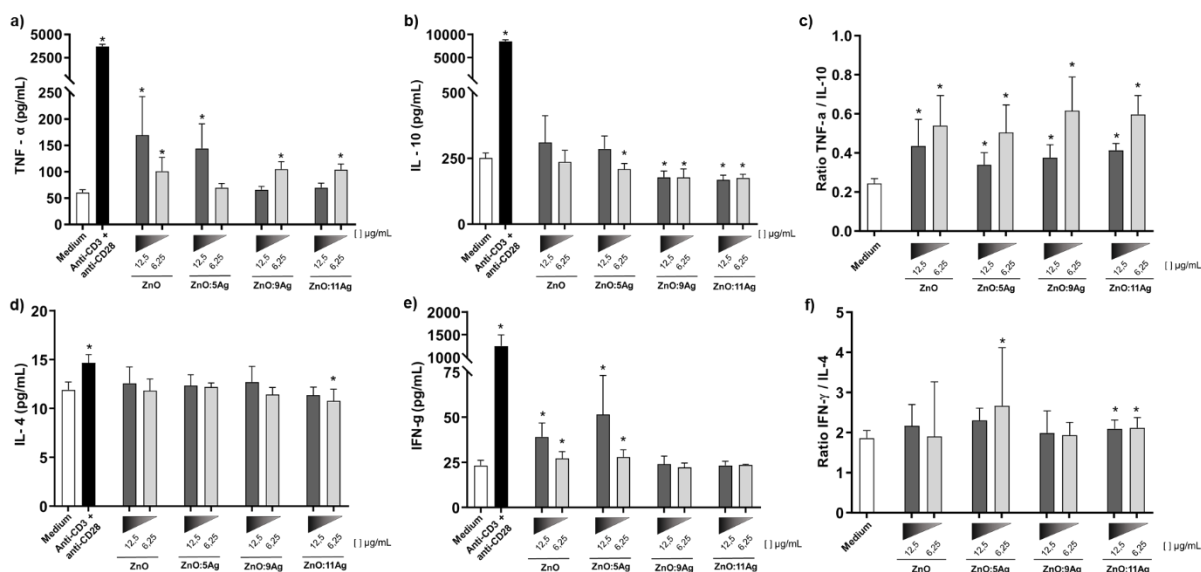
Da mesma forma que uma resposta inflamatória com predomínio de citocinas inflamatórias – como o TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  – está associada à eliminação de parasitos causadores da leishmaniose, o predomínio de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e IL-4, corrobora com a persistência parasitária e aumento da lesão. Todavia, é de suma importância que o SI funcione de forma ordenada com a presença desses mediadores regulatórios. Dentro deste contexto, também foi observado a produção de IL-10 (Figura 9b) e IL-4 (Figura 9d) por esses PBMCs.

Os dados mostraram que quanto maior a dopagem de Ag nas NP, menos IL-10 foi detectado no sobrenadante destas culturas celulares, evidenciando que a Ag pode ser um inibidor de IL-10.

Na quantificação da IL-4, só foi observado diferença significativa no tratamento com ZnO:11Ag na dose de 6,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  que produziu uma quantidade menor desta citocina quando comparado ao grupo controle não tratado. As demais NP não foram capazes de produzir uma diferença significativa na produção dessa citocina.

Tendo esses resultados, foi realizada a razão entre as quantificações de TNF- $\alpha$  e IL-10 (Figura 9c) e entre IFN- $\gamma$  e IL-4 (Figura 9f). Na avaliação TNF- $\alpha$ /IL-10 observou-se que há predomínio de TNF- $\alpha$  em comparação à IL-10 para todas as NP e doses testadas quando comparadas ao grupo controle sem tratamento. Já na razão entre IFN- $\gamma$ /IL-4 foi observado uma relação significativa na NP ZnO:5Ag na dose de 6,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e em ZnO:11Ag nas doses de 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 6,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Figura 9 - Efeito do tratamento de PBMCs com NP sob a produção de citocinas.**



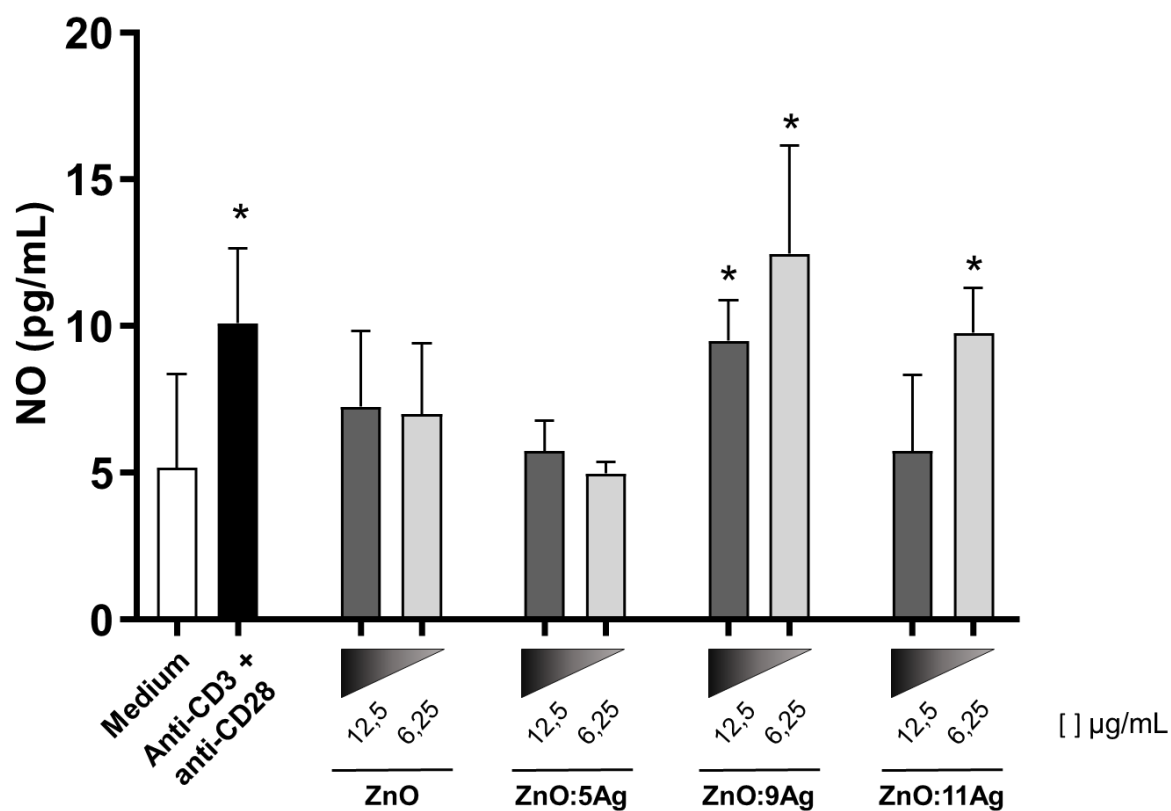
Fonte: Da autora, 2021.

Expressão de TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-4 foi medida do sobrenadante de PBMCs após 72 horas de tratamento com as NP ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag nas doses de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e 6,25  $\mu\text{g/mL}$  pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  SD em picogramas por mililitro (pg/ml). Resultados considerados significativos para  $P < 0,05$  (\*) quando comparado à cultura de células controle sem tratamento (Medium) pelo Teste de Mann-Whitney. Células tratadas com estímulos anti-CD3 e anti-CD28 foram utilizadas como controle positivo. **a)** Dosagem de TNF- $\alpha$  foi significativamente mais elevada em ZnO nas duas doses testadas, em ZnO:5Ag na dose de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e em ZnO:9Ag e ZnO:11Ag na dose de 6,25  $\mu\text{g/mL}$ . **b)** A quantificação de IL-10 foi significativamente menor em ZnO:5Ag na dose de 6,25  $\mu\text{g/mL}$  e nas duas doses para ZnO:9Ag e ZnO:11Ag. **c)** A razão entre TNF- $\alpha$  e IL-10 foi maior em todas as NP e doses testadas quando comparada ao grupo controle. **d)** Para IL-4, somente ZnO:11Ag na dose de 6,25  $\mu\text{g/mL}$  foi capaz de diminuir, significativamente, a produção dessa citocina. **e)** ZnO e ZnO:5Ag nas duas doses testadas foram capazes de elevar os níveis de IFN- $\gamma$  quando comparado ao grupo controle. **f)** Quando analisada a razão entre IL-4 e IFN- $\gamma$  observou-se que ZnO:5Ag e ZnO:11Ag foram as únicas NP capazes de promover uma diferença significativa dessa razão.

## 6.5 Quantificação de óxido nítrico no sobrenadante de culturas de PBMCs tratadas com nanopartículas

Após o tratamento de PBMCs com ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag nas doses de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , foi realizada a dosagem de NO no sobrenadante destas culturas (Figura 10). Foi visto que ZnO:9Ag e ZnO:11Ag são capazes de aumentar a produção deste metabólito de forma significativa, sendo que a dose menor, de 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , é a melhor indutora do aumento da produção de NO nas culturas de PBMCs tratadas com as NP. Este dado é muito importante, pois o NO é um aliado para combater patógenos intracelulares.

Figura 10 – ZnO:9Ag e ZnO:11Ag aumentam a produção de NO no sobrenadante de PBMCs.



Fonte: Da autora, 2021.

Produção de NO foi medida do sobrenadante de PBMCs após 72 horas de tratamento com as NP ZnO, ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag nas doses de 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL pelo método Griess modificado. Os resultados foram expressos em média ± SD em picogramas por mililitro (pg/ml). Resultados considerados significativos para  $P < 0,05$  (\*) quando comparado à cultura de células controle sem tratamento (Medium) pelo Teste de Mann-Whitney. Células tratadas com estímulos anti-CD3 e anti-CD28 foram utilizadas como controle positivo.

## 7 DISCUSSÃO

Recentemente, o uso de NP de ZnO e Ag isoladas ou em conjunto vem sendo utilizadas em estudos para estabelecer novas terapias para tratar doenças causadas por diversos patógenos, em especial, para as leishmanioses (JEBALI; KAZEMI, 2013; HAMEED et al., 2019). Pensando nisso, este estudo propôs observar a ação de NP de ZnO dopadas ou não com diferentes quantidades de Ag em formas promastigotas de *L. braziliensis* - um importante agente etiológico da LT - além de observar como essas nanoformulações são capazes de modular o mecanismo imune de células de defesa humanas saudáveis.

Nossos achados referentes à citotoxicidade, utilizando o ensaio de resazurina, mostram que todas as NP testadas apresentaram capacidade de matar os parasitos de *L. braziliensis* e que a dopagem das NP de ZnO com Ag aumenta essa atividade, sendo que ZnO:9Ag é a que apresenta melhor desempenho para ocasionar a morte desses parasitos. Esses achados corroboram com os resultados de Nadhman e colaboradores (2016) que observaram que NP de ZnO dopadas com 9% de Ag são capazes de induzir dano ao DNA de parasitos do gênero *Leishmania* spp. na presença de luz e apresentam ação leishmanicida mais potente do que NP de ZnO puras. Além disso, Hameed e colaboradores (2019) também observaram que o uso em conjunto de NP ZnO e Ag é melhor do que o uso de NP de ZnO isoladas em cepas de *L. tropica*, denotando, mais uma vez, a atividade leishmanicida desses compostos.

Já é bem estabelecido que parasitas de *Leishmania* spp. apresentam capacidade de infectar fagócitos e que são sensíveis a ROS e NO, todavia, apesar desses mecanismos serem muito importantes para a eliminação da infecção, esses protozoários desenvolveram formas de driblar muitas defesas imunes (MURRAY, 1981). Portanto, há necessidade de que o SI trabalhe de forma ordenada para eliminar o parasitismo, mas de tal forma que preserve as células saudáveis. A partir disso, buscamos evidenciar a seletividade dessas NP para eliminar parasitos de *L. braziliensis* em comparação com macrófagos murinos RAW 264.7 através da elaboração do índice de seletividade de cada NP. Mesmo que a CC50 para células RAW 264.7 tenha sido superior à IC50 da *L. braziliensis* em todas as NP aqui testadas, dados da literatura indicam que para uma substância apresentar seletividade

satisfatória para o agente alvo em comparação com as células saudáveis, o índice de seletividade deve ser maior que 10 (PEÑA-MORÁN et al., 2016). Dessa forma, evidenciamos que as NP de ZnO:9Ag e ZnO:11Ag, respectivamente, são as apresentam bons índices de seletividade e encorajamos que mais testes com essas NP sejam realizados, pois, percebemos as limitações de estudos *in vitro* – como o aqui estabelecido - e concordamos que há necessidade de expandir esses testes tanto para outras populações de células saudáveis quanto para o ambiente *in vivo* para elucidar melhor esses mecanismos de seletividade e toxicidade.

Também observamos como as NP são capazes de interferir na proliferação das formas promastigotas de *L. braziliensis* por meio da elaboração de uma curva de crescimento e nossos achados foram promissores. As NP de ZnO, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag foram capazes de inibir a proliferação parasitária de forma significativa quando comparado ao grupo controle sem tratamento, sendo que ZnO:9Ag apresentou o melhor resultado inibindo a proliferação a partir do 3º dia de cultura na dose mais baixa testada, de 6,25µg/mL. Mais uma vez, nossos dados são condizentes com a literatura ao mostrar que as NP híbridas de ZnO e Ag apresentam uma melhor atividade leishmanicida quando comparado com as NP de ZnO ou Ag isoladas (SUMBAL, et al., 2019).

Sabendo da notória atividade leishmanicida das NP aqui testadas e da segurança em células RAW 264.7, buscamos avaliar a expressão de moléculas de superfície de linfócitos T para identificar o comportamento das NP na modulação dessas células imunes.

Primeiramente, usamos a marcação de anexina-V nos linfócitos T tratados com as NP, como um preditor de dano celular dessas células. Foi visto que as doses de 25 µg/mL são potencialmente agressivas pela alta marcação com anexina-V nas células tratadas e, por isso, essa dose foi excluída das demais análises de modulação imune. Yan e colaboradores, em 2020, trataram células HUVEC com NP de ZnO puras e NP de ZnO dopadas com Ag e observaram os efeitos citotóxicos nessas células. Foi visto que a expressão de genes de estresse celular e a citotoxicidade foram menores em nanocompostos híbridos de ZnO mais Ag do que as NP de ZnO puras. Nosso grupo trouxe resultados discordantes, mostrando que NP de ZnO dopadas com Ag, apesar de apresentarem melhor potencial leishmanicida, apresentam maior toxicidade em células saudáveis quando comparado as NP de ZnO puras, o que pode ser



explicado pelo tipo celular utilizado em cada estudo e pelas quantidades de Ag utilizadas.

Ademais, ao observar a ativação e proliferação de células T por meio da expressão de CD69 e CD73, vimos que ZnO:9Ag foi a NP que apresentou maior capacidade de modulação positiva dessas moléculas de superfície, fazendo aumentar a expressão de CD69 e CD73 em LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup>, denotando sua capacidade de ativar mecanismos imunes celulares importantes e que podem ser úteis para combater patógenos intracelulares e favorecer a liberação de citocinas potencializadoras dos mecanismos fagocíticos.

Além disso, as NP foram capazes de promover um aumento da produção de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de culturas de PBMCs tratadas com NP de ZnO associadas ou não à Ag e, também, estimular a expressão de TNFR1 e TNFR2 na superfície de LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup>. Curiosamente, nas NP de ZnO:9Ag e ZnO:11Ag a dose de 6,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi capaz de promover uma produção mais elevada de TNF- $\alpha$  no sobrenadante das culturas do que a dose de 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e o contrário ocorreu no tratamento com ZnO e ZnO:5Ag. Uma das possíveis explicações para esse fenômeno pode ser que as doses mais elevadas de ZnO:9Ag e ZnO:11Ag podem apresentar toxicidade significativa e interferir nas funcionalidades da célula, como, por exemplo, na produção de citocinas inflamatórias. Além disso, é visto que essas NP são potencializadoras da expressão de TNFR1 e este receptor tem correlação direta com estímulos apoptóticos nas células (IDRISS; NAISMITH, 2000). Quanto aos níveis de IFN- $\gamma$ , observamos que, diferentemente de TNF- $\alpha$ , ZnO e ZnO:5Ag foram as NP capazes de aumentar a produção dessa citocina em culturas de PBMCs, o que mostra, mais uma vez, que as NP apresentam mecanismos distintos de modulação do SI e que merecem ser estudadas em outros modelos para esclarecer estas variáveis. Sabe-se que a produção de mecanismos efetores pelos fagócitos - como a produção de ROS e NO - é diretamente estimulado por citocinas inflamatórias e que são cruciais para promover a eliminação eficiente do parasito (LIU; UZONNA, 2012; CARNEIRO et al., 2016). Nossos achados mostraram que as NP, em especial a ZnO:9Ag, são capazes de aumentar a produção de NO em PBMCs, mostrando uma possível modulação positiva de possíveis mecanismos fagocíticos, ou mesmo, do metabolismo de linfócitos.

Diante disso, sabe-se que TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e NO são imprescindíveis para estimular respostas inflamatórias e promover o *clearence* de parasitos causadores das

leishmanioses. Amorim e colaboradores (2019) mostraram que a persistência do parasito em lesões causadas por *L. braziliensis* está correlacionada com a falha imune que ocorre em alguns pacientes com LT, o que indica a necessidade de escolher terapias que induzem um perfil de resposta agressivo o suficiente para promover a eliminação parasitária e impedir o surgimento de lesões crônicas. Consoante a isso, a Anfotericina B é um importante medicamento usado em muitas infecções por *Leishmania spp.* mas apresenta limitações como alta toxicidade, efeitos colaterais graves e baixa solubilidade (EHRENFREUND-KLEINMAN et al., 2005). Ainda assim, conforme evidenciado por Ehrenfreund-kleinman e colaboradores (2005) essa substância exibe um índice de sucesso terapêutico significativo e é capaz de modular o SI de forma que macrófagos intraperitoneais murinos e monócitos humanos liberem mais citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , contribuindo para a destruição do parasito. Nossos dados mostram resultados promissores que trazem indicativos que as NP de ZnO dopadas com Ag podem ser capazes de modular LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup> para um perfil de resposta voltado para a produção de mediadores inflamatórios que são essenciais para a eliminação de parasitos causadores da leishmaniose. Por outro lado, o aumento descontrolado dessas e de outros mediadores inflamatórios estão intimamente correlacionados com o aumento do tamanho das lesões e da gravidade das leishmanioses por meio da extensão do dano tecidual (DA-CRUZ et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2014; SALDANHA et al., 2020). Isso denota que nossos achados devem ser tomados com cautela e avaliados em demais estudos futuros que trarão resultados capazes de dizer se esse aumento inflamatório é capaz de contribuir para a eliminação parasitária sem aumentar o dano tecidual aos tecidos saudáveis e mostrar se a ação dessas NP é benéfica.

Ainda, vimos que os níveis de IL-10 foram menores nas culturas tratadas com ZnO:9Ag e ZnO:11Ag. Esses dados fortalecem a ideia de que essas células podem estar voltadas para um perfil pró-inflamatório que poderá auxiliar na resolução de infecções por parasitos do gênero *Leishmania spp.* Saldanha e colaboradores (2020) mostraram em um elegante estudo que células TCD8<sup>+</sup> são as predominantes em biópsias de pacientes com úlceras cutâneas e especula-se que estas células estão ligadas com o aumento do dano de tecidos pela liberação de granzimas e perforinas quando estão voltadas para um perfil de resposta inflamatório. Nossos achados mostraram que as NP testadas promovem um aumento significativo de células TCD8<sup>+</sup> CD210<sup>+</sup>, levantando a hipótese de que essas NP podem promover o estabelecimento

de LTCD8<sup>+</sup> voltadas para um perfil de resposta regulatório que pode ser benéfico para soluções tópicas em lesões cutâneas ao impedir parte do dano tecidual, uma vez que essas células T não são as melhores habilitadas para controlar a infecção por parasitos do gênero *Leishmania spp.* Para entender melhor esses mecanismos será interessante estabelecer em estudos posteriores a presença de moléculas regulatórias expressas por essas populações de células imunes.

A molécula PD-1 se comporta como uma molécula inibitória, associada à exaustão de células imunes e os parasitos causadores das leishmanioses apresentam a capacidade de aumentar a sua produção em células T para favorecer a proliferação parasitária e evadir os mecanismos de defesa imunológicos (EGUI, et al., 2018). Além disso, foi mostrado que a inibição dessas moléculas em linfócitos T de camundongos infectados com *L. amazonensis* com lesões cutâneas ativas, ajuda a promover a redução da carga parasitária e melhorar a resposta das células T frente a infecção (FONSECA-MARTINS, et al., 2019). Garcia de Moura e colaboradores (2021) mostraram que muitos genes associados à exaustão celular – incluindo aqueles relacionados a à PD1 - foram aumentados em biópsias de pacientes infectados com *L. braziliensis*, além de LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup> circulantes que apresentam expressão aumentada dessa molécula quando comparado a indivíduos saudáveis. Dentro desse contexto, nossos resultados evidenciam que a NP de ZnO:9Ag na dose de 12,5 µg/mL foi capaz de inibir a produção dessa molécula em LTCD4<sup>+</sup>, o que é um dado promissor que pode ser usado em posteriores experimentos *in vitro* e *in vivo* para confirmar se essa NP é capaz de promover esse mesmo fenótipo em células e animais infectados por *Leishmania spp.* Os autores também mostraram que LTCD8<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup> do local da lesão não se correlacionam com a extensão do dano tecidual, sugerindo que essas células podem não estar associadas à patologia cutânea que ocorre nos pacientes (GARCIA DE MOURA, et al., 2021). Diante disso, sugerimos que o aumento de PD1 em LTCD8<sup>+</sup> nos PBMCs tratados com as NP aqui testada são um fator positivo e que impulsiona posteriores experimentos envolvendo esses compostos e parasitos causadores das leishmanioses.

Por fim, foi observado uma não linearidade na dopagem das NP de ZnO com Ag e com a atividade leishmanicida, mostrando a relação de aumento de Ag e atividade leishmanicida não é proporcional. No estudo de Yan e colaboradores (2021) foi sugerido que a disposição da Ag nas NP de ZnO não é o mais importante para gerar diferentes efeitos biológicos, mas sim a quantidade de Ag dopada. De forma

complementar, Zhang & Mu, em 2007, realizaram um elegante estudo produzindo e caracterizando diferentes NP de ZnO dopadas com diferentes quantidades de Ag. Foi visto que a morfologia das NP era alterada de acordo com a quantidade de Ag adicionada bem como a atividade fotocatalítica que foi aumentada até a adição de 6,2% de Ag, atingindo um platô. Quando os pesquisadores aumentam a dopagem com Ag para 11,7% a atividade biológica foi diminuída, fato que pode ser explicado pelas faixas de emissão que são alteradas pela Ag e algo parecido pode estar acontecendo aqui no nosso estudo. Sugerimos que as NP aqui testada por apresentarem diferentes concentrações de Ag, podem ter morfologia diferente umas das outras, o que explica a diferença de efeitos biológicos observados.

## 8 CONCLUSÃO

Os dados apresentados são interessantes, pois permitem formular a hipótese de que as NP de ZnO dopadas com diferentes porcentagens de Ag – em especial, ZnO:9Ag – são substâncias com um potencial terapêutico considerável, visto que promoveram uma resposta leishmanicida com índice de seletividade satisfatório, além de uma resposta imune voltada para o perfil inflamatório com citocinas e receptores inflamatórios que podem ser capazes de combater parasitos causadores da leishmaniose. Estudos futuros *in vivo* e *in vitro* serão importantes para compreender sobre os demais mecanismos dessas NP e entender sobre eles no contexto das infecções causadas por *Leishmania spp.*, em especial, *L. braziliensis*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADI, P. G. S. et al. Ag<sup>+</sup>-promoted zinc oxide [Zn(O):Ag]: A novel structure for safe protection of human skin against UVA radiation. **Toxicology in Vitro**, v. 50, n. 2017, p. 318–327, 2018.

ABOUELMAGD, S. A. et al. Tannic Acid-Mediated Surface Functionalization of Polymeric Nanoparticles. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 2, n. 12, p. 2294–2303, 2016.

AGYINGI, E. O. et al. Modeling the immune system response: An application to leishmaniasis. **Mathematical Biosciences and Engineering**, v. 17, n. 2, p. 1253–1271, 2020.

ALI, A. et al. ZnO nanostructure fabrication in different solvents transforms physiochemical, biological and photodegradable properties. **Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications**, v. 74, p. 137–145, 2017.

ALMAYOUF, M. A. et al. The Effects of Silver Nanoparticles Biosynthesized Using Fig and Olive Extracts on Cutaneous leishmaniasis Induced Inflammation in Female Balb/c Mice. **Bioscience reports**, v. 40, n. 12, 2020.

ALTI, D. et al. Gold-Silver Bimetallic Nanoparticles Reduced with Herbal Leaf Extracts Induce ROS-Mediated Death in Both Promastigote and Amastigote Stages of *Leishmania donovani*. **ACS Omega**, v. 5, n. 26, p. 16238-162457, jul. 2020.

AMORIM, C. F. et al. Variable gene expression and parasite load predict treatment outcome in cutaneous leishmaniasis. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 519, p. 1–10, 2019.

ANVERSA, L. S. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.

ARENAS, R. et al. Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.

BARANOV, M. V. et al. Modulation of Immune Responses by Particle Size and Shape. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2021.

BATES, P.; ROGERS, M. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of Leishmania. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 601–609, 2005.

BAYDA, S. et al. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 1–15, 2020.

BLACKBURN, S. D.; WHERRY, E. J. IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 143–146, 2007.

BLUESTONE, J. A. Mechanisms of tolerance. **Immunological Reviews**, v. 241, n. 1, p. 5–19, 2011.

BONDARENKO, O., et al. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 7, 2013.

BRASIL; Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**, 2017. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_%0Ahttp://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_%0Ahttp://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf)>.

BRETSCHER, P. On analyzing how the Th1/Th2 phenotype of an immune response is determined: Classical observations must not be ignored. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JUN, p. 1–7, 2019.

CARNEIRO, P. P. et al. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2016.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Leishmaniasis. **Epidemiology & Risk Factors**. 2020. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>>. Acesso em: 29 nov 2021.

CIBRIÁN, D.; SÁNCHEZ-MADRID, F. Europe PMC Funders Group CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 6, p. 946–953, 2017.

CSABA, G. Immunity and longevity. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 66, n. 1, p. 1–17, 2019.



DA-CRUZ, A. M. et al. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Human American Tegumentary Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 2, p. 225–229, 1996.

DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUN, p. 1–9, 2012.

DELAVARI, M. et al. In Vitro Study on Cytotoxic Effects of ZnO Nanoparticles on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). **Iranian Journal of Parasitology**, v. 9, n. 1, p. 6–13, 2014.

DO CARMO NETO, J. R. et al. Antiprotozoal and anthelmintic activity of zinc oxide nanoparticles, **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, 2021.

DREXLER, K. E. Engines of creation 2.0." The Coming Era of Nanotechnology. **Anchor Books - Doubleday**, v. 1986, p. 576, 2006.

EGUI, A. et al. Phenotypic and Functional Profiles of Antigen-Specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells Associated With Infection Control in Patients With Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n. 393, 2018.

EHRENFREUND-KLEINMAN, T. et al. The effect of amphotericin B derivatives on *Leishmania* and immune functions. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 1, p. 158–163, 2005.

ESPITIA, P. J. P.; et al. Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. **Food and bioprocess technology**, v. 5, n.5, p. 1447-1464, 2012.

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

FONSECA-MARTINS, A. M. et al. Immunotherapy using anti-PD-1 and anti-PD-L1 in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice reduce parasite load. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, 2010.

FONSECA, B. B. et al. Nanocomposite of Ag-doped ZnO and AgO nanocrystals as a preventive measure to control biofilm formation in eggshell and *Salmonella* spp. entry into eggs. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, p. 1–10, 2019.

GARCIA DE MOURA, R. et al. PD-1 Blockade Modulates Functional Activities of Exhausted-Like T Cell in Patients With Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 12, 2021.

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. **Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis**. Elsevier, 2013. v. 82. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3>>.

HAMED, S., et al. Silver nanoparticles: Antimicrobial activity, cytotoxicity, and synergism with N-acetyl cysteine. **Journal of basic microbiology**, v. 57, n. 8, p.659–668, 2017.

HAMEED, S. et al. Greener synthesis of ZnO and Ag-ZnO nanoparticles using *Silybum marianum* for diverse biomedical applications. **Nanomedicine**, v. 14, n. 6, p. 655–673, 2019.

IDRISS, H. T.; NAISMITH, J. H. TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). **Microscopy Research and Technique**, v. 50, n. 3, p. 184–195, 2000.

JAN, H. et al. Biogenic Synthesis and Characterization of Antimicrobial and Anti-parasitic Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles using Aqueous Extracts of the Himalayan Columbine (*Aquilegia pubiflora*). **Frontiers in Materials**, v. 7, p. 249, 2020.

JAROSZ-GRIFFITHS, H. H. et al. TNF receptor signalling in autoinflammatory diseases. **International Immunology**, v. 31, n. 10, p. 639–648, 2019.

JEBALI, A.; KAZEMI, B. Nano-based antileishmanial agents: A toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 6, p. 1896–1904, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.002>>.

JIN, T., et al. Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, and *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of food science**, v. 74, n. 1, 2009.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>>.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908–931, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>>.

KHAN, S. T.; MUSARRAT, J.; AL-KHEDHAIRY, A. A. Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: Current status. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 70–83, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.046>>.

LEBIEN, T. W.; TEDDER, T. F. B lymphocytes: How they develop and function. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1570–1580, 2008.

LEBRE F., et al. The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 2017.

LICHTMAN, A. H. Imunologia Celular e Molecular Shiv Pillai. MBBS, PHD. **Imunologia celular e molecular**, 2015.

LISBOA, L. A. V. et al. Doenças Tropicais E Negligenciadas. **Doenças Tropicais E Negligenciadas**, 2021.

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

LUCKHEERAM, R. V. et al. CD4 +T cells: Differentiation and functions. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

MISHRA, P. K. et al. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 12, p. 1825–1834, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.08.006>>.

MURRAY, H, W. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 153, p. 1302-1315, 1981.

NADHMAN, A. et al. Photo-induced *Leishmania* DNA degradation by silver-doped zinc oxide nanoparticle: An in-vitro approach. **IET Nanobiotechnology**, v. 10, n. 3, p. 129–133, 2016.

NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE (NNI). Nanotechnology Timeline. **Nano.gov**, 2014. Disponível em: < nano.gov/index.php/timeline>. Acesso em: 29 set 2021.

NAKAYAMA, T. et al. Th2 cells in health and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 35, p. 53–84, 2017.

NAZIR, S., et al. Antileishmanial activity and cytotoxicity of ZnO-based nano-formulations. **International Journal of Nanomedicine**, v.14, p. 7809-7822, 2019.

NIU, G.; CHEN, X. Apoptosis imaging: Beyond annexin V. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 11, p. 1659–1662, 2010.

OLIVEIRA, W. N. et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 127–132, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.12.016>.

OVAIS, M. et al. Biosynthesized colloidal silver and gold nanoparticles as emerging leishmanicidal agents: an insight. **Nanomedicine**, v. 12, n. 24, p. 2807-2819, 2017.

PEÑA-MORÁN, O.A. et al. Cytotoxicity, post-treatment recovery, and selectivity analysis of naturally occurring podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on breast Cancer cell lines. **Molecules**, v. 21, 2016.

PIMENTA, P. F. P.; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. C. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT**, Capítulo 1, p. 1–45, 2012.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage : a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, p. 111–129, 2015.

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

RESTA, R.; THOMPSON, L. F. T cell signalling through CD73. **Cellular Signalling**, v. 9, n. 2, p. 131–139, 1997.

ROMAGNANI, S. Th1/Th2 cells. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 5, n. 4, p. 285–294, 1999.

ROSENBERG, M., et al. Selective antibiofilm properties and biocompatibility of nano-ZnO and nano-ZnO/Ag coated surfaces. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 2020.

RUIZ-POSTIGO, J. A. et al. Global leishmaniasis a baseline for the 2030 roadmap Surveillance mondiale de la leishmaniose: 2019-2020, une période de référence pour la feuille de route à l' horizon 2030. p. 2019–2020, 2021.

SAIGUSA, R. et al. T cell subsets and functions in atherosclerosis. **Nature reviews – Cardiology**, v. 17, n. 7, p. 387-401, 2020.

SALDANHA, M. G. et al. Tissue Damage in Human Cutaneous Leishmaniasis: Correlations Between Inflammatory Cells and Molecule Expression. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. July, p. 1–7, 2020.

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

SHRIKANT, P. A. et al. Regulating functional cell fates in CD8 T cells. **Immunologic research**, v. 46, n. 1-3, p. 12-22, 2010.

SUMAIRA, T. et al. Melatonin-enhanced biosynthesis of antimicrobial AgNPs by improving the phytochemical reducing potential of a callus culture of *Ocimum basilicum* L. var. *thyriflora*. **RSC Advances**, v. 7, 2017.

SUMBAL, N. A. et al. Synthesis, characterization and biological activities of monometallic and bimetallic nanoparticles using *Mirabilis jalapa* leaf extract. **Biotechnology reports**, v. 22, 2019.

SUN, B., et al. NLRP3 inflammasome activation induced by engineered nanomaterials. **Small**, v. 9, 2013.

SUN, M. et al. Microbiota-derived short-chain fatty acids promote Th1 cell IL-10 production to maintain intestinal homeostasis. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

TATIYA-APHIRADEE, N.; CHATUPHONPRASERT, W.; JARUKAMJORN, K. Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 1–10, 2019.

THOMAS, S. C. et al. Ceramic nanoparticles: fabrication methods and applications in drug delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 42, p. 6165-88, 2015.

TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. **Research in Veterinary Science**, v. 130, p. 19–25, 2020.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to *Leishmania*: Paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229–242, 2007.

ULAETO, S. B., et al. Biogenic Ag Nanoparticles from Neem Extract: Their Structural Evaluation and Antimicrobial Effects against *Pseudomonas nitroreducens* and *Aspergillus unguis* (NII 08123). **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 6, n. 1, p. 235-245, 2020.

ULLAH, I. et al. Comparative study on the antileishmanial activities of chemically and biologically synthesized silver nanoparticles (AgNPs). **3 Biotech**, v. 8, n. 2, 2018.

USFDA. **Nanotechnology: Over a Decade of Progress and Innovation at FDA**. 2020, n. July, p. 8–10, 2020. Disponível em: <<https://www.fda.gov/science-research/fda-grand-rounds/nanotechnology-over-decade-progress-and-innovation-fda-08132020-08132020>>.



VAN ENGELAND, M. et al. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, n. 1, p. 1–9, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. 2021.

XU, L. et al. Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. **Theranostics**, v. 10, n. 20, p. 8996–9031, 2020.

YAN, D. et al. Comparison of cytotoxicity of Ag/ZnO and Ag@ZnO nanocomplexes to human umbilical vein endothelial cells in vitro. **Journal of applied toxicology**, v. 41, n. 5, p. 811–819, 2021.

YATIM, K. M.; LAKKIS, F. G. A brief journey through the immune system. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 7, 2015.

YI, M. et al. Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. **Molecular Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2018.

ZHANG, Y., MU, J. One-pot synthesis, photoluminescence, and photocatalysis of Ag/ZnO composites. **Journal of colloid and interface science**, v. 309, n. 2, p. 478–484, 2007.

ZHANG, X. F. et al. Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, 2016.

ZHU, L. et al. IL-10 and IL-10 Receptor Mutations in Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology Research**, v. 10, n. 2, p. 65–69, 2017.