



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA
(PPGIBA)

**AVALIAÇÃO DO EFEITO LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADOR DA
FURAZOLIDONA E SEUS PRODUTOS DA COMPLEXAÇÃO COM
CICLODEXTRINAS SOBRE A INFECÇÃO POR *Leishmania (L.) infantum***

I VAN BRITO FEITOSA

AMAZONAS, AM

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA
(PPGIBA)

AVALIAÇÃO DO EFEITO LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADOR DA
FURAZOLIDONA E SEUS PRODUTOS DA COMPLEXAÇÃO COM
CICLODEXTRINAS SOBRE A INFECÇÃO POR *Leishmania (L.) infantum*

IVAN BRITO FEITOSA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como parte de pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Imunologia Básica e Aplicada.

ORIENTADOR (A): ALLYSON GUIMARÃES COSTA.

CO-ORIENTADORA: CAROLINA BIONI GARCIA TELES.

AMAZONAS, AM

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F311a Feitosa, Ivan Brito
Avaliação do efeito leishmanicida e imunomodulador da furazolidona e seus produtos da complexação com ciclodextrinas sobre a infecção por Leishmania (L.) Infantum / Ivan Brito Feitosa . 2021
81 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Allyson Guimarães Costa
Coorientadora: Carolina Bioni Garcia Teles
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Leishmaniose visceral. 2. Furazolidona. 3. Complexação com ciclodextrina. 4. imunomodulação. I. Costa, Allyson Guimarães. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Santíssima Trindade pelo grandioso e complexo projeto da criação e redenção humana. Estudar uma pequena parte desse projeto através da Imunologia é fascinante e gratificante.

Agradeço grandemente a minha mãe, dona Janete Hitzschky, que conduziu a mim e meus irmãos no melhor caminho para a vida e para os projetos educacionais. Minha mãe é meu espelho de valor e de motivação para prosseguir! O exemplo de minha mãe foi fundamental para concluir esta Tese. Obrigado minha mãezinha, Te amo Demais! Agradeço ao meu Pai (Cidão), meus irmãos, Helena, Lidia e Adriano, por sempre me apoiarem, por serem meu refúgio, meus conselheiros em todos os momentos. Muito obrigado!

Agradeço ao professor Dr^o José Wilson (UFAM/PPGIBA) que me possibilitou estar no programa de Imunologia Básica e Aplicada da UFAM. Muito obrigado professor pelo apoio e compreensão!

Agradeço grandemente ao meu orientador prof^o Dr^o Allyson Guimarães da Costa (UFAM/PPGIBA/HEMOAM). Ele não é apenas um orientador, é um amigo! Professor Allyson além de muito competente, é muito humano, inteligente, com um coração gigante. Obrigado professor pelas orientações e por acreditar neste projeto.

Agradeço, Agradeço, Agradeço e ao mesmo tempo nem sei como agradecer a professora Dr^o Carolina Bioni (FIOCRUZ/RO). No mestrado, ela me possibilitou caminhos, e no doutorado ela me CONDUZIU no caminho. Muito obrigado professora pela amizade, dedicação, carinho, amor, orientação, por acreditar em mim. Eu não tenho palavras para agradecer. Você é sensacional!

Semelhantemente a professora Carol, Agradeço, Agradeço, Agradeço a minha amiga a Dr^o Ana Paula de Azevedo (FIOCRUZ/RO). Como é que vou pagar essa dívida amiga? Muito obrigado por fazer parte desse projeto. Por ficar horas e horas comigo no laboratório, por se importar, por se preocupar, por discutir, por ser parceira e conselheira. Sou privilegiado em ter sua amizade, e que privilégio! Repito, não sei como retribuir, mas reconheço a sua parceria e te respeito muito!

Agradeço aos amigos da Plataforma de Bioensaios em Malária e Leishmaniose (PBML-FIOCRUZ), todos eles foram fundamentais neste processo, aprendi muito com eles. Em especial agradeço a Aurileya, que esteve presente em diversos momentos de padronização dos experimentos. Muito obrigado!

Agradeço aos professores do Programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA) que me possibilitaram novos horizontes, nova luz, grandes conhecimentos em imunologia. Todos foram maravilhosos! Sinto Saudades das discussões em sala.

Agradeço também aos colegas do PPGIBA por possibilitarem momentos de enriquecimento e aprazibilidade. Muito obrigado por tantos ensinamentos e pela convivência!

Agradeço a Coordenação do PPGIBA, professora Dr^o Jerusa, professor Dr^o Boechat, Dr^o José Wilson, pelo apoio e direção do programa. Agradeço a secretária Ana Paula pela atenção prestada, e quero agradecer e homenagear meu amigo e técnico educacional Edson. Meu amigo Edson, você é muito querido, companheiro, faz muito mais do que lhe pedem. Obrigado por ajudar todos os alunos do PPGIBA, você incrível!

Agradeço a professora Dr^o Janaina Cecilia Villanova (UFES), por conceder as moléculas e apoiar o projeto. Muito obrigado professora pelo carinho e parceria.

Agradeço aos membros da Banca de doutorado pelas sugestões no trabalho, que tornarão o projeto mais enriquecedor.

Agradeço a CAPES pela bolsa de Doutorado concedida, fundamental para a realização da pesquisa.

Por fim, mas não menos importante agradeço a minha Esposa, minha amiga, minha conselheira, minha princesa. Obrigado pela compreensão em muitos momentos de ausência, obrigado por apoiar, e se dedicar tanto a nossa família. Te amooo! Agradeço aos meus pimpolhos Arthur e Agatha pelo privilégio de todos os dias estarem com vocês e por me apoiarem sempre! Dizem que cunhado não é parente (rsrs), mas este é, e quero agradecer ao meu cunhado Kleber, por me apoiar neste projeto e em muitos momentos me aconselhar, trazer força para prosseguir.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida por flebotomíneos. O diagnóstico e o tratamento precoce continuam sendo os principais mecanismos de controle da LV, entretanto, a farmacoterapia disponível ainda é limitada e a busca de novos tratamentos para LV continua sendo uma emergência médica mundial. Desta forma, o objetivo deste trabalho consiste em avaliar *in vitro* a atividade citotóxica, leishmanicida e imunomoduladora em macrófagos (M1 e M2) da furazolidona (FZD) e seus produtos de complexação com ciclodextrina (FZD-CD) em diferentes proporções de concentração sobre a infecção de *Leishmania (L.) infantum*. Inicialmente foi realizada uma revisão sistemática, seguindo a estratégia PICO (Problema, Intervenção, Comparação e Desfecho), com intuito de estabelecer quais os mecanismos imunes estão descritos sobre os efeitos da administração da FZD. Em seguida, foram realizados ensaios de atividade *in vitro*: teste de citotoxicidade (células de linhagem de macrófagos murinos J774), inibição de crescimento de 50% de formas promastigotas (IC_{50}), inibição de crescimento de 50% de formas amastigotas (ICA_{50}) de *Leishmania (L.) infantum*, estimativa do índice de seletividade (IS), análise de fagocitose por contagem de zimosan, dosagem de espécies reativas de oxigênio (EROS) e óxido nítrico (NO), além da imunofenotipagem de macrófagos M1 e M2. Como resultado da revisão sistemática foram encontrados 943 trabalhos, sendo 605 selecionados após remoção de duplicação, 35 mantiveram-se para elegibilidade e destes, 4 responderam a pergunta norteadora e foram incluídos. Os trabalhos inclusos indicaram que a administração de FZD pode induzir vias pró ou anti-inflamatórias, com o provável aumento da expressão de EROS e modulação de vias apoptóticas. Os ensaios experimentais revelaram que dos 12 produtos de complexação, a mistura física de FZD com β -ciclodextrina na proporção 1:2 e a mistura física de FZD com hidroxipropil- β -ciclodextrina (MFHFZD) na proporção 1:1 apresentaram efeitos leishmanicidas nas formas promastigotas, amastigotas e com menor citotoxicidade (valores de IS de 13,8 e 499,37 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; considerando os dados leishmanicidas contra amastigotas) quando comparada a furazolidona (valor de IS de 2,52 $\mu\text{g/mL}$). Somente a FZD livre na concentração de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ aumentou a taxa de fagocitose e na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ estimulou a produção de NO. A mistura física de FZD com hidroxipropil- β -ciclodextrina na proporção 1:1 induziu a formação de EROS na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$. Por fim, a FZD e MFHFZD 1:1 não apresentaram aumento significativo na porcentagem de macrófagos polarizados em M1 e M2 *in vitro*, sendo nossa hipótese parcialmente testada, onde a complexação da furazolidona com as ciclodextrinas originou complexos e agregados do tipo não-complexos com efeito leishmanicida, com baixa toxicidade, estimulando a fagocitose e a produção de EROS e NO, porém, não levando a polarização de macrófagos no perfil M1 em modelo *in vitro* de infecção por *Leishmania (L.) infantum*.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral; Furazolidona; Complexação com ciclodextrina, imunomodulação.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a systemic disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by sandflies. Early diagnosis and treatment remain the main mechanisms of VL control, however, the available pharmacotherapy is still limited and the search for new treatments for VL remains a worldwide medical emergency. Thus, the objective of this work is to evaluate in vitro the cytotoxic, leishmanicidal and immunomodulatory activity in macrophages (M1 and M2) of furazolidone (FZD) and its complexation products with cyclodextrin (FZD-CD) at different concentration ratios on the *Leishmania (L.) infantum* infection. Initially, a systematic review was carried out, following the PICO strategy (Problem, Intervention, Comparison and Outcome), in order to establish which immune mechanisms are described on the effects of FZD administration. Then, in vitro activity assays were performed: cytotoxicity test (J774 murine macrophage lineage cells), 50% growth inhibition of promastigote forms (IC_{50}), 50% growth inhibition of amastigote forms (ICA_{50}) of *Leishmania (L.) infantum*, selectivity index estimation, phagocytosis analysis by zymosan count, dosage of reactive oxygen species and nitric oxide, in addition to the immunophenotyping of M1 and M2 macrophages. As a result of the systematic review, 943 papers were found, 605 were selected after removal of duplication, 35 remained for eligibility and of these, 4 answered the guiding question and were included. The studies included indicated that the administration of FZD can induce pro- or anti-inflammatory pathways, with the likely increase in the expression of reactive oxygen species and modulation of apoptotic pathways. Experimental tests revealed that of the 12 complexation products, the physical mixture of FZD with β -cyclodextrin in the proportion 1:2 and the physical mixture of FZD with hydroxypropyl- β -cyclodextrin in the proportion 1:1 had leishmanicidal effects in the promastigote and amastigote forms and with lower cytotoxicity (Selectivity Index [IS] values of 13.8 and 499.37 $\mu\text{g/mL}$, respectively; considering leishmanicidal data against amastigotes) when compared to furazolidone (IS value of 2.52 $\mu\text{g/mL}$). Only free FZD at a concentration of 0.3 $\mu\text{g/mL}$ increased the rate of phagocytosis and at a concentration of 3 $\mu\text{g/mL}$ it stimulated NO production. The physical mixture of FZD with hydroxypropyl- β -cyclodextrin in a 1:1 ratio induced the formation of reactive oxygen species at a concentration of 3 $\mu\text{g/mL}$. Finally, FZD and MFHFZD 1:1 did not show a significant increase in the percentage of macrophages polarized in M1 and M2, and our hypothesis was partially tested, where the complexation of furazolidone with cyclodextrins originated non-complex complexes and aggregates with leishmanicidal effect, with low toxicity, stimulating phagocytosis and production of reactive oxygen and nitric oxide species, but not leading to macrophage polarization in the M1 profile in an in vitro model of infection by *Leishmania (L.) infantum*.

Keywords: Visceral leishmaniasis; Furazolidone; Cyclodextrin complexation, immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química da furazolidona 16
- Figura 2.** Estrutura molecular a) β -ciclodextrina e da b) Hidroxipropil- β -ciclodextrina 17
- Figura 3.** Papel da saliva dos vetores flebotomíneos na polarização de macrófagos durante a infecção por *Leishmania* spp. 22
- Figura 4.** Polarização de células T auxiliares e participação de neutrófilos nas respostas efetoras à *Leishmania*. 24
- Figura 5.** Sequência de eventos para identificação de Macrófagos polarizados em M1 ou M2, após ensaio de imunofenotipagem 43
- Figura 6.** Diagrama PRISMA para estratégia de seleção do estudo (adaptado da recomendação PRISMA). 44
- Figura 7.** Células J774 tratadas com FZD ou FZD-CD por 48 horas para obter os respectivos valores de CC_{50} . 47
- Figura 8.** Promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com por 48 horas para obter os respectivos valores de IC_{50} . 50
- Figura 9.** Células J774 infectadas com *L. (L.) infantum* nas formas promastigotas. Após 24 horas de infecção, as células receberam diferentes tratamentos e incubadas por 48 horas. A) ICA_{50} : concentração inibitória 50. B) Imagens de macrófagos sem tratamento, tratadas com a FZD ou com produtos de complexação. 51
- Figura 10.** Efeito da administração de FZD e FZD-CD sobre capacidade fagocítica de macrófagos J774 tratadas por 48 horas nas concentrações de 3 e 0,3 $\mu\text{g/mL}$ com zimosan. 54
- Figura 11.** Formação de espécies reativas de oxigênio em J774 tratadas com furazolidona e com as misturas físicas da furazolidona-hidroxipropil- β -ciclodextrina. 55
- Figura 12.** A avaliação da fluorescência de óxido nítrico em J774 56
- Figura 13.** Porcentagem de células J774 polarizadas em macrófagos classicamente ativados (M1), e macrófagos alternativamente ativados (M2). 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos produtos de complexação utilizados neste estudo.	33
Tabela 2. Descrição compilada dos artigos, resumindo mecanismos imunológicos causados pela FZD.	45
Tabela 3. Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da FZD e dos produtos de complexação com ciclodextrinas frente a células J774.	48
Tabela 4. Valores de Inibição de Crescimento (IC ₅₀) e índice de seletividade para formas promastigotas e amastigotas.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CC	Concentração citotóxica
CCL2/MCP-1	Ligante 2 de quimiocina motivo CC/ proteína quimioatrativa de monócitos 1
CCR2	Receptor de quimiocina C-C tipo 2
CD	Ciclodextrinas
CD4+	Linfócito T auxiliar CD4
EROS	Espécie reativa de oxigênio
FZD	Furazolidona
FZD-CD	Furazolidona - ciclodextrina
HIV	Vírus da imunodeficiência
HPβCD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
IC₅₀	Inibição de crescimento de 50% dos parasitos
ICA₅₀	Inibição de crescimento de 50% de amastigotas
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
IS	Índice de seletividade
LBFZD1:1	Liofilização furazolidona: β -ciclodextrina, proporção 1:1
LBFZD1:2	Liofilização furazolidona: β -ciclodextrina, proporção 1:2
LC	Leishmaniose cutânea
LHFZD1:1	Liofilização furazolidona:hidroxipropil- β -ciclodextrina, proporção 1:1
LHFZD1:2	Liofilização furazolidona:hidroxipropil- β -ciclodextrina, proporção 1:2
LTB₄	Leucotrieno B ₄
LV	Leishmaniose visceral
M1	Macrófagos M1

M2	Macrófagos M2
MBFZD1:1	Malaxagem furazolidona: β -ciclodextrina, proporção 1:1
MBFZD1:2	Malaxagem furazolidona: β -ciclodextrina, proporção 1:2
MFBFZD1:1	Mistura física furazolidona β -ciclodextrina, proporção 1:1
MFBFZD1:2	Mistura física furazolidona β -ciclodextrina, proporção 1:2
MFHFZD1:1	Mistura física furazolidona:hidroxipropil- β -ciclodextrina, proporção 1:1
MFHFZD1:2	Mistura física furazolidona:hidroxipropil- β -ciclodextrina, proporção 1:2
MHFZD 1:1	Malaxagem furazolidona:hidroxipropil- β -ciclodextrina, proporção 1:1
MHFZD 1:2	Malaxagem furazolidona:hidroxipropil- β -ciclodextrina, proporção 1:2
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
PGE₂	Prostaglandina E2
β-CD	β -ciclodextrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1.	Considerações Imunopatológicas das Leishmanioses	18
2.2.	Patogênese da Leishmaniose Visceral	19
2.3.	Furazolidona	26
3.	HIPÓTESE GERAL	29
4.	OBJETIVOS	29
4.1	Objetivo Geral	29
4.2	Objetivos Específicos	29
5	MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1	REVISÃO SISTEMÁTICA	30
5.1.1	Desenho do estudo	30
5.1.2.	Definição dos componentes da estratégia PICO deste estudo	30
5.2.	ENSAIOS EXPERIMENTAIS	31
5.2.1.	Obtenção da Furazolidona e dos produtos de complexação com as ciclodextrinas	31
5.2.2	ENSAIOS	33
5.2.2.1	Cultivo <i>in vitro</i> de células J774	33
5.2.2.2	Ensaio de Citotoxicidade	34
5.2.2.3	Atividade <i>in vitro</i> contra formas promastigotas <i>Leishmania (L.) infantum</i>	35
5.2.2.4	Infecção de macrófagos e sobrevivência do parasito	36
5.2.2.5	Determinação do índice de seletividade	37
5.2.2.6	Análise de fagocitose por contagem de zimosan	38
5.2.2.7	Detecção fluorimétrica de espécies reativas de oxigênio	38
5.2.2.8	Dosagem de óxido nítrico	39
5.2.2.9	Imunofenotipagem de macrófagos M1 e M2	39
5.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41

6. RESULTADOS	43
6.1 Seleção de estudos e fontes de informação da revisão sistemática.....	43
6.2. Atividade citotóxica da furazolidona e dos produtos de complexação com ciclodextrinas	45
6.3. Atividade leishmanicida <i>in vitro</i> dos complexos furazolidona-ciclodextrina frente às formas promastigotas e amastigota de <i>L. (L.) infantum</i> e análise de índice de seletividade. .	48
6.4. Avaliação da capacidade fagocítica dos macrófagos sobre efeito da administração da FZD e MFHFZD 1:1	51
6.5. Detecção fluorimétrica de espécies reativas de oxigênio (EROs) da FZD e MFHFZD1:1... 53	
6.6. Detecção da produção de óxido nítrico (NO) da FZD e MFHFZD1:1	54
6.7. Imunofenotipagem de macrófagos M1 e M2 da FZD e MFHFZD1:1	55
7. DISCUSSÃO	58
Atividade desenvolvidas durante o período de doutorado (2019 à 2021)	80
ANEXOS:	81

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas com distribuição mundial. Elas apresentam endemicidade em grandes áreas dos trópicos, subtropicais e na bacia do Mediterrâneo, incluindo mais de 98 países. Estimativas apontam que 1 bilhão de pessoas vivem em área de risco para a infecção por *Leishmania*, com incidência de aproximadamente 700 mil a 1 milhão de novos casos por ano. Os dados indicam que ocorram de 600 mil a 1 milhão de novos casos para leishmaniose cutânea (LC) e 50.000 a 90.000 novos casos para leishmaniose visceral (LV) anualmente no mundo (TORRES-GUERRERO et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Nas Américas, as leishmanioses estão presentes em 18 países e a forma clínica mais comum é a LC, enquanto a LV é a forma mais grave e quase sempre fatal, se não tratada (PAHO, 2019). Nos últimos anos, ocorreu um crescente interesse de estudos de prevenção, controle e tratamento da leishmaniose. No Brasil, por exemplo, tal interesse possibilitou evidenciar a disseminação da leishmaniose em áreas anteriormente não endêmicas (ANVERSA et al., 2018).

Em relação as formas clínica da doença, as leishmanioses são caracterizadas pelos seguintes espectros: lesões cutâneas ulcerativas que se desenvolvem no local da picada do flebótomo (leishmaniose tegumentar localizada - LCL), múltiplos nódulos não ulcerativos (leishmaniose cutânea difusa - LCD), múltiplas lesões ulcerosas em variadas regiões do corpo (leishmaniose cutânea disseminada - LCDi), inflamação destrutiva da mucosa (leishmaniose mucocutânea - LMC) e infecção visceral disseminada (leishmaniose visceral - LV) (REITHINGER et al., 2007).

Entre as leishmanioses, a LV provoca um quadro grave e potencialmente fatal, e ao contrário de outras formas clínicas da leishmaniose, os sintomas da LV geralmente sobrevivem internamente, com maior dificuldade de detecção e cura quando comparada as outras leishmanioses. Os agentes etiológicos da LV são os protozoários da espécie *Leishmania donovani* e *Leishmania (L.) infantum*, que infectam o baço, fígado, medula óssea e gânglios linfáticos de

mamíferos infectados, produzindo uma doença sistêmica de início insidioso e curso crônico, com formas subclínicas, moderadas e graves (JAIN; JAIN, 2015). Estas podem alcançar letalidade de até 90% quando não se institui terapêutica adequada e oportuna. A LV atinge populações dos cinco continentes, sendo conhecida na América Latina, como leishmaniose visceral americana (LVA) ou "kala-azar neotropical" (SILVEIRA; CAMPOS, 2016).

Até o momento, os fármacos utilizados no Brasil para o tratamento da LV em humanos são: antimoniato de meglumina (Glucantime®) e a anfotericina B na apresentação lipossomal ou desoxicolato. A farmacoterapia disponível ainda é limitada e muitos desafios precisam ser superados, pois a LV apresenta uma condição complexa muitas vezes exigindo uma abordagem estratégica multifatorial para alcançar o melhor resultado. A eficácia clínica das drogas depende de inúmeros fatores, tais como, área geográfica de infecção, desenvolvimento de resistência, coinfeção LV-HIV e desnutrição. Estas condições levam ao aumento de resistência à ação das drogas, maior tempo de hospitalização e maior custo do tratamento (BEGONA et al., 2013; WHO, 2020).

Considerando que para os medicamentos atualmente utilizados para o tratamento da LV há relatos de efeitos colaterais relevantes associados e, em função dos desafios devido à resistência aos mesmos em regiões endêmicas, faz-se necessária a investigação de compostos ativos para uso na farmacoterapia leishmanicida. Neste contexto, uma tendência na atualidade é o reposicionamento de fármacos e a inclusão destes em novos sistemas de liberação com vistas à reduzir o tempo e o investimento gastos na descoberta de novas moléculas (PUSHPAKOM et al., 2018).

Relatos na literatura demonstram que os derivados dos nitrofuranos, tal como a furazolidona (FZD), apresentam o potencial terapêutico leishmanicida (REIMÃO; TANIWAKI; TEMPONE et al., 2010; CARVALHO et al., 2018). A furazolidona é um fármaco que foi sintetizado no final dos anos de 1940, sendo usada clinicamente como agente antibacteriano e

antiprotozoário. A sua caracterização ocorre pela presença do anel furânico em sua estrutura química, na qual existe um grupo nitro ligado (WHITE 1989) [Figura 1].

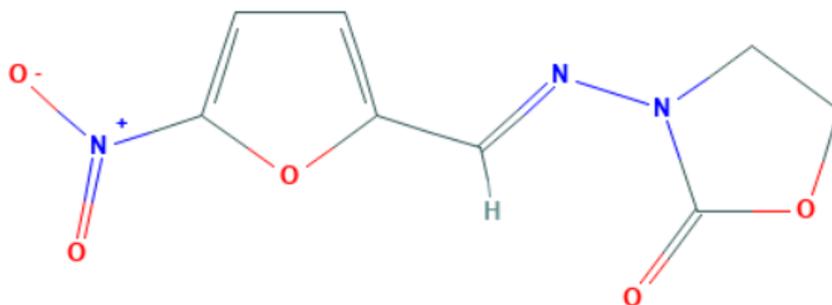


Figura. 1 Estrutura química da furazolidona (Fonte: PubChem 2021).

A atividade leishmanicida da FZD foi inicialmente relatada em meados da década de 80 por Berman e Lee (1983) e por Neal et al. (1988). Trabalhos recentes destacaram a atividade leishmanicida da FZD contra as formas promastigotas de *L. (L.) infantum*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis* (REIMÃO et al., 2010; CARVALHO et al., 2020), nas formas amastigotas de *L. (L.) chagasi* (TEMPONE et al., 2010) e no tratamento da Leishmaniose Cutânea em cães infectados com *L. (V.) braziliensis* (PASSOS et al., 2014).

No entanto, devido à solubilidade da FZD, que influencia diretamente na sua biodisponibilidade, o tratamento com FZD é associado a efeitos adversos como anorexia, perda de peso, incoordenação, fadiga, cardiotoxicidade e genotoxicidade. Estas toxicidades podem estar associadas à administração de altas doses necessárias para obter o efeito farmacológico, uma vez que o medicamento é metabolizado rapidamente (JIN et al., 2001; ALAM et al., 2016). Entre os diferentes artifícios farmacotécnicos disponíveis para aprimorar a solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos, a complexação com ciclodextrinas se destaca como alternativa amplamente utilizada, inclusive, em medicamentos com registros aprovados por agências reguladoras internacionais e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (CARVALHO, 2019). O incremento da solubilidade da FZD pode favorecer a redução na dose

necessária de fármaco para obtenção do efeito terapêutico e, conseqüentemente, diminuir a toxicidade dose-dependente relacionada à FZD. Nos trabalhos realizados por Carvalho et al. (2018; 2020), a formação de complexos de inclusão entre a FZD e ciclodextrinas de interesse farmacêutico foi proposta com esta finalidade.

Ciclodextrinas (CDs) são excipientes farmacêuticos com estrutura molecular única, denominadas de oligossacarídeos macrocíclicos, organizados na forma de cones ocios, que possuem uma cavidade hidrofóbica, formada por cadeias carbônicas e, superfície externa hidrofílica, decorrente da presença de grupamentos hidroxila (OH) (VENTURINI et al., 2008). Tal característica favorece a formação de complexos de inclusão do tipo receptor-substrato, com finalidades diversas e entre as quais se destacam o aumento da solubilidade e diminuição da toxicidade dose-dependente dos fármacos complexados (GIDWANI; VYAS, 2015). As CDs de maior interesse farmacêutico são a β -ciclodextrina (β CD) e a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), uma vez que as mesmas são consideradas excipientes seguros para o uso e já são utilizadas na preparação de medicamentos comercialmente disponíveis (MIRANDA et al., 2011) [Figura 2].

Carvalho et al. (2018; 2020) prepararam complexos de inclusão entre a FZD e a β CD e a HP β CD por diferentes técnicas e avaliaram a citotoxicidade e a atividade leishmanicida dos produtos de complexação contra *L. (L.) amazonensis*, utilizando método *in vitro*. Como resultado, para todos os produtos de complexação formados (complexos e agregados do tipo não-complexos) foi observada ausência de toxicidade sobre as populações de macrófagos estudadas e diminuição na quantidade de fármaco necessária para reduzir a população das formas promastigotas dos parasitos à 50%, quando comparados à forma livre do fármaco. Assim, se faz necessário novos estudos em diferentes modelos de infecção de leishmaniose para compreender o potencial leishmanicida da complexação de FZD com ciclodextrinas.

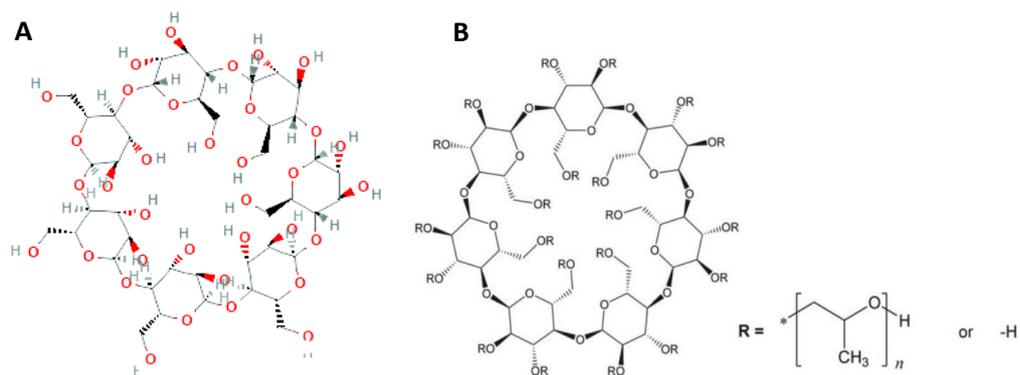


Figura 2. Estrutura molecular a) β -ciclodextrina e da b) Hidroxipropil- β -ciclodextrina. (Fonte: PubChem 2021).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Considerações Imunopatológicas das Leishmanioses

As leishmanioses são doenças com patogênese e mecanismos imunes complexos. São transmitidas para os hospedeiros vertebrados pela picada das fêmeas de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* na África, Ásia e Europa e do gênero *Lutzomyia* nas Américas, infectados com protozoários do gênero *Leishmania* (REITHINGER et al., 2007). As fêmeas desses flebotomíneos ao fazerem o repasto sanguíneo, transmitem as formas infecciosas promastigotas metacíclicas que se ligam aos fagócitos mononucleares do hospedeiro. Esta resposta imune inata provocada pelas células que internalizam o parasito por fagocitose resultam em um fagossoma, que posteriormente se funde com os lisossomas e formam o fagolisossomo. Após a fagocitose, os fagossomos sofrem um processo de remodelamento via maturação e fusão com organelas endocíticas, resultando na formação do vacúolo parasitóforo da *Leishmania* (YOUNG; KIMA, 2019).

No interior do fagócito, o parasito na sua forma promastigota passa por alterações bioquímicas e metabólicas que induzem a sua diferenciação para a forma intracelular obrigatória, as amastigotas. Os parasitos de *Leishmania* são dependentes do aminoácido arginina e de ferro para provocar sua transformação de promastigotas em amastigotas. A privação de arginina, por exemplo, desencadeia uma regulação positiva de um transportador de arginina de alta afinidade, AAP3, pelos amastigotas, que é capaz de fornecer arginina suficiente para satisfazer as necessidades dos parasitos. A arginina também é utilizada pelos fagócitos do hospedeiro, sendo que os macrófagos classicamente ativados utilizam esse aminoácido para gerar óxido nítrico (NO), além de produzirem espécies reativas de nitrogênio por meio da ação de uma enzima chamada óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (RODRIGUEZ; OCHOA; AL-KHAMI, 2017).

Já os macrófagos alternativamente ativados expressam altos níveis de arginase e desencadeiam um influxo líquido de arginina na célula (KROPF et al., 2005; YOUNG; KIMA,

2019). A necessidade de ferro é extremamente importante para entender como as espécies de *Leishmania* spp. se estabelecem e se mantêm durante uma infecção, todavia, os parasitos também são vulneráveis à toxicidade de ferro e espécies reativas de oxigênio (ZAIDI; SINGH; ALI, 2017). E com a diferenciação dos parasitos em amastigotas, estes são liberados pelos fagócitos e, em seguida, podem invadir células dendríticas, fibroblastos, bem como novos fagócitos. Por fim, a prosperidade da infecção pelos protozoários ocorre após diversas táticas de evasão imunológica do parasito, completando assim, o ciclo de vida em amastigotas replicantes (KUMAR; NYLÉN, 2012; RODRIGUES et al., 2016).

A resposta imune adaptativa em pacientes com leishmaniose varia de indivíduos com uma forte resposta de células T, caracterizada por hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) e altos níveis de interferon- γ (IFN- γ), há indivíduos que não apresentam uma resposta HTT, mas podem ter níveis elevados de anticorpos. Como a *Leishmania* spp. é eliminada por macrófagos ativado por IFN- γ e não são totalmente neutralizados por anticorpos, uma vez que as amastigotas se encontram em grande parte no meio intracelular, indivíduos com HTR têm poucos parasitos em suas lesões, enquanto aqueles com predomínio da resposta humoral são incapazes de controlar a carga parasitária (SCOTT; NOVAIS, 2016).

2.2. Patogênese da Leishmaniose Visceral

A principal espécie de flebotomíneo que transmite LV nas Américas é o *Lutzomia longipalpis*, inseto de origem silvestre, com capacidade de se estabelecer e procriar no ambiente peridoméstico, alimentando-se do sangue de animais, principalmente do cão doméstico, que acaba envolvido no ciclo de transmissão, tornando-se a principal fonte de disseminação da doença (SILVEIRA; CAMPOS, 2016; ANVERSA et al., 2018). A LV é caracterizada por febre persistente de baixo grau, hepatoesplenomegalia, caquexia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia. Como indicado anteriormente, o parasito reside principalmente nos

macrófagos do fígado, baço, medula óssea e o curso da doença indica um defeito subjacente no mecanismo de defesa imunológica do hospedeiro (ASAD et al., 2015).

Com base em modelos *in vitro* e *in vivo*, é amplamente aceito que a suscetibilidade a LV está associada à modulação de macrófagos. Os macrófagos desempenham um papel duplo na infecção por parasitos de *Leishmania*. Essas células são responsáveis pela destruição de parasitos internalizados, mas também fornecem um local seguro para a replicação do protozoário (MURRAY; WYNN, 2011). Assim, nota-se que os macrófagos são fundamentais para a progressão da doença, sendo observado que o sucesso ou fracasso da infecção depende da interação entre as espécies de *Leishmania* e o tipo e magnitude da resposta imune do hospedeiro, estando esses dois fatores intimamente relacionados às formas clínicas da leishmaniose (TOMIOTTO-PELLISSIER; TACIANE; ASSOLINI, 2018).

Durante as diferentes fases do processo infeccioso/inflamatório, as alterações microambientais podem polarizar macrófagos em diferentes fenótipos funcionais, de um classicamente ativado (M1) a um fenótipo ativado alternativamente (M2). Esses dois fenótipos são o extremo de um espectro de múltiplos fenótipos tanto quanto os cenários microambientais (BORASHI et al., 2015).

A polaridade M1/M2 surge do metabolismo da arginina por meio de duas vias antagônicas: macrófagos tipo M1 são os produtos da via iNOS, que produz citrulina e NO da arginina, enquanto macrófagos tipo M2 são produtos da via da arginase, que produz ornitina e ureia de arginina (YAO; XU; JIN, 2019).

A polarização de macrófagos M1 pode ser principalmente devido à presença de lipopolissacarídeo (LPS), IFN- γ ou TNF- α que ativam as vias Notch1, NF- κ B e JAK-STAT. Em especial, os macrófagos M2, são divididos nas subcategorias M2a, M2b, M2c e M2d. Esses macrófagos diferem em seus marcadores de superfície celular, citocinas secretadas e funções biológicas. Os macrófagos M2a, por exemplo, são polarizados pelo fator estimulador de colônias

de macrófagos (M-CSF) e IL-4 ou IL-13 (TOMIOTTO-PELLISSIER; TACIANE; ASSOLINI, 2018). É importante ressaltar que embora exista a polarização de macrófagos de M0 para M1 ou M2, sabe-se que essas células têm alta plasticidade e podem ser repolarizadas ou reprogramadas sob estímulos específicos, em outras palavras, macrófagos M1 podem se diferenciar em M2 e vice-versa, dependendo do microambiente e do momento da resposta (WANG; LIANG; ZEN, 2014).

O papel dos subconjuntos de macrófagos na infecção por *Leishmania* não foi investigado completamente. No entanto, o papel fundamental dessas células no desenvolvimento da lesão permite um melhor entendimento dos perfis M1 e M2 como uma ferramenta importante na patogênese da leishmaniose (TOMIOTTO-PELLISSIER; TACIANE; ASSOLINI, 2018).

O sucesso do hospedeiro em controlar a infecção por *Leishmania* também depende dos passos iniciais da transmissão, considerando o papel de moléculas potencialmente imunomodulatórias encontradas na saliva dos vetores. Os vetores da leishmaniose contêm componentes anti-inflamatórios, quimiotáticos e anti-hemostáticos (TEIXEIRA et al., 2005; FEITOSA et al., 2018). A saliva do vetor pode facilitar o recrutamento de células por meio da promoção da vasodilatação. As células recrutadas incluem neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Os neutrófilos podem ser atraídos pela presença de vários mediadores, como o Leucotrieno B4 (LTB₄), sendo que o papel dessas células como um “cavalo de Tróia” favorece o estabelecimento da infecção (TAVARES et al., 2014).

Alguns estudos observaram que a saliva do vetor aumentou o recrutamento de macrófagos para o local da infecção devido à modulação de fatores quimiotáticos, como CCL2/MCP-1 (ligante 2 de quimiocina motivo CC/ proteína quimioatrativa de monócitos tipo 1), CCR2 (receptor de quimiocina C-C tipo 2) e PGE₂ (Prostaglandina E2). A saliva vetorial desempenha um importante papel imunomodulador e favorece o perfil de macrófagos M2 de diferentes maneiras [Figura 3]. Alguns componentes da saliva induzem a produção de IL-10 para

promover ações regulatórias, relacionadas à ativação de uma resposta de linfócitos T auxiliares (T helper, Th) do tipo Th2 por meio do aumento na síntese de IL-4 e IL-6 (NORSWORTHY et al., 2004).

Além disso, os componentes salivares reduzem os parâmetros relacionados ao M1, como as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-12, iNOS e óxido nítrico. Entre os componentes da saliva cita-se o Maxadilan (Max), um peptídeo vasodilatador, que aumenta a produção de IL-6, IL-10 e TGF- β , além de reduzir as citocinas IL-1 β , IL-12p70, TNF- α e IFN- γ (ROGERS; TITUS, 2003).

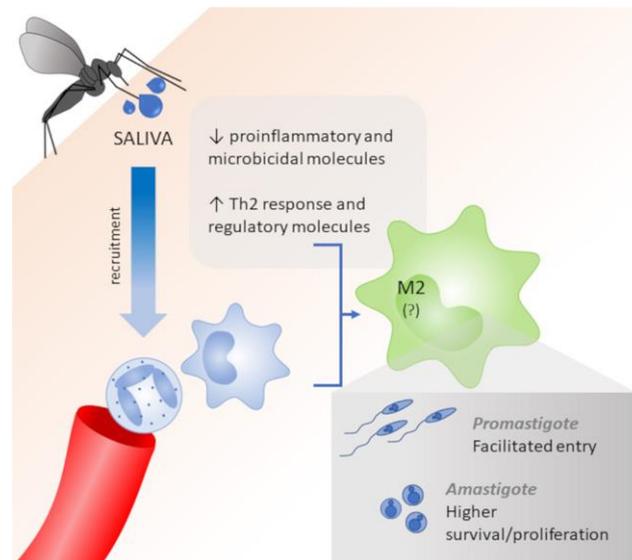


Figura 3. Papel da saliva dos vetores flebotomíneos na polarização de macrófagos durante a infecção por *Leishmania* spp. (Fonte: TOMIOTTO-PELLISSIER; TACIANE; ASSOLINI, 2018).

O controle de uma infecção por *Leishmania* e a progressão da doença correspondente são associados à geração de respostas de macrófagos e linfócitos T auxiliares (CD4⁺) de perfil Th1 e Th2, respectivamente. No entanto, as respostas Th1 exacerbadas podem causar danos graves aos tecidos e também são responsáveis pela apresentação clínica da doença. Por outro lado, a ativação dos linfócitos Th2, que produzem citocinas IL-4 e IL-13, induz o perfil M2 caracterizado pela biossíntese de poliamina através da ativação da enzima arginase (arg) e

produção de ureia e L-ornitina, que são benéficas para o crescimento intramacrófago de *Leishmania* e favorecem a sobrevivência do parasito nos macrófagos infectados levando assim a progressão da doença (TEIXEIRA et al., 2005). Este paradigma Th1 versus Th2 não é uniformemente aplicável a formas variadas de leishmaniose (NYLEN; SHALINI, 2010).

Outras células T, como as células Th9, Th17 e as células T reguladoras (Treg), desempenham papéis importantes na progressão ou melhora da doença, dependendo da espécie de *Leishmania*, bem como do *background* genético (suscetível ou resistente) do hospedeiro (BANERJEE et al., 2016). As células Th9 são frequentemente consideradas um subconjunto de células Th2, geradas por IL-4, mas que requerem a influência adicional do TGF- β a ser reprogramada, bem como IL-2 (JA; KUCHROO, 2010; NOWAK; NOELLE, 2010). Entretanto, estudos examinando o papel da Th9/IL-9 durante a LV são limitados. Já os linfócitos Th17 demonstram influenciar o equilíbrio entre as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, que devem ser orquestradas no curso da infecção para orientar uma resposta efetora bem-sucedida aos protozoários intracelulares de *Leishmania* (THOMAS et al., 2009). Desta forma, é importante mencionar que Th17/IL-17 é um exemplo clássico de uma "espada de dois gumes", embora seja capaz de induzir uma resposta imune protetora a infecção, ela também pode contribuir para a gravidade da doença (BANERJEE et al., 2016).

Por exemplo, a diferenciação das células Th17 em humanos e camundongos é mediada pela ativação de células T *naives* na presença de uma combinação de TGF- β , IL-6, IL-1 β e IL-23. A IL-6 atua em conjunto com o TGF- β para induzir o desenvolvimento de células Th17 efectoras. Entretanto, os estudos têm demonstrado que a disponibilidade de IL-23 e/ou TGF- β é determinante para os fenótipos efetores Th17. Os elevados níveis de TGF- β com uma relativa diminuição de IL-23 favorece a geração de células Th17 "clássicas", enquanto a presença de IL-23 sozinha promove a geração de células Th17 "alternativas". Alguns estudos demonstram que as células Th17 alternativamente ativadas estão mais associadas à progressão das doenças quando

comparadas as células Th17 clássicas (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017) [Figura 4].

Por fim, embora reconhecido diversos componentes que determinam a imunopatologia da LV, ainda há muitos mecanismos a serem desvendados. Em especial mecanismos imunofarmacológicos de terapêuticas na LV. É necessário aprofundamentos da imunofarmacologia na LV porque, apesar dos antimoniais serem empregados no tratamento das leishmanioses há mais de setenta anos, os mecanismos de ação destes fármacos ainda não estão totalmente elucidados. Por exemplo, pacientes imunossuprimidos com leishmanioses respondem pouco aos antimoniais, apresentando 52% de falhas e recidivas após o tratamento (DESJEUX, 1999). Isso indica um efeito cooperativo do sistema imune do hospedeiro e a eficácia do tratamento com os antimoniais. Além disso, diversas drogas têm sido modificadas, possibilitando maior eficácia terapêutica, o que torna necessário maior entendimento dos aspectos imunofarmacológicos, como é o caso do complexo de inclusão furazolidona-ciclodextrinas.

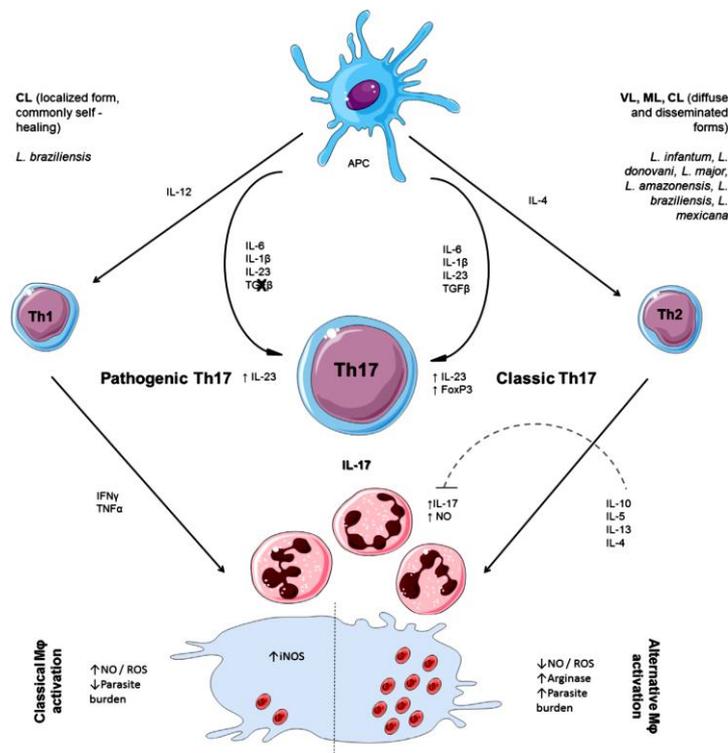


Figura 4. Polarização de células T auxiliares (Th1, Th2 e Th17) e participação de neutrófilos nas respostas efetoras à *Leishmania* (Fonte: GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017).

Em relação à resposta imune humoral, são observadas altas concentrações de anticorpos específicos para *Leishmania* em pacientes com LV, entretanto, esta resposta tem sido mais associada à quadros clínicos desfavoráveis do que à proteção ou à resolução da doença. Pacientes com doença ativa geralmente exibem um quadro de hipergamaglobulinemia policlonal (IgG e IgM) e imunossupressão (KUMAR; NYLÉN, 2012).

Além do mais, estudos apontam que as células B e anticorpos contribuem para a suscetibilidade à leishmaniose pela fixação da fração C3 do complemento, aumentando o dano tecidual e outras reações inflamatórias (DEAK et al., 2010; RONET et al., 2008). Também foi demonstrado que camundongos *knockout* para a porção Fc de imunoglobulinas são resistentes à infecção por *Leishmania* (THOMAS; BUXBAUM, 2008). Em contrapartida, outros estudos mostram a importância da presença de células B para o controle da infecção por *L. (L.) donovani* (SMELT et al., 2000) e seu efeito de diminuição da carga parasitária (BANKOTI et al., 2012).

Na ausência de uma vacina, a quimioterapia é a base para combater a LV, porém, os esquemas terapêuticos atuais estão associados aos efeitos colaterais graves e não podem alcançar uma cura completa em alguns casos. Até o ano 2000, os antimoniais pentavalentes eram o tratamento de primeira linha para a LV. No entanto, com o surgimento de parasitos resistentes ao antimônio, a anfotericina B (Anf-B) foi introduzida, conferindo maiores taxas de cura (95%) em pacientes com LV. Entretanto, Anf-B requer administração intravenosa de longa duração, sendo altamente tóxica e com efeitos adversos frequentes, incluindo febre e calafrios relacionados à infusão, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e hipocalemia (ASAD et al., 2015).

Vários estudos têm sido realizados na busca de novos quimioterápicos com potencial leishmanicida e com menores efeitos adversos. Como destacado, o complexo de inclusão FZ-ciclodextrina apresentou significativo efeito leishmanicida nas formas promastigotas de *L. (L.)*

amazonensis in vitro e com baixa toxicidade. O desafio do presente estudo é verificar se estes efeitos podem ser observados no modelo *in vitro* com promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum*, que provoca leishmaniose visceral, além de avaliar se estes efeitos estão relacionados com a modulação de subpopulações de macrófagos. Tanto quanto se sabe, o tratamento com FZD aumentou a fagocitose de macrófagos em cepas de *Salmonella enteritidis*, sugerindo um aumento no metabolismo oxidativo dos macrófagos (CHADFIELD; HILTON 2004). Nesse contexto, procura-se entender se a FZD ou seus complexados FZD-CD podem de fato aumentar as atividades oxidativas de macrófagos e influenciar a polarização (perfil M1 ou M2) na infecção por leishmaniose visceral.

2.3. Furazolidona

A furazolidona (FZD) é um nitrofurano sintético ativo contra um amplo espectro de bactérias gram-negativas e gram-positivas, além de alguns protozoários. Literaturas recentes relatam que a FZD tem sido aplicada no tratamento da leucemia e da leishmaniose (DAI et al., 2016). A FZD foi sintetizada no final da década de 1940 e é caracterizada pela presença do anel furano em sua estrutura química (LEWKOWSKI; ROGACZ; RYCHTER, 2019). A estrutura química de FZD compreende dois anéis, um anel 5-nitrofurano e um anel 3-amino-2-oxazolidona (AOZ). Em bactérias, a furazolidona é ativada no primeiro anel por metabolismo redutor associado às nitroredutases (TIMPERIO; KUIPER; ZOLLA, 2003).

A atividade bactericida da furazolidona é o resultado de sua capacidade de inibir várias enzimas bacterianas, principalmente aquelas envolvidas no ciclo de Krebs (DE ANGELIS et al., 1999). É reconhecido que interfere na replicação do DNA bacteriano, induzindo ligações cruzadas, além de inibir gradativamente a enzima monoamina oxidase (MAO) (HUTTNER et al., 2015). A MAO é encontrada nas membranas dos microrganismos quando são cultivados com compostos de amina como fonte de nitrogênio. As aminas oxidases em microrganismos são

importantes na inativação biológica de aminas naturais ou sintéticas (LE et al., 2020). Devido à sua ação inibidora da MAO, o FZD aumenta as concentrações de catecolaminas no intestino e em outros tecidos. Foi sugerido que este efeito nas catecolaminas no estômago e no intestino é a base para a atenuação induzida por FZD do efeito anticancerígeno da cisteamina em ratos (HUTTNER et al., 2015; DAI et al., 2016; LEWKOWSKI; ROGACZ; RYCHTER, 2019).

A FZD diminui a atividade da enzima transcetolase, que depende diretamente da disponibilidade de tiamina. A tiamina é metabolizada em pirofosfato de tiamina, um cofator da enzima transcetolase. Por sua vez, a tiamina é catalisada pela MAO e, como a MAO é inibida após a administração de FZD, os níveis de tiamina aumentam e podem causar efeitos simpaticomiméticos, como elevação acentuada da pressão arterial, cefaleia pulsátil grave e hemorragia intracraniana, além da síndrome da serotonina, embora tais efeitos sejam raros após a administração de FZD (SHETNEV et al., 2019).

Até o presente momento o metabolismo da furazolidona e os mecanismos citotóxicos podem variar entre diferentes tipos de células com diferentes capacidades metabólicas, tendo sua citotoxicidade não atribuída a um único intermediário tóxico (ALI, 1999; SHETNEV et al., 2019). Seus espectros de atividade estão relacionados ao potencial redutor de seu grupo 5-nitro, que está entre 250 e 270 mV. A nitroredução, por outro lado, ocorre por redução do tipo I ou II do grupo nitro na presença de redutases parasitas do citocromo P450 NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). Os nitroforanos (NTRs) do tipo I catalisam, em condições anaeróbicas, a redução dos nitrofural (NFs) para produzir hidroxilamina antipatogênica. Em condições aeróbicas, a nitroredução catalisada por NTRs tipo II produz espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROS / RNS), causando estresse oxidativo aos patógenos e morte (ZUMA et al., 2019).

A FZD foi amplamente incluída em aditivos alimentares para a prevenção e tratamento de infecções gastrointestinais causadas por *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em suínos, aves e

gado. Devido à sua carcinogenicidade e mutagenicidade, a furazolidona foi totalmente proibida de ser usada na produção de alimentos para animais no mundo desde 1995 (CHADFIELD; HINTON, 2004).

Outros estudos demonstraram que a administração continuada de FZD, por mais de 30 dias consecutivos, pode induzir cardiomiopatia dilatada (DCM), em peru e ratos (SONG et al., 2019). Estudos têm demonstrado que a indução de DCM pela furazolidona causa diminuição da reserva de energia através do sistema da creatina quinase, contribuindo para a redução da função cardíaca (MCCRACKEN; KENNEDY, 2013). A análise morfométrica mostrou degeneração miocárdica significativa, fibrose intersticial e edema mitocondrial com fratura ou crista dissolvida em ratos alimentados com FZD.

Várias revisões sistemáticas avaliaram a eficácia e segurança de terapias contendo furazolidona para infecção por *Helicobacter pylori*, com baixas taxas de resistência microbiana (KHADEMI; SAHEBKAR, 2020; ZHUGE et al., 2018), além de taxas de erradicação de terapias contendo furazolidona superiores a 80% (MOKHTARE et al., 2015). No entanto, alguns estudos relataram que a incidência de efeitos colaterais intoleráveis de terapias contendo furazolidona foi mais frequente do que a de outras terapias, o que limitou o uso generalizado de furazolidona. Por fim, embora os efeitos terapêuticos do FZD sejam amplamente reconhecidos, o conhecimento dos efeitos imunofarmacológicos do FZD não foi totalmente elucidado. Neste trabalho, buscamos avaliar se a administração *in vitro* com furazolidona possui efeito leishmanicida e imunomodulador nos imunofenotipos de macrófagos (M1 e M2), e se este fármaco complexado com ciclodextrinas (FZD-CD) mantém a imunomodulação, mas com menor citotoxicidade quando comparada a FZD.

3. HIPÓTESE GERAL

A complexação da furazolidona com as ciclodextrinas (β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina) origina complexos e agregados do tipo não-complexos que possuem efeito leishmanicida, com baixa toxicidade, estimulando a fagocitose e a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, polarizando macrófagos no perfil M1 em modelo *in vitro* de infecção por *Leishmania (L.) infantum*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Avaliar *in vitro* a atividade leishmanicida e moduladora da furazolidona (FZD) e dos seus produtos de complexação sobre a infecção de *Leishmania (L.) infantum (in vitro)*.

4.2 Objetivos Específicos

- Investigar quais as ações imunofarmacológicas são descritas pela administração da furazolidona através da elaboração de uma revisão sistemática;
- Verificar a efetividade da FZD e dos seus produtos de complexação sobre a inibição de crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum in vitro*;
- Verificar a citotoxicidade da FZD e dos seus produtos de complexação frente à linhagem celular J774;
- Avaliar o efeito do tratamento da FZD e dos seus produtos de complexação na síntese de óxido nítrico, espécie reativa de oxigênio e fagocitose, frente à linhagem celular J774 infectada e não infectada;
- Avaliar o efeito do tratamento da FZD e dos seus produtos de complexação sobre a polarização de macrófagos M1 e M2 frente a linhagem celular J774.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 REVISÃO SISTEMÁTICA

5.1.1 Desenho do estudo

Foi realizada uma revisão sistemática incluindo ensaios clínicos e estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*. A revisão seguiu as recomendações dos itens de relatório preferidos para revisões sistemáticas e meta-Análise (PRISMA). A pesquisa foi realizada em 3 bases de dados, incluindo MEDLINE/PubMed, Scopus e Web of science. A estratégia de busca utilizou os descritores obtidos no Medical Subject Headings (MESH) da National Library of Medicine com a combinação das palavras-chave “*Furazolidona, mecanismos de ação, farmacologia, uso terapêutico, metabolismo, imunologia, leucócito, linfócitos, monócitos, macrófago, neutrófilos, citocinas e imunoglobulinas*” associadas por meio dos operadores booleanos AND e OR. A busca foi realizada no período de julho de 2020 a junho de 2021.

5.1.2. Definição dos componentes da estratégia PICO deste estudo

Foi seguida a estratégia descrita por Moher et al. (2009), que afirma a existência de quatro componentes para formulação de pesquisa, sintetizado na sigla PICO: P= (problema) I= (intervenção ou indicador), C = (Comparação ou não comparação), O= (Desfecho). Neste sentido os componentes de nosso estudo foram:

P = Uso da furazolidona

I= Efeito imunofarmacológico

C= Sem comparação

O = Mecanismos imunes relacionados

Além disso, a pesquisa seguiu as seguintes etapas: elaboração de uma questão norteadora; definição de descritores para a pesquisa; pesquisa de banco de dados; exclusão de artigos repetidos; definição de critérios de inclusão e exclusão; análise e interpretação dos resultados. Para o direcionamento, foi utilizada a seguinte questão: Quais ações imunofarmacológicas são descritas pela administração de furazolidona? Foram incluídos estudos originais disponíveis em MEDLINE/PubMed, Scopus e Web of science. Foram excluídos estudos que não abordassem as alterações imunológicas causadas pela administração de furazolidona.

5.2. ENSAIOS EXPERIMENTAIS

5.2.1. Obtenção da Furazolidona e dos produtos de complexação com as ciclodextrinas

A etapa de produção e caracterização das complexações foram realizadas no Laboratório de Produção Farmacêutica do Centro de Ciências Exatas, Naturais e de Saúde - CCENS, da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus de Alegre, sob a orientação da Dra. Janaina Cecília Oliveira Villanova e cedidas para os bioensaios desse estudo. Os detalhes de produção e caracterização dessas moléculas foram publicados por Carvalho et al. (2020).

A FZD com 98% de pureza foi complexada com a β -CD e a HP- β -CD. A FZD, a β -CD e HP- β -CD foram adquiridas da empresa Sigma-Aldrich (EUA). A preparação das misturas físicas e complexos de inclusão ocorreram pelos métodos de malaxagem (amassamento) e liofilização, empregando as razões molares 1:1 ou 1:2, ou seja, 225,6 mg de FZD foram complexadas com 1135 mg e com 2270 mg de β -CD; e 225,6 mg de FZD foram complexados com 1460 mg e com 2920 mg de HP- β -CD. As mesmas proporções foram utilizadas para o preparo das misturas físicas (CARVALHO et al., 2018, 2020). A seguinte denominação foi dada aos produtos da complexação descrita na tabela a seguir (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos produtos de complexação utilizados neste estudo.

Legenda das Complexações	DESCRIÇÃO
FZD	Furazolidona
β -CD	β -ciclodextrina
HP β CD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
Produtos de complexação com a BCD (β-ciclodextrina)	
MFBFZD1:1	Mistura física furazolidona β -ciclodextrina, proporção 1:1
MBFZD1:1	Malaxagem furazolidona: β -ciclodextrina, proporção 1:1
LBFZD1:1	Liofilização furazolidona: β -ciclodextrina, proporção 1:1
MFBFZD1:2	Mistura física furazolidona β -ciclodextrina, proporção 1:2
MBFZD1:2	Malaxagem furazolidona: β -ciclodextrina, proporção 1:2
LBFZD1:2	Liofilização furazolidona: β -ciclodextrina, proporção 1:2
Produtos de complexação com a HPBCD (HP-β-CD)	
MFHFZD1:1	Mistura física furazolidona:hidroxipropil- β -ciclodextrina, proporção 1:1
MHFZD 1:1	Malaxagem furazolidona:hidroxipropil- β -ciclodextrina, proporção 1:1
LHFZD1:1	Liofilização furazolidona:hidroxipropil- β -ciclodextrina, proporção 1:1
MFHFZD1:2	Mistura física furazolidona:hidroxipropil- β -ciclodextrina, proporção 1:2
MHFZD 1:2	Malaxagem furazolidona:hidroxipropil- β -ciclodextrina, proporção 1:2
LHFZD1:2	Liofilização furazolidona:hidroxipropil- β -ciclodextrina, proporção 1:2

Finalizada a etapa de obtenção dos produtos de complexação, os mesmos foram submetidos à diferentes métodos físico-químicos de caracterização a fim de avaliar a formação de complexos e de agregados do tipo não-complexo. Os métodos físico-químicos empregados foram: Diagramas de solubilidade de fases, Ressonância magnética nuclear, Espectroscopia no ultravioleta e análise termogravimétrica (CARVALHO et al., 2020).

A malaxagem é um procedimento utilizado na complexação de fármacos de baixa solubilidade em água e que envolve a formação de uma pasta, utilizando gral com pistilo ou em misturadores malaxadores, após adição de um líquido sobre a mistura da CD e o fármaco, seguida de secagem da massa úmida em estufa ou em temperatura ambiente (SANTOS et al., 2004). Já a liofilização, ocorre em meio líquido, e é indicada para fármacos de maior solubilidade em água e substâncias termolábeis. No método, a CD e o fármaco devem ser dispersos na água ou em mistura hidroalcolica, sob agitação, e em seguida, a mistura é liofilizada. O processo é passível de ser utilizado em grande escala (CARVALHO, 2019).

Além dos processos de complexações, foram realizadas misturas físicas da FZD com as ciclodextrinas. A mistura física é utilizada como termo de comparação (NAIDU et al., 2004). Por fim, o procedimento de mistura física se baseia na mistura simples dos componentes, sem adição de água ou solução hidroalcoólica. É uma técnica de baixa eficiência de complexação, geralmente usada para a obtenção de produtos de uso como controle nas análises de caracterização do complexo (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

5.2.2 ENSAIOS

5.2.2.1 Cultivo *in vitro* de células J774

A célula J774 é uma linhagem de macrófagos imortalizados, oriundas de camundongos BALB/c. Estas células têm sido empregadas como modelo experimental para ensaios que avaliam a capacidade fagocítica, integridade lisossomal, atividade metabólica, atividade tumoricida, produção de espécies reativas de oxigênio, produção de citocinas e polarização macrofágica (MURPHY et al., 2008; TANAKA et al., 2018). A linhagem celular utilizada neste estudo tem sido devidamente preservada e empregada como modelo experimental pela Plataforma de Bioensaios de Leishmaniose e Malária da Fundação Oswaldo, FIOCRUZ –RO, onde foram realizados os ensaios *in vitro*.

Previamente aos ensaios, as células foram cultivadas conforme sugerido por Calvo-Calle et al. (1994). As linhagens foram mantidas em garrafas de cultura de 75cm² (Corning) suplementadas em RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco/Invitrogen) e 40 mg/L de gentamicina (Schering-Plough). As células permaneceram em estufa com 5% de CO₂, a 95% de umidade e a 37°C e o meio das garrafas substituído a cada dois dias. Após confluência de cerca de 80%, a cultura de células foi repicada, ou utilizada nos ensaios de citotoxicidade (MADUREIRA et al., 2002).

5.2.2.2 Ensaios de Citotoxicidade

Visando entender o potencial tóxico dos compostos, foram realizados ensaios de citotoxicidade utilizando as células J774, o teste empregado foi o método de MTT (3- [(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio]). O ensaio baseia-se na redução de sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas, ligada ao NADH e NADPH, formando cristais insolúveis de formazan, de coloração azul ou roxa. A coloração azul ou roxa é, portanto, um quantificador da viabilidade das células (MOSMANN, 1983).

Assim, para iniciar o teste de citotoxicidade, as células obtidas foram contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer com auxílio do corante azul de Trypan (Sigma) e a suspensão ajustada para 1×10^4 células/mL e 180 μ L de meio RPMI completo acrescentados a cada poço da microplaca. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas dos compostos FZD, β -CD, H β -CD, e dos complexados (identificados na Tabela 1), nas concentrações de 500-3,9 μ g/mL. Os controles utilizados neste ensaio foram: controle positivo de viabilidade com células não tratadas e controle negativo de morte de células tratadas com tampão de Lise (20 mM de Tris-HCl, 5 mM de EDTA, 0,08% de Triton X-100, 0,008% de saponina em PBS 1x, em pH 7,5) e meio RPMI completo (branco).

Após o período de tratamento de 48 horas foram adicionados em cada poço, 20 μ L de MTT a uma concentração de 5 mg/mL em PBS (p/v) e as placas incubadas por quatro horas em estufa CO₂ a 37 °C. Ao final desse período, o sobrenadante de cada poço foi desprezado e 100 μ L de DMSO (Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada poço.

A leitura óptica foi realizada utilizando um espectrofotômetro de microplacas (Biochrom Asys, Expert Plus, Holliston, USA) em λ de 570 nm. A citotoxicidade das doses testadas foi determinada com base na porcentagem de viabilidade celular frente ao tratamento controle (veículo, 0,6% DMSO). A concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi determinada

a partir de regressão linear das concentrações testadas, utilizando o programa Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). Concentrações não citotóxicas, empregando a estimativa de 90% de viabilidade celular, foram determinadas para a realização do ensaio 5.2.2.4. Após a obtenção do valor de CC_{50} para as células foi calculado o índice de seletividade (IS) da FZD e dos seus produtos de complexação (item 5.2.2.5).

5.2.2.3 Atividade *in vitro* contra formas promastigotas *Leishmania (L.) infantum*

As formas promastigotas de *L. (L.) infantum* (MCAN/BR/97/P142), foram cedidas pelo Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Universidade Estadual de Maringá. O cultivo do parasito ocorreu em estufa incubadora BOD (Tecnal) com temperatura média de 24 °C em meio RPMI (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) completo suplementado com soro fetal bovino (SFB), previamente inativado à 10% (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), L-glutamina a 2 mM, 20 nM HEPES (N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-22, ácido etanosulfônico (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 50 µg/mL de Gentamicina (Sigma-Aldrich).

Para determinar a Inibição de Crescimento de 50% dos parasitos (IC_{50}), promastigotas em fase estacionária de cultivo foram contadas em câmara de Neubauer, e em seguida ajustadas a 1×10^6 parasitos/mL em meio RPMI completo e distribuídas no volume de 180 µL dessa concentração de parasitos em microplacas de 96 poços (NUNC, Roskilde, Dinamarca). Juntamente foi adicionado o volume de 20 µL de FZD, a β CD, HP β CD e das referidas complexações (descritas na Tabela 1) nas concentrações seriadas de 200-0,097 µg/mL. As microplacas foram incubadas a 24° C em estufa BOD por 48 horas. Juntamente, foram utilizados controles positivos de parasitos sem tratamento, negativo com 2 µM de anfotericina B (Unianf®), meio RPMI-1640 (branco).

Após o tratamento, foram adicionados 20 µL (2 mM) de uma solução de resazurina (Sigma-Aldrich) a cada poço, em seguida, as placas foram incubadas em estufa BOD a 24° C por cinco horas. A leitura da fluorescência ocorreu um espectrofotômetro (Biotek, Synergy) nos parâmetros 530/25 (excitação) e 590/35 (emissão) (Adaptado de ROLÓN et al., 2006). Os valores obtidos foram processados pelo programa Gen5® 5.11. A viabilidade parasitária foi analisada de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{(\text{fluorescência teste} - \text{fluorescência Branco}) \times 100}{(\text{fluorescência controle} - \text{fluorescência Branco})}$$

A inibição de crescimento para 50% dos parasitos (IC₅₀) foi determinada por intermédio de curvas dose resposta, em função de regressão não linear, por meio do programa Origin (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, EUA, Versão 9.1).

5.2.2.4 Infecção de macrófagos e sobrevivência do parasito

As células J774 foram infectadas com *L. (L.) infantum* (1:30 célula/parasitos). Inicialmente houve o processo de adesão das células aos poços das microplacas, 200 µL de cultura diluída com promastigotas de *L. (L.) infantum* (2,5x10⁶ parasitos/mL) que foram acrescentados às placas de 24 poços (contendo lamínulas redondas estéreis de 13 mm) e microplacas de 96 poços. Em seguida, as placas foram incubadas a 32° C, 5% de CO₂ durante 24 horas para que ocorresse a infecção. Posteriormente, ao período de infecção, ocorreu a lavagem dos poços com PBS 1X para remoção das promastigotas não internalizadas (CALLAHAN et al., 1996).

Após o período de infecção, as amastigotas foram tratadas com a FZD e seus produtos de complexação descritos na Tabela 1 nas concentrações seriadas 200-0,097 µg/mL. Como controle positivo foram usados macrófagos infectados por *L. (L.) infantum* incubados com meio RPMI-1640 completo, para o controle negativo, foram usados macrófagos infectados e tratados

com Anfotericina B (2-0,004 μ M) e poços contendo somente meio RPMI-1640 completo. As microplacas de 96 e placas de 24 poços (com lamínulas – contraprova dos resultados obtidos das microplacas de 96 poços) foram incubadas a 32° C, 5% de CO₂ durante 48 horas.

O valor de Inibição de Crescimento de 50% de Amastigotas (ICA₅₀) foi determinado por fluorescência usando a resazurina (ROLÓN et al., 2006). Os resultados foram expressos nos valores de índice de ICA₅₀, seguindo a fórmula:

$$\text{ICA (\%)} = 100 - \frac{(\text{Fluorescência teste} - \text{Fluorescência Branco} \times 100)}{(\text{Fluorescência controle sem tratamento} - \text{Fluorescência do Branco})}$$

Onde: Fluorescência Branco = foi obtida das células infectadas e tratadas com a concentração de Anfotericina (3 μ g/mL) 100% citotóxica para os parasitos; Fluorescência teste = obtida das células tratadas pelo composto teste; Fluorescência controle sem tratamento = obtida das células infectadas e não tratadas, ou seja, mantidas em meio RPMI.

Após o cálculo da inibição de cada ponto da concentração, com auxílio do programa Origin, foi possível calcular em qual concentração ocorre a inibição de 50% dos parasitos nas formas amastigotas (ICA₅₀).

5.2.2.5 Determinação do índice de seletividade

O cálculo de índice de seletividade consiste na razão entre os valores de CC₅₀ frente aos valores de IC₅₀ ou ICA₅₀. O valor de IS refere-se a quantas vezes a FZD, a β CD, HP β CD e as referidas complexações são seletivas ao parasito em relação a célula J774 (KATSUNO et al., 2015). Quando não alcançado o valor de CC₅₀, o IS foi determinado como maior do que a razão entre a maior concentração testada e os valores de IC₅₀ / ICA₅₀.

5.2.2.6 Análise de fagocitose por contagem de zimosan

Para os ensaios descritos a partir desse item 5.2.2.6, foram pré-selecionados os compostos mais efetivos e com melhor índice de seletividade. Uma suspensão de células J774 (3×10^5 /poços) foi cultivada em placas de 24 poços contendo lamínulas e incubada por 12 a 16 horas em estufa a 37° C, 5% de CO₂ e 95% de umidade para adesão das células aos poços. Em seguida, as células foram lavadas em meio RPMI-1640 incompleto e ressuspensas em meio RPMI-1640 completo juntamente com as devidas concentrações de FZ ou FZ-CD e zimosan. O tratamento ocorreu por 48 horas em estufa a 37° C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS 1X a 24° C, as lamínulas foram fixadas com metanol puro por 10 minutos e coradas com Giemsa (1:10) por 8 minutos. As lamínulas de vidro foram fixadas em lâminas usando Entellan® (Merck). A contagem ocorreu na proporção de 300 células/quantidade de partículas internalizadas, com auxílio de microscópio óptico, em objetiva de 100x com óleo de imersão (RODRIGUES et al., 2012). Foram considerados positivos os macrófagos que englobaram 3 ou mais partículas de zimosan e negativos os que englobaram menos de 3 partículas. Os resultados foram analisados por comparação entre os grupos controles, grupos tratados e grupos sem tratamento.

5.2.2.7 Detecção fluorimétrica de espécies reativas de oxigênio

Células J774 na concentração de 3×10^5 /poços, foram cultivadas em placas de 24 poços, e incubadas por 12 horas em estufa a 37° C, 5% de CO₂ e 95% de umidade para adesão das células. Em seguida, as células foram lavadas em meio RPMI-1640 incompleto e ressuspensas em meio RPMI suplementado juntamente com as devidas concentrações (3 µg/mL e 0,3 µg/mL) dos compostos pré-selecionados mais efetivos e com melhor índice de seletividade. As células receberam as concentrações de tratamento por 48 horas em estufa a 37° C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após o período de tratamento, as células foram retiradas dos poços das placas com

auxílio de *cell scraper* e ocorreu a lavagem utilizando PBS 1x. O *pellet* celular foi ressuspensão em PBS 1X juntamente com o marcador H₂DCFDA (Sigma-Aldrich) e incubados por 45 minutos. A fluorescência foi obtida nos comprimentos de onda de excitação: 485/20 nm e emissão: 528/20 nm. Como controle negativo foi utilizado células não tratadas e como controle positivo, células tratadas com Forbol-12-Miristato-13-acetato (PMA-Sigma-Aldrich) a 5 µM (CAMINI et al., 2017).

5.2.2.8 Dosagem de óxido nítrico

Semelhantemente ao ensaio anterior, as células J774 (3x10⁵/poços) foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas por 12 horas em estufa a 37° C, 5% de CO₂ e 95% de umidade para adesão das células aos poços. Em seguida, ocorreu a lavagem utilizando meio RPMI-1640 incompleto, para remoção das células não aderidas. Após isso, ocorreu adição do meio RPMI suplementado juntamente com as devidas concentrações de FZ e FZ-CD (3 µg/mL e 0,3 µg/mL), o tratamento ocorreu por 48 horas em estufa a 37° C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após o tratamento, as células foram removidas dos poços das placas com auxílio de *cell scraper* e lavadas com PBS 1x. O *pellet* celular foi ressuspensão em PBS 1X juntamente com o marcador Diacetato DAF-FM (diacetato de 4-amino-5-metilamino-2', 7'-difluorofluoresceína-Sigma-Aldrich) e incubados por 30 minutos. A leitura da fluorescência foi obtida nos comprimentos de onda de excitação 485/20 nm e emissão 528/20 nm. Como controle negativo foi utilizado células não tratadas e como controle positivo, células tratadas com Forbol-12-Miristato-13-acetato (PMA-Sigma-Aldrich) a 5 µM (CAMINI et al., 2017).

5.2.2.9 Imunofenotipagem de macrófagos M1 e M2

A avaliação do efeito da FZ ou FZ-CD sobre a polarização de macrófagos M1 e M2, foi através de citometria de fluxo, com a metodologia adaptada pelo trabalho de Murphy et al.

(2008). A linhagem celular de macrófagos utilizada foi a J774. Foi determinada a influência da FZ e FZ-CD sobre o fenótipo de macrófagos em um sistema de cultura *in vitro*. As células em fase de crescimento logarítmico foram incubadas durante 48 horas com IFN- γ (100 ng/mL) ou IL-4/IL-13 (30 mM), juntamente com FZ ou FZ-CD nas melhores concentrações de inibição de crescimento de amastigota (ICA) a uma densidade de 2×10^5 células/mL em placas de 24 poços.

As condições de controle incluíram células tratadas e não tratadas, com e sem citocinas, com e sem FZ ou FZ-CD. As células foram colhidas e centrifugadas 1000xg por 10 minutos e as suspensões de únicas células foram imediatamente utilizadas para imunofenotipagem.

As células J774 foram incubadas com múltiplos anticorpos monoclonais conjugados com fluorescências específicas para marcadores de superfície de células de macrófagos de camundongo para diferenciar macrófagos dos fenótipos M1 e M2. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anticorpo anti-receptor de manose de camundongo (MR) conjugado a ficoeritrina (PE) (Serotec, Raleigh, NC, EUA), anticorpo de rato anti-CD206 de camundongo conjugado a ficoeritrina (PE) (Serotec, Raleigh, NC, EUA) e anticorpo de rato CCR7 anti-camundongo conjugado a ficoeritrina (PE) (Serotec, Raleigh, NC, EUA). Esses receptores específicos foram escolhidos com base em seus papéis em macrófagos alternativamente e classicamente ativados.

As suspensões de células únicas foram lavadas antes e após a coloração com 2 mL de PBS contendo 0,1% de BSA e 0,02% de azida de sódio, e a marcação foi realizada em 100 μ L deste tampão. Todas as células foram analisadas quanto ao fenótipo por análise multiparmétrica por citometria de fluxo usando um CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter). Aproximadamente 50.000 eventos por amostras foram examinados rotineiramente. A porcentagem de células com coloração positiva para cada proteína de superfície foi determinada comparando as amostras de teste com as amostras não coradas e as coradas com isotipo controle.

A identificação dos subtipos de macrófagos M1 e M2 foram realizadas primeiramente com um gráfico de FSC (Tamanho) X SSC (Complexidade) e uma “gate” foi criada na região

dos macrófagos totais (J774). Em seguida foram selecionadas as populações positivas para M1 e M2 [Figura 5].

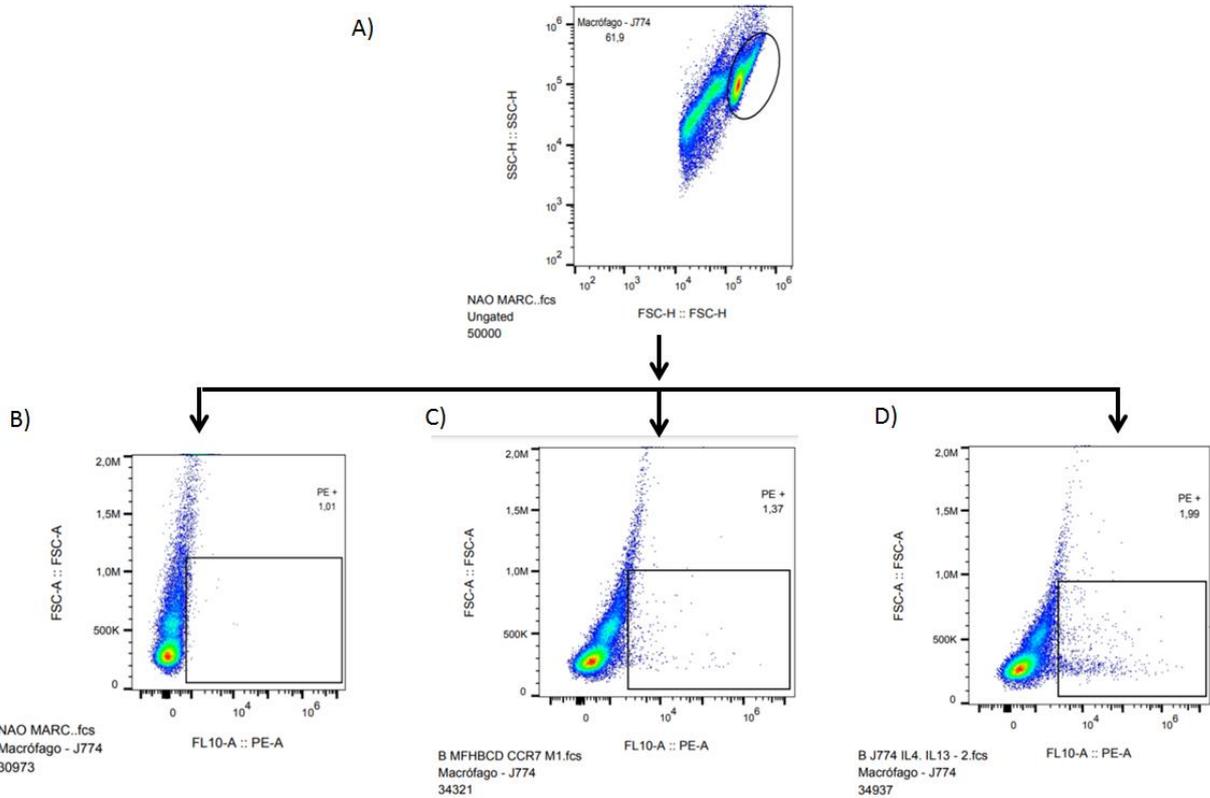


Figura 5. Sequência de eventos para identificação de Macrófagos polarizados em M1 ou M2, após ensaio de imunofenotipagem (software FlowJo v9.4). A) Gate macrófagos totais. B) Macrófagos não marcados. C) Macrófagos estimulados para M1 (IFN- γ , CCR7). D) Macrófagos estimulados para M2 (IL-4/IL13, CD206).

5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 7.0 e Origin versão 9.1. Os ensaios foram realizados em triplicatas de poços e os valores foram observados com base de no mínimo três experimentos independentes. A influência dos diversos tratamentos sobre as variáveis estudadas, em função da concentração e tipo de complexação foi estatisticamente analisada através de One-way Anova seguida do pós-teste de Tukey. Para as análises entre dois fatores foi aplicado Teste t não pareado. Os fatores analisados foram: tipo de tratamento, concentração e a interação tratamento x concentração. Nos casos em que houve

diferença estatística, o nível de significância foi fixado em $p < 0,05$. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (Dp).

6. RESULTADOS

6.1 Seleção de estudos e fontes de informação da revisão sistemática

A seleção dos arquivos disponíveis, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, resultou em 943 artigos. Destes artigos, resultantes da pesquisa com as palavras-chave, 605 foram repetidos e foram excluídos. Além disso, 303 foram excluídos por não responderem à questão norteadora. Assim, 35 artigos foram incluídos para elegibilidade, e destes, 4 foram selecionados, conforme Fluxograma apresentado na Figura 6. Além disso, o ano de publicação de cada estudo analisado, os autores e o mecanismo imunológico relacionado estão listados na tabela 2.

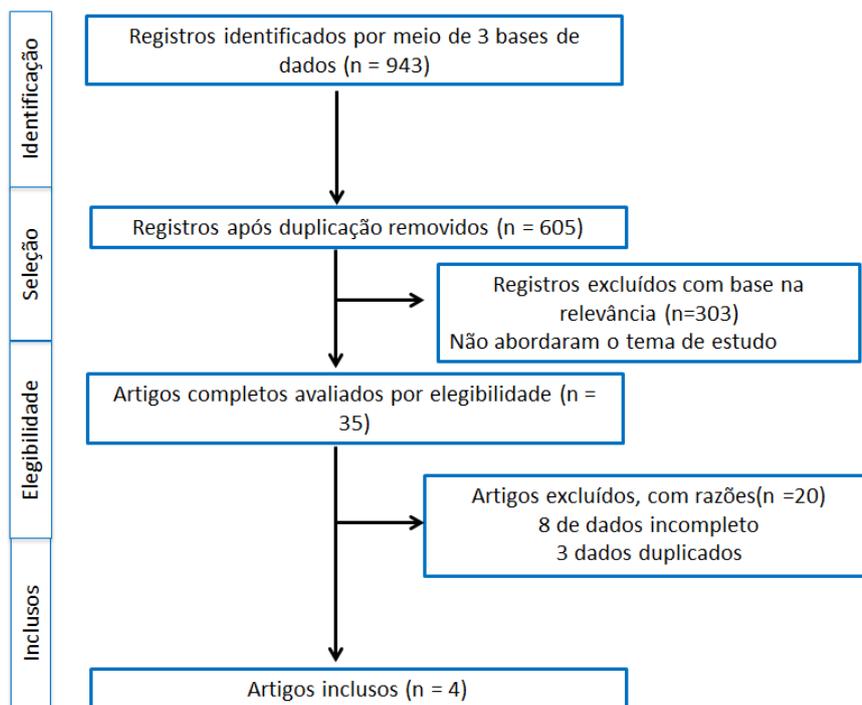


Figura 6. Diagrama PRISMA para estratégia de seleção do estudo (adaptado da recomendação PRISMA).

Embora a FZD seja amplamente utilizada como terapia em várias condições patológicas, os estudos sobre a eficácia associada às respostas imunes ainda são limitados. Os resultados projetados em nosso estudo demonstraram baixa representatividade de trabalhos, sendo um fator

conflitante que impediu a metanálise. Além disso, os trabalhos foram consistidos em variações relacionadas à randomização e ao sigilo da alocação dos estudos (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição compilada dos artigos, resumindo mecanismos imunológicos causados pela FZD.

Autor/Ano	Resposta Imune	Evidência
Sun et al. (2013)	A FZD ativa a via p38 MAPK, com provável estimulação da produção de citocinas inflamatórias.	I) Ensaios com cultura de células HepG2. II) A FZD induziu a parada do ciclo celular na fase S e suprimiu o crescimento celular; III) A FZD aumentou a atividade de fosforilação p38 (p-p38); IV) Diminuiu a atividade de JNK fosforilado (p-JNK).
Deng et al. (2016)	A FZD induz a via p21, estimulando a produção de espécie reativas de oxigênio (EROS), provocando apoptose pela ativação da via da caspase-3.	I) Ensaios com cultura de células HepG2. II) A FZD regulou a expressão de p21 através da inibição da via PI3K/Akt.
Chadfield & Hinton (2004)	A FZD aumentou o efeito bactericida e a fagocitose de macrófagos sobre as cepas de <i>Salmonella enteritidis</i> .	I) Ensaios com co-cultura; macrófagos extraídos do peritônio de frangos Leghorn + cepa de <i>Salmonella enteritidis</i> II) A exposição da cepa a concentrações subinibitórias de FZD levou a um aumento da fagocitose e um aumento no metabolismo oxidativo.
	A FZD apresentou baixa citotoxicidade, e diminuição da	I) Ensaios com células mononucleares do sangue

Otta et al. (2018)	produção de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, tais como IFN- γ , TNF- α e IL-10.	periférico (PBMC) de indivíduos não infectados e pacientes com doença de Chagas crônica. II) A FZD induziu o aumento do índice de exposição de monócitos e linfócitos T em estágios finais de apoptose.
--------------------	--	--

6.2. Atividade citotóxica da furazolidona e dos produtos de complexação com ciclodextrinas

A FZD assim como seus derivados complexados com diferentes proporções de β -ciclodextrina (β -CD) e hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) foram avaliados em relação ao potencial de citotoxicidade frente às células J774. Para análise dos resultados de concentração citotóxica (CC₅₀) foi destacado o equivalente de furazolidona livre, presente nos diferentes produtos de complexação obtidos (Tabela 3). Para facilidade de interpretação, estes valores são apresentados na coluna 3 da referida Tabela.

Ao analisar os resultados de citotoxicidade é possível observar que a FZD livre apresentou CC₅₀ de 9,35 μ g/mL. Outrora, quando a FZD foi complexada por diferentes métodos (malaxagem, liofilização e mistura física), todos os produtos de complexação apresentaram menores citotoxicidade, e esta diferença foi significativa quando comparada a FZD ($p < 0,001$) [Figura 7A, B].

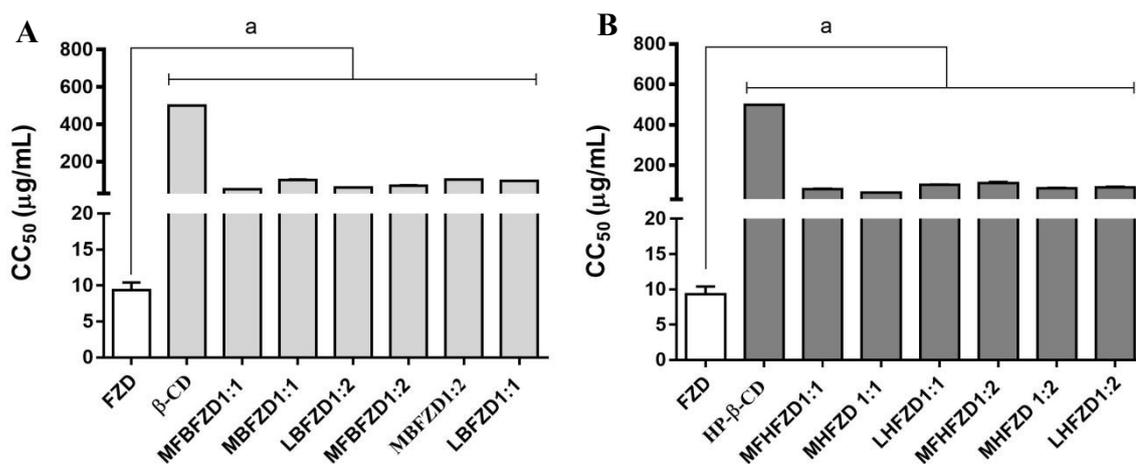


Figura 7. Valores de CC₅₀ obtidos a partir de Células J774 tratadas por 48 horas. **A:** análise estatística da FZD em relação a β-ciclodextrina em diferentes métodos de complexações e proporções. **B:** análise estatística da FZD em relação a hidroxipropil-β-ciclodextrina em diferentes complexações e proporções. β-CD: células J774 tratadas com β-ciclodextrina, HPβCD: células J774 tratadas com hidroxipropil-β-ciclodextrina. Os resultados referem-se à média e desvio padrão (±) de três experimentos independentes. Colunas marcadas com (a) representam diferença estatística em relação a FZD (***) = p<0,001). Nas análises foi aplicado o teste Anova seguido por pós-teste de Tukey.

Entre os métodos de complexação com β-ciclodextrina, os produtos obtidos pelo método de malaxagem, foram os menos citotóxicos, na proporção de 1:1 (MBFZD1:1) CC₅₀ de 102,95 µg/mL, e na proporção de 1:2 (MBFZD1:2) CC₅₀ apresentou valor de 105,95 (Tabela 3), não havendo diferença significativa entre eles. Todos os produtos de complexação de FZD- β-CD em suas diferentes proporções induziram a uma melhoria que variou de 5,6 à 11,3 vezes (com MFBFZD1:1, MBFZD1:2) quando comparada a citotoxicidade de FZD livre.

Os resultados de citotoxicidade referentes aos produtos de complexação de FZD com HPβCD, liofilização na proporção de 1:1 (LHFZD1:1), e a mistura física na proporção 1:2 (MFHFZD1:2) apresentaram os melhores resultados CC₅₀ de 100,95 µg/mL e 109,5µg/mL, respectivamente. Foi possível observar que os produtos de complexações de FZD com HP-β-CD diminuiriam significativamente (p<0,001) a citotoxicidade da FZD refletindo uma melhoria de 6,6 à 11,7 vezes (com MHFZD 1:1 e MFHFZD1:2).

A citotoxicidade foi maior nas complexações com β -CD, quando comparada as complexações com HP- β -CD. A complexação de malaxagem com β -ciclodextrina na proporção 1:1 (MBFZD1:1 CC_{50} de 102,75 $\mu\text{g/mL}$) e 1:2 (MBFZD1:1 CC_{50} de 105,95 $\mu\text{g/mL}$), bem como a complexação de liofilização com hidroxipropil- β -ciclodextrina na proporção 1:1 (LHFZD1:1 CC_{50} de 100,95 $\mu\text{g/mL}$) e 1:2 (LHFZD1:2 CC_{50} de 88,43 $\mu\text{g/mL}$) não apresentaram diferenças entre si quanto a citotoxicidade. Por fim, não foi observada citotoxicidade das ciclodextrinas β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina livremente (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividade citotóxica *in vitro* da FZD e dos produtos de complexação com ciclodextrinas frente a células J774.

Complexação	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ($\bar{X} \pm DP$)	Quantidade de FZD presente no produto de complexação ($\mu\text{g/mL}$)
Materiais de partida		
FZD	9,35 \pm 1,06	-
β -CD	> 500	-
HP β CD	> 500	-
Produtos de complexação com a BCD		
MFBFZD1:1	52,4 \pm 1,7 (a)	8,69
MBFZD1:1	102,75 \pm 3,46 (a)	17,04
LBFZD1:1	97,6 \pm 0,71 (a)	16,18
MFBFZD1:2	73,25 \pm 2,62 (b)	7,28
MBFZD1:2	105,95 \pm 0,49 (a)	10,53
LBFZD1:2	62,1 \pm 0,28 (b)	6,17
Produtos de complexação com a HPBCD		
MFHFZD1:1	79,9 \pm 2,83 (a) *	10,69
MHFZD 1:1	62,25 \pm 0,21 (a) *	8,33
LHFZD1:1	100,95 \pm 2,33 (a)	13,51
MFHFZD1:2	109,5 \pm 6,15 (b) *	17,96
MHFZD 1:2	85,05 \pm 2,62 (b) *	6,10
LHFZD1:2	88,43 \pm 4,38 (a) *	6,34

CC_{50} : Concentração citotóxica para 50% de células J774, FZD: furazolidona, β CD: β -ciclodextrina, HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina. Para β CD letras iguais entre parênteses (a; a) não representam diferença estatística entre as proporções 1:1 e 1:2 de cada método de complexação (Mistura física, Malaxagem e Liofilização). Para β CD letras diferentes entre parênteses (a; b) indicam significância estatística ($p < 0,05$) entre as proporções 1:1 e 1:2 de cada método de complexação. Para essas análises foi aplicado Anova seguido por pós-teste de Tukey. Essa mesma análise estatística foi reproduzida para os complexados com HP β CD. Uma análise complementar foi realizada aplicando o Teste t não pareado, assim foram marcados com * indicando significância estatística (* = $p < 0,05$) quando pareado os produtos complexados com o mesmo método e proporção diferenciando somente o produto de complexação entre β CD e HP β CD em relação a CC_{50} . Observa-se nessa análise que somente o produto LHFZD1:1 não difere estatisticamente de LBFZD1:1. $\bar{X} \pm DP$: resultados correspondem à média e desvio padrão de três experimentos independentes para cada amostra.

6.3. Atividade leishmanicida *in vitro* dos complexos furazolidona-ciclodextrina frente às formas promastigotas e amastigota de *L. (L.) infantum* e análise de índice de seletividade.

A atividade leishmanicida frente às formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum* também foram avaliadas para FZD e seus complexados β -CD ou HP- β -CD nas diferentes proporções.

Os resultados da concentração que inibe o crescimento em 50% (IC_{50}) das formas promastigotas de *L. (L.) infantum* demonstraram que todas as formulações foram ativas contra as formas promastigotas (Tabela 4). Entretanto, os valores mais ativos dos produtos de complexação com β -ciclodextrinas foram: MBFZD1:1 (IC_{50} de 0,66 μ g/mL), LBFZD1:1 (IC_{50} de 1,2 μ g/mL) e (MBFZD1:2 (IC_{50} de 1,17 μ g/mL) [Figura 8].

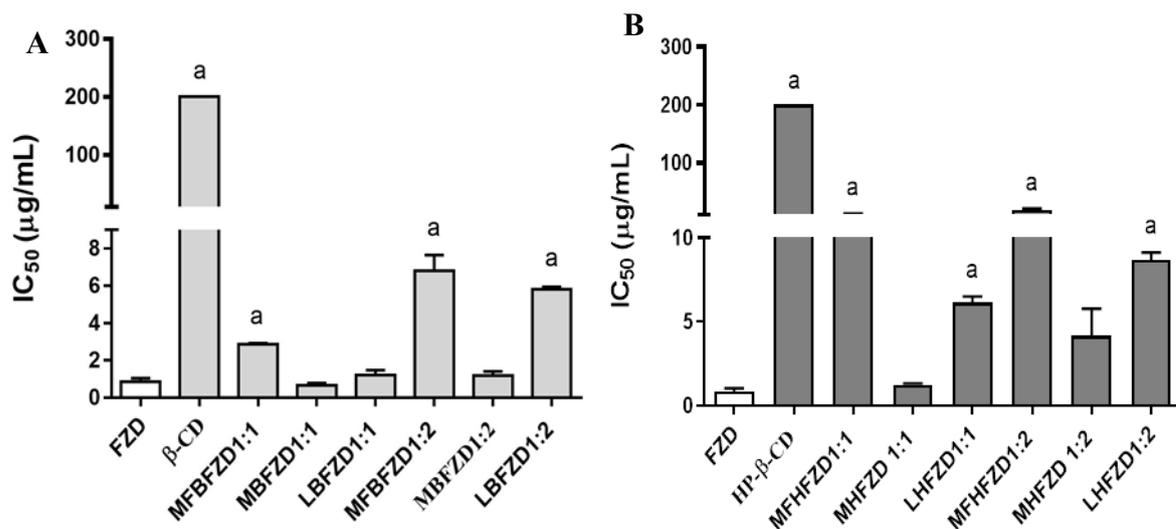


Figura 8. Valores de IC_{50} de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratadas por 48 horas. **A:** análise estatística da FZD em relação a β -ciclodextrina em diferentes métodos de complexações e proporções. **B:** análise estatística da FZD em relação a hidroxipropil- β -ciclodextrina em diferentes complexações e proporções. β -CD: promastigotas de *L. (L.) infantum* tratadas com β -ciclodextrina, HP β CD: promastigotas de *L. (L.) infantum* tratadas com hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os resultados referem-se à média e desvio padrão (\pm) de três experimentos independentes. Colunas marcadas com (a) representam diferença estatística em relação a FZD (** = $p < 0,01$). Nas análises foi aplicado o teste Anova seguido por pós-teste de Tukey.

Além disso, as ações leishmanicidas mais proeminentes contra as formas promastigotas ocorreram com os produtos de complexação com β -CD. As diferenças quanto à magnitude de

resposta sobre as formas promastigotas entre os tipos de complexação e as proporções de ciclodextrinas estão expressas na Tabela 4.

Na avaliação contra as formas amastigotas, os compostos MFBFZD1:2 (ICA₅₀ de 5,305 µg/mL), MFHFZD1:1 (ICA₅₀ de 0,16 µg/mL) e LHFZD1:1 (ICA₅₀ de 26,07 µg/mL) foram os únicos ativos sob as condições de concentrações selecionadas, mostrando-se capazes de obter a ação leishmanicida em 48 horas sobre os parasitos de *L. (L.) infantum* diminuindo dessa forma o número de amastigota por macrófagos [Figura 9 A, B].

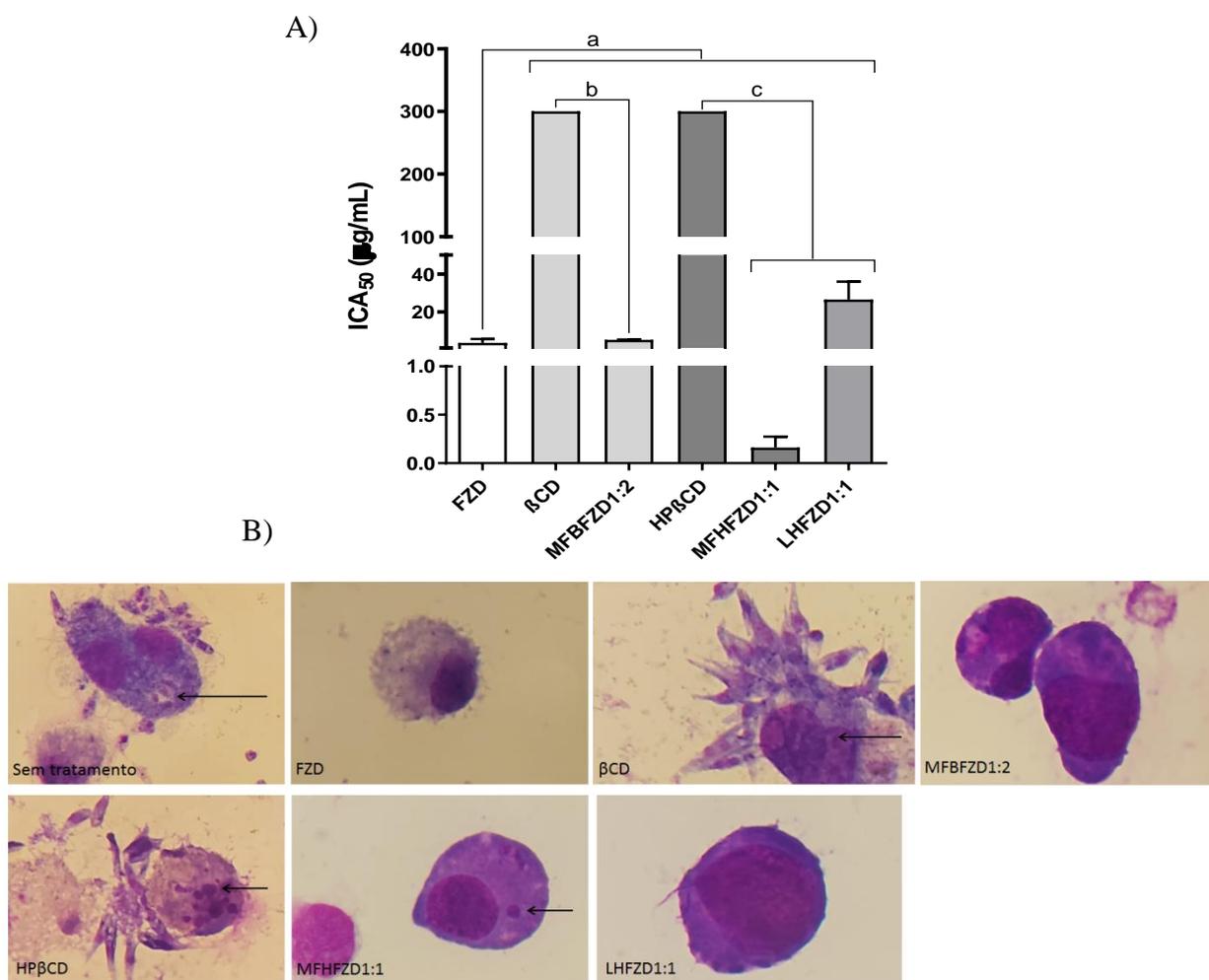


Figura 9. Células J774 infectadas com *L. (L.) infantum* nas formas promastigotas. Após 24 horas de infecção, as células receberam diferentes tratamentos e incubadas por 48 horas. **A)** ICA₅₀: concentração inibitória para 50% dos parasitos. FZD: tratadas com furazolidona, βCD: tratadas com β-ciclodextrina. MFBFZD1:2: tratadas com Mistura física furazolidona β-ciclodextrina, proporção 1:2; HPβCD: tratadas com hidroxipropil-β-ciclodextrina. MFHFZD1:1: tratadas com Mistura física furazolidona hidroxipropil-β-ciclodextrina na proporção 1:1; LHFZD1:1: Tratadas

com Liofilização furazolidona:hidroxipropil- β -ciclodextrina, proporção 1:1. **B)** Imagens de macrófagos sem tratamento, tratadas com a FZD ou com produtos de complexação. As setas (->) indicam as células infectadas com formas amastigotas. Os resultados referem-se à média e desvio padrão (\pm) de três experimentos independentes. Colunas marcadas com (a) representam diferença estatística em relação a FZD (***) = $p < 0,001$), colunas marcadas com (b) representam diferença estatística em relação a β CD (***) = $p < 0,001$), colunas marcadas com (c) representam diferença estatística em relação a HP β CD (***) = $p < 0,001$). Nas análises foi aplicado o teste Anova seguido por pós-teste de Tukey.

A concentração que inibiu 50% do crescimento das formas amastigotas por FZD (ICA₅₀) foi 3,7 μ g/mL. Assim, os resultados mostraram que o complexo liofilizado com hidroxipropil- β -ciclodextrina na proporção 1:1 e a mistura física com β -ciclodextrina 1:2 e a furazolidona, inibiram significativamente ($p < 0,001$) o número de amastigotas. Os produtos de complexação com HP- β -CD mais ativos contra as formas amastigotas foram MHFZD 1:1 (ICA₅₀ de 1,25 μ g/mL) e MHFZD 1:2 (ICA₅₀ de 4,15 μ g/mL) [Figura 9]. Por outro lado, os ensaios com os outros compostos complexados em suas diferentes proporções (1:1 ou 1:2), não apresentaram ação efetiva contra as formas amastigotas (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de inibição de crescimento e índice de seletividade para formas promastigotas e amastigotas.

Complexação	(μg/mL) ($\bar{X} \pm DP$)		IS ^a	IS ^b
	Promastigota IC ₅₀	Amastigota ICA ₅₀		
Materiais de partida				
FZD	0,84 \pm 0,2	3,7 \pm 2,1	11,13	2,52
β -CD	> 200	-	-	-
HP β CD	> 200	-	-	-
Produtos de complexação com a BCD				
MFBFZD1:1	2,85 \pm 0,07 (a)	>15	18,38	-
MBFZD1:1	0,66 \pm 0,11 (a)	>7	155,7	-
LBFZD1:1	1,2 \pm 0,28 (a)	>15	51,8	-
MFBFZD1:2	6,8 \pm 0,85 (b)	5,305	10,77	13,8
MBFZD1:2	1,17 \pm 0,24 (a)	>30	90,5	-
LBFZD1:2	5,8 \pm 0,14 (b)	>5	14,7	-
Produtos de complexação com a HPBCD				
MFHFZD1:1	11,85 \pm 0,35 (a) *	0,16 \pm 0,1	6,74	499,37
MHFZD 1:1	1,25 \pm 0,07 (a)	>7	78,08	-
LHFZD1:1	6,15 \pm 0,35 (a) *	26,07 \pm 6,7	16,41	3,87
MFHFZD1:2	18,3 \pm 2,55 (b) *	>7	5,9	-
MHFZD 1:2	4,15 \pm 1,63 (a)	>35	14,9	-

LHFZD1:2	8,7 ± 0,42 (a) *	>8	10,16	-
----------	------------------	----	-------	---

IC₅₀: Inibição de Crescimento de 50% de promastigotas, ICA₅₀: Inibição de Crescimento de 50% de amastigotas, IS^a: índice de seletividade para formas promastigotas, IS^b: índice de seletividade para formas amastigotas, -: não calculado. O índice de seletividade foi calculado de acordo com os resultados de citotoxicidade para células J774 e concentração inibitória de leishmania. Para βCD letras iguais entre parênteses (a; a) não representam diferença estatística entre as proporções 1:1 e 1:2 de cada método de complexação (Mistura, Malaxagem, Liofilização). Para βCD letras diferentes entre parênteses (a; b) indicam significância estatística (p<0,05) entre as proporções 1:1 e 1:2 de cada método de complexação. Para essas análises foi aplicado o teste Anova seguido por pós-teste de Tukey. Essa mesma análise estatística foi reproduzida para os complexados com HPβCD. Uma análise complementar foi realizada aplicando o Teste t não pareado, assim foram marcados com * indicando significância estatística (* = p<0,05) quando pareado os produtos complexados com o mesmo método e proporção diferenciando somente o produto de complexação entre βCD e HPβCD em relação a IC₅₀. Observa-se nessa análise que não houve diferença estatística entre o produto (MHFZD 1:1 e MBFZD 1:1) e (MHFZD 1:2 e MBFZD 1:2). $\bar{X} \pm DP$: resultados correspondem à média e desvio padrão de três experimentos independentes para cada amostra.

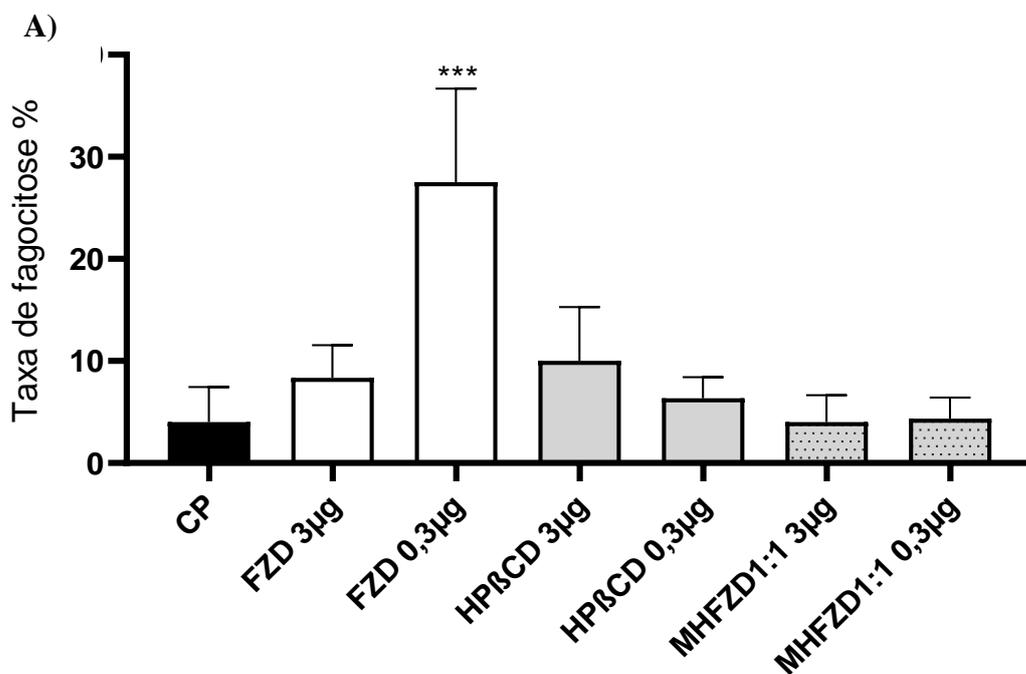
Em relação ao índice de seletividade para as formas promastigotas apenas os produtos de complexação MFHFZD 1:1 (IS de 6,74) e MFHFZD 1:2 (IS de 5,9) não apresentaram o índice de seletividade (IS) maior que 10. As análises se restringem a uma avaliação farmacológica sobre as formas promastigotas da leishmania, esses produtos de complexação não poderiam ser selecionados, considerando que a literatura preconiza que um composto ideal demanda que o seu IS seja maior ou igual a 10. Os outros 10 produtos de complexação seguiriam para análises.

Entretanto, ponderando que neste estudo foram realizados testes contra as formas amastigotas, que são as formas infectantes/replicantes no ser humano e de interesse terapêutico, apenas dois compostos apresentaram valores de IS maior que 10 (Tabela 5). Sendo os compostos, MFβFZD 1:2 (IS de 13,8), MFHFZD 1:1 (IS de 499,37). Assim, avançamos com as análises de fagocitose, espécie reativa de oxigênio, óxido nítrico e imunofenotipagem com a mistura física furazolidona hidroxipropil-β-ciclodextrina na proporção 1:1 (MFHFZD 1:1), por apresentar o melhor índice de seletividade.

6.4. Avaliação da capacidade fagocítica dos macrófagos sobre efeito da administração da FZD e MFHFZD 1:1

Como descrito no item 5.2.2.6 para os ensaios de fagocitose, espécie reativa de oxigênio, óxido nítrico e imunofenotipagem foi pré-selecionado o composto mais efetivo e com melhor índice de seletividade, sendo o MFHFZD 1:1.

A linhagem de macrófagos J774 incubados com meio RPMI (controle) apresentou taxa média de fagocitose em torno de 4%. Entretanto, quando incubados com FZD na concentração de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentou taxa média em torno de 8%. A HP β ZD (hidroxipropil- β -ciclodextrina) e MFHFZD 1:1 nas concentrações de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram taxa média de fagocitose de 10, 6,3, 4 e 4,3%, respectivamente. Tanto a HP β ZD e MFHFZD 1:1 não alteraram estatisticamente a taxa de fagocitose em nenhuma das concentrações estudadas quando comparadas ao controle. Já a FZD na concentração de 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ causou um aumento estatisticamente significativo na taxa de fagocitose dos macrófagos ($p < 0,001$), apresentando taxa média de 27,5%, induzindo a uma melhoria de 6,8 vezes [Figura 10 A, B].



B)

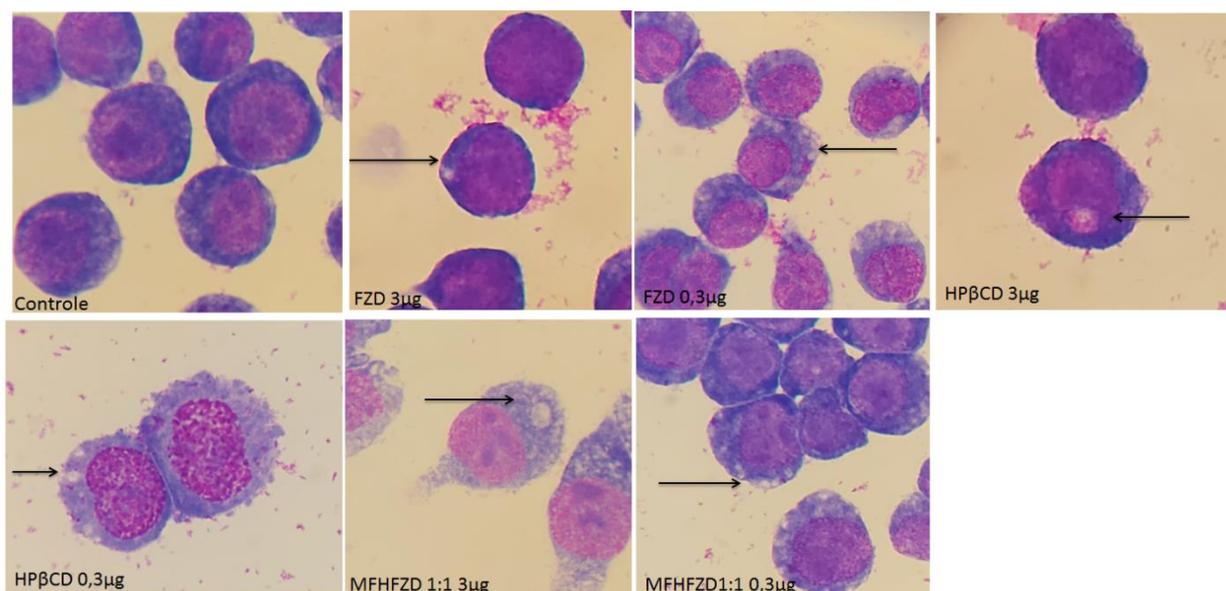


Figura 10. Efeito da administração de FZD e FZD-CD sobre capacidade fagocítica de macrófagos J774 com zimosan tratadas por 48 horas nas concentrações de 3 e 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **A)** Taxa de fagocitose. FZD: furazolidona, HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina, MFHFZD1:1: Mistura física furazolidona hidroxipropil- β -ciclodextrina na proporção 1:1. CP: Controle com células J774 sem tratamento. **B)** Imagens de macrófagos sem tratamento, tratadas com a FZD ou com produtos de complexação. As setas (->) indicam a fagocitose das partículas de zimosan pelos macrófagos. Colunas marcadas com asterisco (*) diferem quando comparadas com controle ($p < 0,001$). Nas análises foi aplicado Anova seguido por pós-teste de Tukey.

6.5. Detecção fluorimétrica de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Com intuito de observar se a FZD e MFHFZD1:1 induziriam ao aumento de EROs, utilizou-se o marcador H_2DCFDA por ensaio de fluorescência. Para esse ensaio as concentrações foram ajustadas a 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para todos os produtos.

A Figura 11 mostra que células J774 tratadas com FZD, apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) de EROS para a maior concentração testada (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Também apresentaram diferença significativa na produção desse metabólito em relação ao controle sem tratamento, células tratadas com HP β CD (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e MFHFZD 1:1 (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Quando observados os resultados de FZD, HP β CD e mistura física com β -ciclodextrina (MFHFZD 1:2) na proporção de 1:2 na concentração de 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, não houve aumento na indução de EROS [Figura 11].

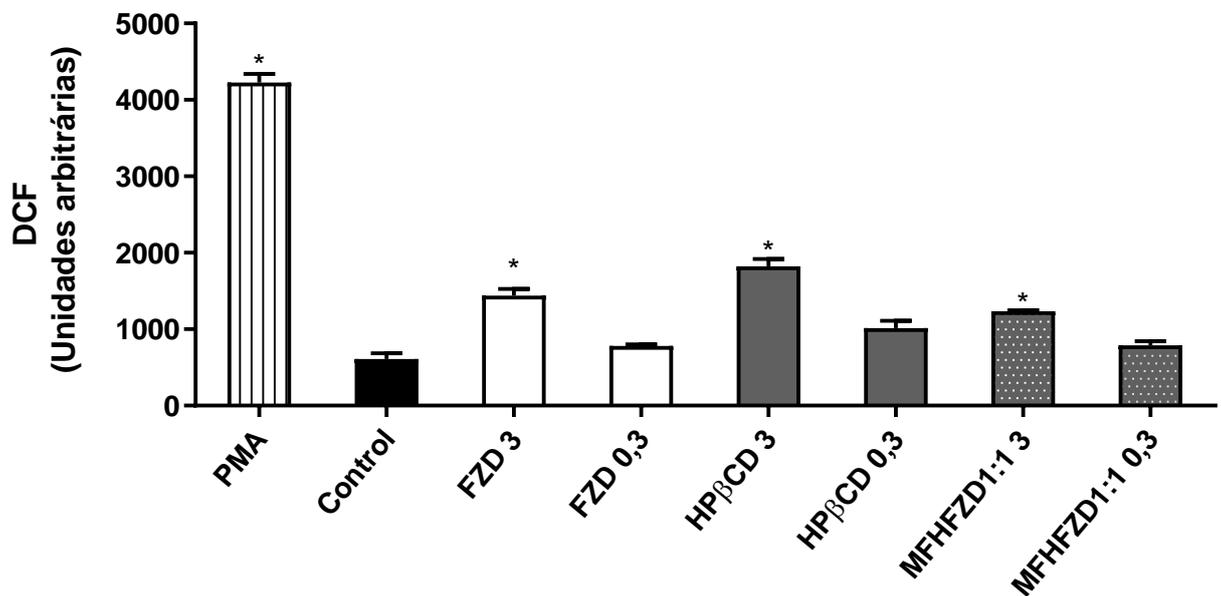


Figura 11. Formação de espécies reativas de oxigênio em J774 tratadas com furazolidona e com as misturas físicas da furazolidona-hidroxipropil-β-ciclodextrina. Avaliação da Fluorescência de EROs em J774 tratadas por 48 horas nas concentrações de 3 e 0,3 μg/mL com: FZD: furazolidona, HPβCD: hidroxipropil-β-ciclodextrina, MFHFZD1:1: Mistura física furazolidona hidroxipropil-β-ciclodextrina na proporção 1:1. Foi utilizado como controle o PMA (Phorbol 12-miristato 13-acetato) na concentração de 4,8 μM. Controle: células J774 sem tratamento. Colunas marcadas com asterisco (*) diferem quando comparadas com controle (p<0,001). Nas análises foi aplicado Anova seguido por pós-teste de Tukey.

6.6. Detecção da produção de óxido nítrico

A detecção da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos (J774) foi através de ensaio de fluorescência utilizando o marcador Diacetato DAF-FM (diacetato de 4-amino-5-metilamino-2', 7'-difluorofluoresceína-Sigma-Aldrich). A Figura 12 mostra que a produção de NO não foi significativa nas diferentes concentrações da complexação de MFHFZD 1:1. Já a FZD livre apresentou uma significativa produção de NO na concentração de 3 μg/mL (p<0,001) quando comparada ao grupo controle [Figura 12].

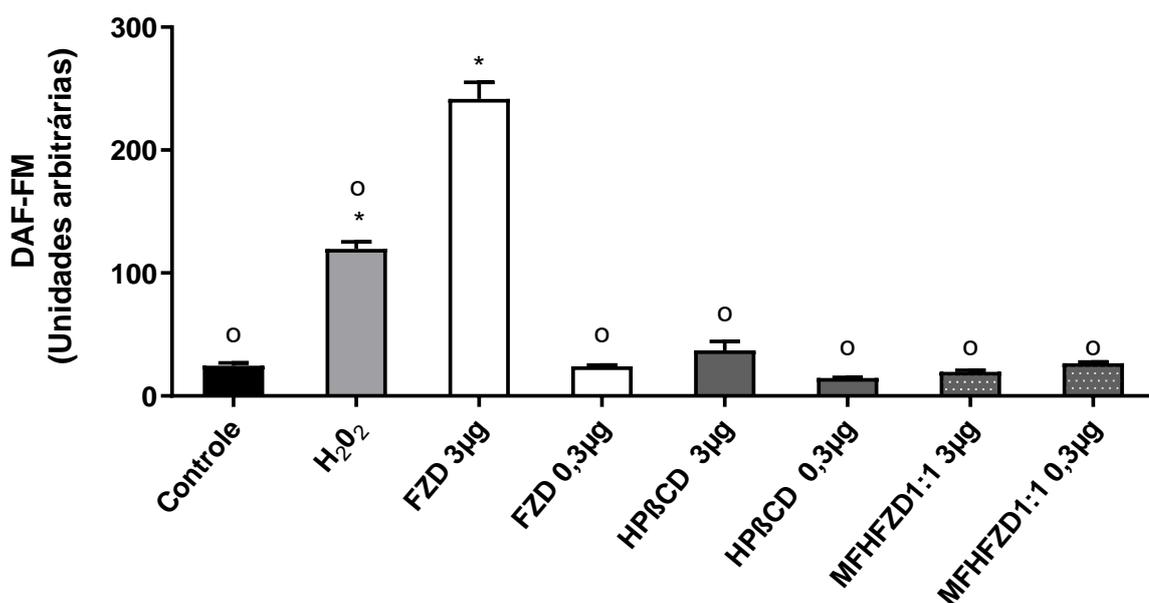


Figura 12. A avaliação da fluorescência de óxido nítrico em J774. Células tratadas com H₂O₂= peróxido de hidrogênio (4 µM), MFHFZD 1:1 (3 e 0,3 µg/mL), FZD (3 e 0,3 µg/mL), HPβCD (3 e 0,3 µg/mL) e Controle = células J774 tratadas por 48 horas. Após o período de tratamento as células foram incubadas com marcador DAF-FM. Colunas marcadas com asterisco (*) diferem quando comparadas com controle (p<0,001), colunas marcadas com ômicron (o) diferem quando comparadas com a FZD 3 µg/mL (p<0,001). Nas análises foi aplicado Anova seguido por pós-teste de Tukey. Os resultados correspondem à média e desvio padrão de três experimentos independentes para cada amostra.

6.7. Imunofenotipagem de macrófagos

A fim de avaliar o efeito da FZD e MFHFZD 1:1 na polarização de macrófagos, foi examinado os efeitos *in vitro* dos compostos na expressão do marcador de superfície de células J774 incubadas com IFN-γ ou IL-4 / IL-13. As células foram estimuladas e a expressão de proteínas de superfície que são reguladas positivamente em macrófagos M1 (CCR7) e macrófagos M2 (CD206) foi analisada por citometria de fluxo.

Como mostrado na Figura 13A, às células quando não estimuladas por IFN-γ ou IL-4/IL-13, não se diferenciaram em macrófagos M1 ou M2. Outrora, quando as células foram estimuladas pelas citocinas houve aumento significativo da expressão de M1 e M2 (p<0,001). No entanto, no momento que houve estimulação por citocinas associada ao tratamento com FZD, a proporção de macrófagos M1 ou M2 foi semelhante ao grupo controle (Figura 13B). Já as

células estimuladas com citocinas e tratadas com MFHFZD 1:1 apresentaram aumento de macrófagos polarizados em M1 e M2, mas estas proporções não foram estatisticamente significativas quando comparados ao grupo sem tratamento ou as células tratadas com FZD [Figura 13 D]. Por fim, os grupos estimulados com IFN- γ e tratados com HP β CD apresentaram redução da expressão de M1 quando comparados ao grupo controle [Figura 13 C].

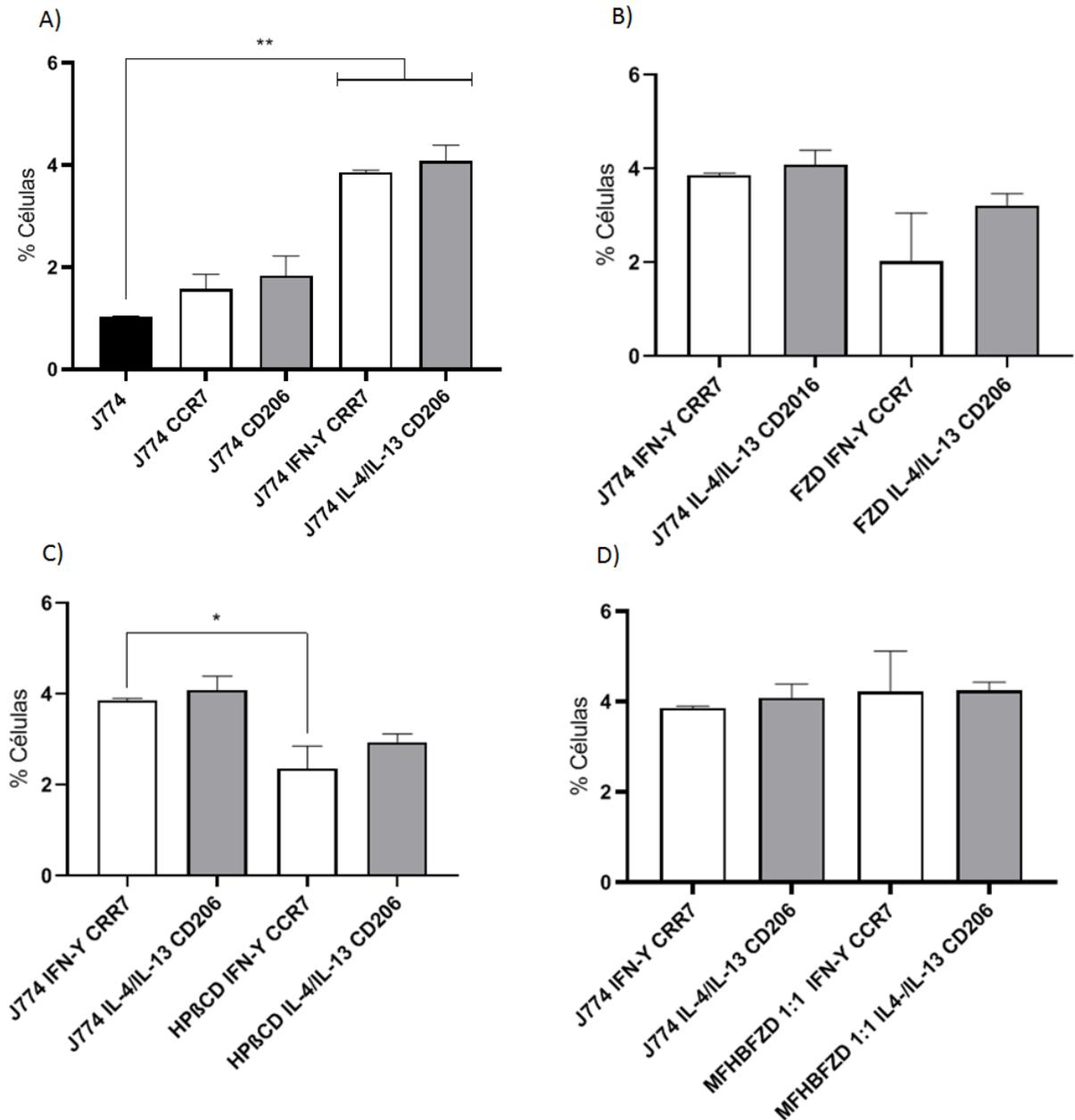


Figura 13. Porcentagem de células J774 polarizadas em macrófagos classicamente ativados (M1), e macrófagos alternativamente ativados (M2). Citocinas de diferenciação de M1 (IFN- γ) e M2 (IL-4/ IL-13). Marcadores imunofenotípicos de superfície para M1 (CCR7) e M2 (CD206). HP β CD: hidroxipropil- β -ciclodextrina, MFHFZD 1:1: Mistura física furazolidona hidroxipropil-

β -ciclodextrina na proporção 1:1. Controle: células J774 sem tratamento. A) Macrófagos J774 não estimulados ou estimulados por citocinas (IFN- γ ou IL-4/ IL-13) e marcados para M1 (CCR7) ou M2 (CD206). B) Macrófagos estimulados e tratados com FZD e marcados para M1 ou M2. C) Macrófagos estimulados e tratados com HP β CD e marcados para M1 ou M2. D) Macrófagos estimulados e tratados com MFHFZD 1:1 e marcados para M1 ou M2. Colunas marcadas com asterisco (*) diferem quando comparadas com controle ($p < 0,001$). Nas análises foi aplicado Anova seguido por pós-teste de Tukey. Os resultados correspondem à média e desvio padrão de dois experimentos independentes para cada amostra.

7. DISCUSSÃO

Neste estudo buscou-se avaliar os efeitos citotóxicos, leishmanicidas, atividade macrófagica e imunomoduladora promovidos pela administração de FZD e sua complexação FZD-CD. Inicialmente foi realizada uma revisão sistemática para avaliar quais os mecanismos imunes estão relacionados pela administração da FZD em diferentes contextos patológicos. Através dos trabalhos eleitos para elegibilidade após os critérios de inclusão e exclusão, ficou demonstrado que houve variações quanto randomização e sigilo da alocação dos estudos selecionados, o que tornou inviável a realização da metá-análise. Todavia, os trabalhos elencados indicaram que a administração de FZD pode induzir vias pró ou anti-inflamatórias, com o provável aumento da expressão de espécies reativas de oxigênio e modulação de vias apoptóticas.

O trabalho de Sun et al. (2013), demonstrou que FZD induz a interrupção do ciclo celular da fase S e suprime a proliferação de células HepG2, ativando a via p38 MAPKS (proteína quinase ativada por mitogênio) para p-p38 e inibindo o JNK (Via da quinase N-terminal de junho) para p-JNK. Essas respostas causadas por FZD são aparentemente antagônicas, no entanto, é reconhecido que as vias JNKs e p38 MAPKs podem ter efeitos opostos na proliferação e sobrevivência celular, que dependem de diferenças específicas no tipo de célula, bem como na intensidade e duração do sinal e interferência entre outras vias de sinalização (CORRE; PARIS; HUOT, 2017).

As vias de sinalização JNK e p38 MAPK desempenham papéis centrais na interrupção do ciclo celular e na supressão do crescimento celular e estão envolvidas em muitas condições patológicas. É importante notar, que as formas fosforiladas de JNK e p38 ativam fatores de transcrição pertencentes à proteína ativadora-1 (AP-1), incluindo c-Jun e fator de ativação de transcrição 2 (ATF-2), que ativam a transcrição de genes que codificam moléculas de adesão, como VCAM-1 e citocinas inflamatórias (ZARUBIN; HAN, 2005). Com base neste resultado,

podemos hipotetizar que em virtude da ativação das vias JNK, é provável que FZD elicite a decodificação e ativação de citocinas inflamatórias por leucócitos.

Já o estudo de Deng et al. (2016), demonstrou que o tratamento com FZD na dose de 50 µg/mL em células HepG2 aumentou o nível de mRNA (RNA mensageiro) p21, mas paradoxalmente reduziu o nível da proteína p21, como consequência diminuindo também a sua meia-vida. A degradação da proteína p21 foi associada à inibição de FZD da via PI3K/ Akt. Entretanto, a alteração da expressão da proteína p21 modulou a apoptose que foi induzida por FZD, através da ativação de caspase, especialmente caspase-3, promovendo também a geração de espécie reativa de oxigênio (EROS). Segundo os autores, a influência do p21 na geração de EROS induzida por FZD pode estar associada à via Nrf2 / HO-1, que foi um regulador chave na resposta de defesa contra o estresse oxidativo. Em suma, os autores demonstraram que a p21 desempenhou um papel crítico na apoptose induzida por FZD em células HepG2, que influenciou a ativação da caspase-3 e a geração de EROS.

Além disso, o tratamento com FZD potencializou o efeito bactericida e a fagocitose de macrófagos peritoneais extraídos de Aves Leghorn que foram expostos a cepas de *Salmonella enteritidis*. Os autores observaram que a exposição de cepas de *S. enteritidis* a concentrações subinibitórias de FZD elevou a quimioluminescência durante a fagocitose com macrófagos, o que sugeriu um aumento no metabolismo oxidativo dos macrófagos resultante da ativação da fagocitose destas células (CHADFIELD; HINTON, 2004).

Diante dos dados e associados aos mecanismos imunológicos que são desencadeados pelo aumento do metabolismo oxidativo dos macrófagos, principalmente dos macrófagos M1, levanta-se o seguinte questionamento: a FZD pode influenciar a modulação de linfócitos auxiliares (CD4⁺) para o perfil Th1 e macrófagos M1 durante a infecção por patógenos fagocitados? É importante notar que no trabalho experimental de Chadfield & Hilton (2004) com *Salmonella enteritidis*, trata-se de uma espécie de bactéria intracelular gram-negativa flagelada

opcional (GUT et al., 2018). Como se sabe, a mediação das respostas imunes intracelulares por patógenos fagocitados é realizada por células CD4⁺, enquanto as respostas intracelulares por patógenos que causam infecção no citosol da célula, como vírus, são mediadas por CD8⁺ (TUBO; JENKINS, 2014).

Os linfócitos CD4⁺ podem se diferenciar em classes de linfócitos T helper (Th), como: Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 e Th25. Durante uma infecção, o aumento do metabolismo oxidativo é crítico na diferenciação especialmente de células Th1 e Th17 (ABIMANNAN et al., 2016). Assim, com o provável aumento do metabolismo oxidativo conforme acima destacado, que pode modular a expressão do perfil Th1, hipotetizamos que a terapia com FZD pode promover uma imunomodulação eficaz para a eliminação de patógenos intracelulares mediada por respostas de linfócitos CD4⁺/Th1 e conseqüentemente por macrófagos M1.

Paradoxalmente, a FZD apresentou tendência a aumentar a ativação de monócitos, porém, inversamente, reduz a produção de citocinas consideradas essenciais para o controle da doença de chagas e o sucesso terapêutico na imunidade adaptativa, como IFN- γ , TNF- α e IL-10, além de subpopulações de linfócitos T (OTTA et al., 2018). Os resultados desses autores demonstraram diferentes efeitos da FZD sobre a capacidade funcional de células mononucleares do sangue periférico em indivíduos saudáveis e pacientes com doença de Chagas crônica, concluindo que ainda não está claro se o tratamento com FZD pode ser benéfico em pacientes com doença de Chagas.

Baseado nos dados apresentados, podemos reconhecer a necessidade de estudos que abordem os efeitos imunofarmacológicos da FZD. Embora ela seja uma droga tradicionalmente usada, ainda podem ser elucidados diversos processos imunológicos por ela desenvolvidos. Nossos dados revelaram que há muitas perguntas a serem respondidas, por exemplo: É provável que a FZD possa provocar mudanças imunofenotípicas nos leucócitos a um perfil que desencadeia a eliminação de um patógeno durante um processo infeccioso, ou se este fármaco

modula a expressão de leucócitos a um perfil que beneficie o ciclo de vida do parasito? Qual o efeito predominante da administração por FZD: pró ou anti-inflamatório? Como mitigar os efeitos adversos desse medicamento? Assim, realizamos ensaios para avaliar o efeito leishmanicida, e imunomodulador da FZD e de produtos de complexação da FZD com ciclodextrinas.

Como demonstrado nos resultados, a FZD testada de forma livre apresentou maior citotoxicidade (9,35 µg/mL), quando comparada aos compostos complexados com ciclodextrina (variando de 52,4 a 105,95 µg/mL). Entretanto, se consideramos os valores citotóxicos com base no equivalente de FZD presente nos diferentes produtos de complexação obtidos, poderíamos elencar que alguns produtos de complexação estariam apresentando maiores citotoxicidade como MFBFZD 1:2 com CC₅₀ de 52,4 µg/mL (±1,7), LBFZD 1:2 com CC₅₀ de 62,1 µg/mL (±0,28), MHFZD 1:2 com CC₅₀ de 85,05 µg/mL (± 2,62), LHFZD 1:2 com 88,43 µg/mL (±4,38), mas com o equivalente de FZD (7,28; 6,17; 6,10; e 6,34 µg/mL) respectivamente (Tabela 3). Se fosse analisado isoladamente os dados de disponibilidade de FZD livre, poder-se-ia indicar que estes produtos de complexação apresentariam maiores citotoxicidade frente às células estudadas quando comparados à forma livre do fármaco.

Este fato poderia ser admissível se considerarmos que os complexos de inclusão são formados por interações reversíveis entre as espécies envolvidas, nomeadamente do tipo não covalente, sendo os fármacos liberados no meio por dissociação e os responsáveis pela ação farmacológica de interesse (DEL VALLE, 2004; STELLA et al., 1999). Entretanto, é importante destacar que a associação com as ciclodextrinas aumentou o índice terapêutico da FZD em todos produtos complexados frente as formas promastigotas, e melhorou o índice terapêutico em dois produtos complexados MFBFZD 1:2 e MFHFZD 1:1 nas formas amastigotas, como demonstrado na Tabela 4.

Uma provável justificativa para a diminuição da citotoxicidade em todos os produtos complexados (Figura 7), e em seguida, o aumento da efetividade dos produtos de complexação MFBFZD 1:2 (ICA₅₀ 5,305 µg/mL) e MFHFZD 1:1 (ICA₅₀ 0,16 µg/mL) foi o aumento da solubilidade do fármaco, com redução da dose requerida (CARVALHO et al., 2018). Além disso, o aumento da permeabilidade celular à FZD em função da presença das CDs podem agir como promotores da permeação de fármacos pouco solúveis, controlando o influxo dos fármacos pelas membranas por diferentes mecanismos (MÁSSON et al., 1999; DEL VALLE, 2004).

De fato, a literatura vem demonstrando que a preparação de complexos de inclusão baseados em fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas é fundamental, uma vez que estes complexos podem além de aumentar a solubilidade dos fármacos, incrementar a taxa de dissolução, melhorar a biodisponibilidade, reduzir a toxicidade e, viabilizar o preparo de soluções orais e parenterais (CARNEIRO et al., 2019).

O trabalho de Carvalho et al. (2018), destacou os efeitos leishmanicida com baixa citototoxicidade de FZD-CD quando comparada a FZD livre. Os autores realizaram os testes com as linhagens celulares L929 e THP-1 e formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Como resultado, as avaliações biológicas *in vitro* demonstraram que os complexos FZD: β-CD apresentaram atividade leishmanicida significativa contra *L. amazonensis* com valores de IC₅₀ de 6,16 µg/ mL e 1,83 µg/ mL para os complexos preparados por malaxagem e liofilização, respectivamente. Os autores destacaram que estas concentrações dos complexos não afetaram a viabilidade celular e sugeriram que os compostos nestas concentrações não eram citotóxicos. No presente trabalho, buscou-se ampliar o reconhecimento sobre os efeitos imunofarmacológicos de FZD e FZD-CD.

A forma amastigota é de grande importância clínica e farmacológica, pois é a morfologia infectante no hospedeiro vertebrado e que provoca lesões teciduais localizadas, além de

inflamação sistêmica, tornando evidente a manifestação da doença. É importante destacar, que experimentalmente induzimos a infecção da *L. (L.) infantum* sobre a linhagem celular J774.

Até o presente momento, apenas o trabalho de Tempone et al. (2010), havia demonstrado os efeitos da FZD contra as formas amastigotas do parasito da leishmaniose visceral. Os autores também utilizaram uma formulação lipossomal da FZD frente ao modelo experimental com hamster. Como resultado, eles demonstraram que a FZD apresentou atividade contra promastigotas de *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis* nas concentrações de 0,71, 0,73, 0,61, e 0,47 µg/ mL, respectivamente. A FZD foi efetiva frente às amastigotas de *L. (L.) chagasi* na concentração de 1,60 µg/mL. Os autores também realizaram ensaio de citotoxicidade, demonstrando que o tratamento com FZD em 48 horas foi tóxico para macrófagos peritoneais e células THP-1 nas concentrações de 12,74 µg/mL. Por fim, os autores demonstraram que a FZD lipossomal (0,5 mg/kg) reduziu a carga parasitária no baço (74%) e fígado (32%) dos hamsters em uma dose 100 vezes menor do que a droga livre.

Outros estudos também relataram resultados promissores sobre a eficácia de FZD em diferentes cepas de *Leishmania in vitro*. Berman e Lee (1983) testaram a atividade leishmanicida de FZD em cepas de *L. tropica* e observaram que a FZD foi capaz de eliminar 92% das promastigotas quando testada na concentração 1,0 µg/mL. O recente trabalho de Carvalho et al. (2020), demonstrou que a FZD complexada com β-CD apresentou efeito leishmanicida contra as formas promastigotas de *L. braziliensis*. Os produtos de complexação avaliados foram a Malaxagem e liofilização em diferentes proporções. Os autores observaram que na malaxagem, o IC₅₀ varia entre 2,7 µg/mL a 48,45 µg/mL e de liofilização o IC₅₀ variou de 6,5 µg/mL a 24,48 µg/mL. Estes resultados estão acima do que foi observado no presente estudo, onde o IC₅₀ dos produtos de complexação com β-CD variou de 0,66 µg/mL a 6,8 µg/mL.

Outrora, estas diferenças no trabalho de Carvalho et al. (2020) podem ser decorrentes da utilização de cepa diferente (*L. braziliensis*), tempo de tratamento (72 horas), e modelo

experimental (THP-1). No presente trabalho, a avaliação do efeito leishmanicida de FZD e FZD-CD foi contra a cepa de (*L. infantum*), tempo de tratamento (48 horas) e modelo experimental (J774). Vale a pena destacar que a resposta terapêutica a FZD pode variar em diferentes tipos de células e parasitos, em virtude das diferentes capacidades metabólicas (ZHUGE et al., 2018; SHETNEV et al., 2019).

Os resultados apresentados no presente trabalho corroboram ao encontrados por Carvalho et al. (2018; 2020) e fortalece a possibilidade de reposicionamento deste fármaco para uso clínico em humanos. Como se sabe, uma tendência na atualidade é o reposicionamento de fármacos e a inclusão de novos sistemas de liberação de drogas com intuito de reduzir o tempo e o investimento gastos na descoberta de novas moléculas (PUSHPAKOM et al., 2018). A complexação com ciclodextrinas vem se destacando como alternativa amplamente utilizada, inclusive, em medicamentos com registros aprovados por agências reguladoras internacionais (CARVALHO et al., 2020). Assim, utilizar as ciclodextrinas para reduzir os efeitos adversos, como no caso da FZD, pode ser uma alternativa que promova o reposicionamento deste fármaco e seu uso clínico.

Neste trabalho, além de demonstrar a eficácia da FZD e FZD-CD frente às formas infectantes do parasito da leishmaniose visceral, buscou-se entender a possibilidade deste fármaco (livre ou complexado) em estimular respostas imunes, em especial atividades de macrófagos, como por exemplo, se estimulavam a fagocitose, liberação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Ficou demonstrado que tanto HPβZD e MFHFZD 1:1 não alteraram estatisticamente a taxa de fagocitose em nenhuma das concentrações estudadas (3 e 0,3 µg/mL) quando comparadas ao controle. Inusitadamente a FZD na concentração mais baixa, 0,3 µg/mL, causou um aumento estatisticamente significante na taxa de fagocitose, induzindo a uma melhoria de 6,8 vezes.

Como se sabe a fagocitose é um processo celular de ingestão e eliminação de partículas, incluindo microrganismos, substâncias estranhas e células apoptóticas. E este processo envolve várias fases, como a detecção da partícula a ser ingerida, ativação do processo de internalização, formação de um vacúolo especializado denominado fagossomo e maturação do fagossomo (URIBE-QUEROL; ROSALES, 2020).

A partícula de zimosan é um modelo eficaz para avaliar a capacidade fagocítica, pois induz as fases da fagocitose pelos sinais inflamatórios em macrófagos por meio de receptores Toll-like TLR2 e TLR6. Além disso, os receptores fagocíticos nos macrófagos se ligam no zimosan e estimulam o engolfamento das partículas (DAVID M UNDERHILL, 2003). Os resultados do presente estudo corroboram com a literatura, no qual, é destacada a possibilidade da administração de FZD aumentar o metabolismo oxidativo dos macrófagos resultando na ativação da fagocitose destas células (CHADFIELD; HINTON, 2004; FEITOSA et al., 2021). Além disso, durante a fagocitose ocorrem alterações metabólicas, com a produção de espécie reativa de oxigênio (EROS) e óxido nítrico (NO). Foi constatado que após a administração de FZD e o MFHFZD 1:1 houve estimulação da liberação de EROS na concentração de 3 µg/mL.

No geral, a função biológica da liberação de EROS é a eliminação do agente agressor durante uma infecção por parasitos da Leishmaniose. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com dano consequente (VASCONCELOS et al., 2007). A liberação de EROS na infecção por leishmania ocorre em resposta à fagocitose dos macrófagos que possui ligantes de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os padrões reconhecidos por PRRs podem ser de origem patogênica (padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs) que sinalizam danos ao tecido, que geralmente estão ocultos de PRRs (CARTA et al., 2009).

Na infecção por leishmania a resposta promovida por EROS é fundamental nos diferentes estágios de infecção. Todavia, é importante destacar que algumas espécies de parasitos podem ser resistentes ao estresse oxidativo (HORTA et al., 2012). Com tal característica, o trabalho de Andrade et al. (2020), demonstrou que a *L. (L.) infantum* na forma promastigota é mais resistente ao estresse oxidativo, quando comparada a *L. (V.) braziliensis*. Na Leishmaniose visceral canina e também humana, o estresse oxidativo sofrido por hemácias, por exemplo, pode fornecer a base para sua remoção precoce da corrente sanguínea. Assim, tem sido sugerido que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese da anemia hemolítica durante a leishmaniose visceral (HEIDARPOUR et al., 2012).

Além disso, Panaro et al. (2008) relataram que os níveis de EROS podem estar fortemente envolvidos na apresentação clínica da leishmaniose em cães. Por fim, embora a produção exacerbada de EROS possa provocar o estresse oxidativo, drogas com efeitos leishmanicidas e que estimulam a produção de EROS são consideradas terapêuticas efetivas e eficazes (BASU et al., 2006). Desta forma os resultados de EROS descritos de FZD e FZD-CD são promissores e reforçam a possibilidade deste fármaco para aplicações terapêuticas na leishmaniose visceral.

Outra molécula essencial para mediar à morte intracelular de parasitos da Leishmaniose é o óxido nítrico (NO), sendo ele considerado uma das principais moléculas efetoras. No presente estudo, ficou demonstrado que não houve produção de NO de forma significativa quando as células foram tratadas com MFHFZD 1:1 nas concentrações 0,3 e 3 µg/mL. Em contraste, a FZD livre apresentou uma significativa produção de NO na concentração de 3 µg/mL. Nesta perspectiva, é preciso destacar que fármacos livres podem estabelecer maior contato com célula, se ligando às proteínas de membranas ou até mesmo atravessá-las por meio de difusão passiva e ativar cascatas intracelulares provocando efeitos farmacológicos. Desta forma, a concentração do fármaco livre determina a sua concentração no local ativo e, bem como, a sua farmacocinética

e farmacodinâmica (TIWARI et al., 2012). Assim, considerando que os ensaios experimentais restringiram-se ao modelo *in vitro* com as células J774, o que permitiu um contato direto do fármaco com a célula, pode-se pressupor uma vantagem da FZD quanto à ativação metabólica da produção de óxido nítrico quando comparada com a complexação de MFHFZD 1:1, uma vez que o sistema de complexação aprisiona o fármaco, protegendo-o e alterando o seu perfil de liberação, absorção, distribuição e eliminação. Todavia, a complexação conduz o fármaco ao local de interesse de uma forma mais eficaz e segura (CARNEIRO et al., 2019).

Além do mais, recentes estudos atestam que a FZD livre estimula a produção de NO e que esta produção está relacionada aos efeitos da atividade da FZD para eliminação de patógeno (LE et al., 2020). Estudos indicam que concomitantemente a produção de NO, a FZD promove à inibição da cadeia de transporte de elétrons (BERTENYI; LAMBERT, 1996), e como efeito secundário, pode inibir a função de bombas de efluxo que são dependentes da cadeia de transporte de elétrons, sendo este um mecanismo vantajoso no enfrentamento de patógenos resistentes a múltiplas drogas, pois desta forma, este mecanismo permite o uso sinérgico de combinações de antimicrobianos, ocasionando melhor efeito terapêutico, considerando que muitas drogas são expelidas para fora da célula por meio de uma ampla gama de bombas de efluxo (LE et al., 2020).

Efetivamente ainda não está totalmente esclarecido os diversos mecanismos associados pela utilização da FZD, com a conseqüente produção NO e demais cadeias metabólicas envolvidas. Todavia, os dados encontrados sobre o NO em nosso estudo corroboram ao já descrito na literatura. Por fim, é importante destacar que o NO é fundamental na eliminação intracelular de parasitas, e semelhantemente a produção de EROS, compostos capazes de gerar e aumentar a produção de NO em macrófagos podem contribuir para a atividade leishmanicida (HORTA et al., 2012). Esta importância é singular para os pacientes com LV, uma vez que estes apresentam uma redução na produção plasmática de óxido nítrico (KUPANI et al., 2021).

As atividades de fagocitose, com conseqüente produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico são características decisivas dos fagócitos, em especial dos macrófagos. Os macrófagos são as células hospedeiras finais para a proliferação dos parasitos de *Leishmania* e essas células são a chave para uma resposta controlada ou exacerbada que culmina em manifestações clínicas. M1 e M2 são os dois principais fenótipos de macrófagos (TOMIOTTO-PELLISSIER; TACIANE; ASSOLINI, 2018).

Quando avaliado os efeitos da FZD e MFHFZD 1:1 sobre a polarização de macrófagos, foi detectado que ambos os tratamentos não apresentaram aumento significativo na porcentagem de macrófagos polarizados em M1 e M2. Muito embora, o tratamento com MFBFZD 1:1 tenha apresentado maiores valores de macrófagos polarizados, porém, estas proporções não foram estatisticamente significativas quando comparados ao grupo sem tratamento ou as células tratadas com FZD. Apesar de não observável, o aumento da polarização de macrófagos em M1 ou M2 nos ensaios *in vitro* com FZD e MFBFZD 1:1, é importante assinalar que não foi atestável que o fármaco não corrobore com a polarização de macrófagos.

Durante a infecção por *Leishmania*, os macrófagos têm suas atividades influenciadas pela interação com os linfócitos TCD4⁺ que se diferenciam no perfil Th1, Th2 ou Th17, e estes para obter sua ativação dependem da apresentação de antígeno, moléculas co-estimulatórias, ligantes e produção de citocinas (OKEKE; UZONNA, 2019). Sendo estes sinais influenciados pelo microambiente infeccioso/inflamatório. Estudos revelam, por exemplo, que Anfotericina B (Anf-B), fármaco utilizado no tratamento de LV e LC, potencializa as atividades antimicrobianas de macrófagos M1 direta e indiretamente por meio da indução de citocinas, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interferon- γ (IFN- γ), bem como a geração de uma explosão respiratória (CUNA et al., 2007).

Ainda não se estabeleceu a relação causal entre a polarização de macrófagos M1 pela administração de Anf-B, o que se sabe é a influência deste fármaco sobre os macrófagos M1.

Além do mais, estudos *in vitro* com a linhagem celular tumoral Raji e macrófagos sobre o tratamento com Anf-B, revelou que Anf-B inibiu a fosforilação de STAT6 para suprimir a polarização de macrófagos M2 (ZHANG et al., 2018). Os pressupostos desses achados podem ser *atestados* em estudos de infecção por *Leishmania*, bem como, podem ser avaliados com diferentes fármacos, tal como a FZD ou MFBFZD 1:1.

Assim, ainda é possível considerar o papel da FZD e MFBFZD 1:1 sobre a polarização de macrófagos M1 e M2, considerando ainda que foi verificável em nosso estudo a fagocitose, produção de EROS e NO sendo estes mediadores característicos de atividade microbicidas, especialmente encontrados no perfil M1. Nosso estudo possibilita que diferentes abordagens possam ser adotadas para compreendermos se de fato a FZD livre ou com produtos de complexação podem influenciar a modulação imunofenotípica de macrófagos M1 e M2 durante a infecção por *Leishmania (L.) infantum*. Pondera-se que tais verificações poderão ser melhores compreendidas em modelo *in vivo* (hamster), uma vez que é descrito que a infecção experimental em hamster reproduz vários aspectos da LV humana e canina, como pancitopenia marcada por leucopenia e anemia, caquexia, hipergamaglobulinemia, aumento da expressão de IL-10 e regulação negativa do receptor de quimiocina 7 (CCR7) (ATO et al., 2002). Como perspectiva futura, nosso grupo de pesquisa pretende avançar quanto ao reconhecimento do efeito imunomodulador da FZD e FZD-CD utilizando modelo *in vivo* com hamster-sírio.

8. CONCLUSÃO

- ❖ Este estudo revelou que a administração da FZD pode induzir vias pró ou anti-inflamatórias, com o provável aumento da expressão de espécies reativas de oxigênio e modulação de vias apoptóticas;
- ❖ Baseado nas complexações com as ciclodextrinas (β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina), ficou demonstrado que houve uma diminuição da citotoxicidade, quando comparados a FZD livre;
- ❖ Semelhantemente ao que já havia sido demonstrado em outras cepas de leishmania, a FZD contra as cepas de *Leishmania (L.) infantum* apresentou efeito leishmanicida frente às formas promastigotas, bem como os diferentes produtos de complexação de FZD- β -CD ou FZD-HP- β -CD;
- ❖ De maneira inédita os produtos de complexação MFBFZD1:2 e MFHFZD1:1 apresentaram ótimo índice terapêutico para as formas amastigotas quando comparados a FZD livre. Paradoxalmente constatou-se que FZD livre na concentração mais baixa de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ aumentou a taxa de fagocitose, induzindo a uma melhoria de 6,8 vezes. Outrora, a FZD livre e o MFHFZD1:1 estimularam a liberação de espécie reativas de oxigênio, e somente a a FZD livre apresentou uma significativa produção de NO na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$, o que não foi observado em MFHFZD1:1.
- ❖ Por fim, a hipótese do trabalho foi em grande parte respondida tendo complexação da furazolidona com as ciclodextrinas (β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina) originando complexos e agregados do tipo não-complexos com efeito leishmanicida, com baixa toxicidade; e dependendo da quantidade de FZD livre no microambiente, essa é capaz de estimular a fagocitose, a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, sem aumentar a polarização de macrófagos no perfil M1 ou M2 em modelo *in vitro* de infecção por *Leishmania (L.) infantum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ABIMANNAN, T. et al. Oxidative stress modulates the cytokine response of differentiated Th17 and Th1 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 99, p. 352–363, 2016.

ALI, B. H. Pharmacological, therapeutic and toxicological properties of furazolidone: Some recent research. *Veterinary Research Communications*, v. 23, n. 6, p. 343–360, 1999.

ANDRADE, L. DE C. et al. The heterologous expression of escherichia coli mutt enzyme is involved in the protection against oxidative stress in leishmania Braziliensis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 115, n. 6, p. 1–12, 2020.

ANVERSA, L. et al. Human leishmaniasis in Brazil : A general review. v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.

ASAD, M. et al. Therapeutic and immunomodulatory activities of short-course treatment of murine visceral leishmaniasis with KALSOME™ 10 , a new liposomal amphotericin B. ???, p. 1–12, 2015.

ATO, M. et al. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. v. 3, n. 12, p. 1185–1191, 2002.

BANERJEE, A. et al. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in Leishmania pathogenesis and in protective immunity by Leishmania vaccines. *Cellular Immunology*, p. 6–10, 2016.

BANKOTI, R. et al. Marginal Zone B Cells Regulate Antigen-Specific T Cell Responses during Infection. *The Journal of Immunology*, p. 3961–3971, 2012.

BASU, J. M. et al. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in Leishmania donovani-infected macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 5, p. 1788–1797, 2006.

BELIATSKAYA, A. V. et al. Study of the Solubility of Furazolidone from Solid Dispersions with Polyvinylpyrrolidone. *Moscow University Chemistry Bulletin*, v. 75, n. 1, p. 43–46, 2020.

BERTENYI, K. K. A.; LAMBERT, I. B. The mutational specificity of furazolidone in the lacI gene of Escherichia coli. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 357, n. 1–2, p. 199–208, 1996.

CAMINI, F. C. et al. Oxidative stress in Mayaro virus infection. Virus Research, v. 236, p. 1–8, 2017.

CARNEIRO, S. B. et al. Cyclodextrin-drug inclusion complexes: In vivo and in vitro approaches. International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 3, p. 1–23, 2019.

CARTA, S. et al. DAMPs and inflammatory processes: the role of redox in the different outcomes. Journal of Leukocyte Biology, v. 86, n. 3, p. 549–555, 2009.

CARVALHO, S. et al. Research in Veterinary Science Physicochemical and in vitro biological evaluations of furazolidone-based β - cyclodextrin complexes in Leishmania amazonensis. Research in Veterinary Science, v. 119, n. June, p. 143–153, 2018.

CARVALHO, S. G. COMPLEXOS DE INCLUSÃO FURAZOLIDONA:CICLODEXTRINAS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CANINA: CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA in vitro. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, 2019.

CARVALHO, S. G. et al. Physicochemical characterization and in vitro biological evaluation of solid compounds from furazolidone-based cyclodextrins for use as leishmanicidal agents. Drug Delivery and Translational Research, v. 10, n. 6, p. 1788–1809, 2020.

CHADFIELD, M. S.; HINTON, M. H. Effects of furazolidone pretreatment of Salmonella enteritidis PT4 at sub- and suprainhibitory concentrations on phagocytosis and intracellular survival in chicken macrophages. v. 100, p. 81–97, 2004.

CORRE, I.; PARIS, F.; HUOT, J. The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that

transduces stress and metastatic signals in endothelial cells. *Oncotarget*, v. 8, n. 33, p. 55684–55714, 2017.

CUNA, W. R. et al. Enhancement of a TH1 immune response in amphotericin B-treated mucocutaneous leishmaniasis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2007, p. 2–5, 2007.

DAI, C. et al. Curcumin ameliorates furazolidone-induced DNA damage and apoptosis in human hepatocyte L02 cells by inhibiting ROS production and mitochondrial pathway. *Molecules*, v. 21, n. 8, 2016.

DAVID M UNDERHILL. Macrophage recognition of zymosan particles. *J Endotoxin Res*, p. (3):176-80, 2003.

DE ANGELIS, I. et al. Metabolism of furazolidone: Alternative pathways and modes of toxicity in different cell lines. *Xenobiotica*, v. 29, n. 11, p. 1157–1169, 1999.

DEAK, E. et al. Murine visceral leishmaniasis : IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. p. 1355–1368, 2010.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 9, p. 1033–1046, 2004.

DENG, S. et al. P21Waf1/Cip1 plays a critical role in furazolidone-induced apoptosis in HepG2 cells through influencing the caspase-3 activation and ROS generation. *Food and Chemical Toxicology*, v. 88, p. 1–12, 2016.

FEITOSA, I. B. et al. What are the immunopharmacological effects of furazolidone? A systematic review. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 0, n. 0, p. 1–6, 2021.

GIDWANI, B.; VYAS, A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *BioMed Research International*, v. 2015, 2015.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. DA C. et al. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. OCT,

2017.

GUT, A. M. et al. Salmonella infection – Prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: A review. *Microbiology (United Kingdom)*, v. 164, n. 11, p. 1327–1344, 2018.

HEIDARPOUR, M. et al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. *Parasitology Research*, v. 111, n. 4, p. 1491–1496, 2012.

HORTA, M. F. et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitology Research*, v. 2012, 2012.

HUTTNER, A. et al. Nitrofurantoin revisited: A systematic review and meta-analysis of controlled trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 9, p. 2456–2464, 2015.

JA, A.; KUCHROO, V. K. Effector and Regulatory T-cell Subsets in Autoimmunity and Tissue Inflammation. p. 173–184, 2010.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *Journal of Immunological Methods*, 2015.

KHADEMI, F.; SAHEBKAR, A. An Updated Systematic Review and Meta-Analysis on the Helicobacter pylori Antibiotic Resistance in Iran (2010-2020). *Microbial Drug Resistance*, v. 26, n. 10, p. 1186–1194, 2020.

KROPF, P. et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *The FASEB Journal*, v. 19, n. 8, p. 1000–1002, 2005.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. v. 3, n. August, p. 1–10, 2012.

KUPANI, M. et al. IL-10 and TGF- β Induced Arginase Expression Contributes to Deficient Nitric Oxide Response in Human Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, n. February, p. 1–9, 2021.

LE, V. V. H. et al. In vitro synergy between sodium deoxycholate and furazolidone against

enterobacteria. *BMC Microbiology*, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2020.

LEWKOWSKI, J.; ROGACZ, D.; RYCHTER, P. Hazardous ecotoxicological impact of two commonly used nitrofurantoin-derived antibacterial drugs: Furazolidone and nitrofurantoin. *Chemosphere*, v. 222, p. 381–390, 2019.

MADUREIRA, M. C. et al. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands. v. 81, 2002.

MÁSSON, M. et al. Cyclodextrins as permeation enhancers: Some theoretical evaluations and in vitro testing. *Journal of Controlled Release*, v. 59, n. 1, p. 107–118, 1999.

MCCRACKEN, R. J.; KENNEDY, D. G. Furazolidone in chicken: Case study of an incident of widespread contamination. *British Poultry Science*, v. 54, n. 6, p. 704–712, 2013.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Medicine*, v. 6, n. 7, 2009.

MOKHTARE, M. et al. Comparison of quadruple and triple Furazolidone containing regimens on eradication of helicobacter pylori. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, v. 29, 2015.

MURPHY, B. S. et al. Azithromycin alters macrophage phenotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, n. 3, p. 554–560, 2008.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 11, p. 723–737, 2011.

NAIDU, N. B. et al. Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam-cyclodextrin binary systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 35, n. 1, p. 75–86, 2004.

NORSWORTHY, N. B. et al. Sand Fly Saliva Enhances *Leishmania amazonensis* Infection by Modulating Interleukin-10 Production. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 3, p. 1240–1247, 2004.

NOWAK, E. C.; NOELLE, J. Interleukin- 9 as a T helper type 17 cytokine. p. 169–173, 2010.

NYLEN, S.; SHALINI, G. Immunological perspectives of leishmaniasis. *Journal of global infectious disease*, v. 2, n. 2, p. 135–146, 2010.

OKEKE, E. B.; UZONNA, J. E. The Pivotal Role of Regulatory T Cells in the Regulation of Innate Immune Cells. v. 10, n. April, p. 1–12, 2019.

OTTA, D. A. et al. crossm Identification of Anti- *Trypanosoma cruzi* Lead Compounds. p. 1–13, 2018.

PAHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas N° 7 - Março, 2019. *Informe de Leishmanioses N° 7*, v. 1, p. 1–27, 2019.

PUSHPAKOM, S. et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 18, n. 1, p. 41–58, 2018.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. 2007.

RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasites & Vectors*, p. 1–13, 2016.

RODRIGUEZ, P. C.; OCHOA, A. C.; AL-KHAMI, A. A. Arginine metabolism in myeloid cells shapes innate and adaptive immunity. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. FEB, 2017.

ROGERS, K. A.; TITUS, R. G. Immunomodulatory effects of *Maxadilan* and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. *Parasite Immunology*, v. 25, n. 3, p. 127–134, 2003.

RONET, C. et al. *Leishmania major*-Specific B Cells Are Necessary for Th2 Cell Development and Susceptibility to *L. major* LV39 in BALB/c Mice. *The Journal of Immunology*, p. 4825–4835, 2008.

SANTOS, H. M. M. et al. Obtenção de pellets por extrusão e esferonização farmacêutica: parte I. avaliação das variáveis tecnológicas e de formulação. *Revista Brasileira de Ciências*

Farmacêuticas, v. 40, n. 4, p. 455–470, 2004.

SCHRAIBER, L. B. et al. Planejamento, gestão e avaliação em saúde: identificando problemas. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 4, n. 2, p. 221–242, 1999.

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

SHETNEV, A. et al. 1,2,4-oxadiazole/2-imidazoline hybrids: Multi-target-directed compounds for the treatment of infectious diseases and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 7, p. 1–10, 2019.

SILVEIRA, F. T.; CAMPOS, M. B. Revendo a trajetória da leishmaniose visceral americana na Amazônia, Brasil: de Evandro Chagas aos dias atuais. p. 15–22, 2016.

SMELT, S. C. et al. B Cell-Deficient Mice Are Highly Resistant to *Leishmania donovani* Infection, but Develop Neutrophil-Mediated Tissue Pathology. 2000.

SONG, C. et al. Effectiveness and safety of furazolidone-containing quadruple regimens in patients with *Helicobacter pylori* infection in real-world practice. *Helicobacter*, v. 24, n. 4, p. 1–12, 2019.

STELLA, V. J. et al. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 36, n. 1, p. 3–16, 1999.

SUN, Y. et al. Opposite effects of JNK and p38 MAPK signaling pathways on furazolidone-stimulated S phase cell cycle arrest of human hepatoblastoma cell line. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 755, n. 1, p. 24–29, 2013.

TANAKA, Y. et al. Control of polarization and tumoricidal activity of macrophages by multicellular spheroid formation. *Journal of Controlled Release*, v. 270, p. 177–183, 2018.

TAVARES, N. M. et al. Understanding the mechanisms controlling *leishmania amazonensis* infection in vitro: The role of LTB₄ derived from human neutrophils. *Journal of Infectious Diseases*, v. 210, n. 4, p. 656–666, 2014.

TEIXEIRA, C. R. et al. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* Induces CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Recruitment . *The Journal of Immunology*, v. 175, n. 12, p. 8346–8353, 2005.

TELES, C. B. G. et al. Activity of the lupane isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, n. 5, p. 936–942, 2011.

THOMAS, B. N.; BUXBAUM, L. U. Fc γ RIII Mediates Immunoglobulin G-Induced Interleukin-10 and Is Required for Chronic *Leishmania mexicana* Lesions \square . v. 76, n. 2, p. 623–631, 2008.

THOMAS, K. et al. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 485–517, 2009.

TIMPERIO, A. M.; KUIPER, H. A.; ZOLLA, L. Identification of a furazolidone metabolite responsible for the inhibition of amino oxidases. *Xenobiotica*, v. 33, n. 2, p. 153–167, 2003.

TIWARI, G. et al. Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, v. 2, n. 1, p. 2, 2012.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; TACIANE, B.; ASSOLINI, J. P. Macrophage Polarization in Leishmaniasis : Broadening Horizons. v. 9, n. October, p. 1–12, 2018.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis : a review [version 1 ; referees : 2 approved] Referee Status : v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.

TUBO, N. J.; JENKINS, M. K. CD4⁺ T cells: Guardians of the phagosome. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 27, n. 2, p. 200–213, 2014.

URIBE-QUEROL, E.; ROSALES, C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Frontiers in Immunology*, v. 11, n. June, p. 1–13, 2020.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: Main analytical methods for their determination.

Quimica Nova, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. NOV, p. 1–9, 2014.

YAO, Y.; XU, X. H.; JIN, L. Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. MAR, p. 1–13, 2019.

YOUNG, J.; KIMA, P. E. The leishmania parasitophorous vacuole membrane at the parasite-host interface. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 92, n. 3, p. 511–521, 2019.

ZAIDI, A.; SINGH, K. P.; ALI, V. Leishmania and its quest for iron: An update and overview. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 211, p. 15–25, 2017.

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research*, v. 15, n. 1, p. 11–18, 2005.

ZHANG, J. et al. Amphotericin B suppresses M2 phenotypes and B7-H1 expression in macrophages to prevent Raji cell proliferation. *BMC Cancer*, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2018.

ZHUGE, L. et al. Furazolidone treatment for Helicobacter Pylori infection: A systematic review and meta-analysis. *Helicobacter*, v. 23, n. 2, p. 1–11, 2018.

ZUMA, N. H.; AUCAMP, J.; N'DA, D. D. An update on derivatisation and repurposing of clinical nitrofurans. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 140, n. August, p. 105092, 2019.

Atividade desenvolvidas durante o período de doutorado (2019 à 2021)

❖ **Participação no congresso *Pan-Amazônico de Oncologia 2019*.**

- I. Submissão do trabalho: Atividade antitumoral de triterpenos pentacíclicos em cultura de linhagens de células hematológicas malignas K562.
- II. Premiação e certificado de menção honrosa no congresso: Melhor apresentação e estrutura de trabalho. Premiado na área de tratamento multimodal em oncologia.

❖ **Participação no congresso *XLIV Congress of the Brazilian Society of Immunology, XII ESCI - Extra Section of Clinical Immunology: Immunotherapy: Recent Advances and Future for Therapeutic Interventions. 2019*.**

- I. Ouvinte

❖ **Organização de Evento**

- I. Organizou o minicurso: Tópicos Avançados em Imunologia. Desenvolvido no Conselho Regional de Medicina de Rondônia. 2019.
- II. Participou da organização do Immunoday, no Centro de Ciências Biológicas, UFAM. 2019.

❖ **Estágio no Instituto de Medicina Integral profº Fernando Figueira – IMIP**

- I. Treinamento em imunodiagnóstico de leucemias e linfomas, no laboratório de diagnósticos especiais em Oncologia. 2020

❖ **Publicação de artigo:**

- I. Life sciences (**A1**): What are the immune responses during the growth of Ehrlich's tumor in ascitic and solid form?. Autores: Ivan Brito Feitosa, Bruno Mori, Carolina Bioni Garcia Teles, Allyson Guimarães Costa. 2020.
- II. Immunopharmacology and immunotoxicology (**A3**): What are the immunopharmacological effects of furazolidone? systematic review. Autores: Ivan Brito Feitosa, Bruno Mori, Carolina Bioni Garcia Teles, Allyson Guimarães Costa 2021.
- III. Brazilian Journal of Development (**B2**). Cesarean delivery modulate intestinal microbiome and Th9 cell answer propensity to allergic diseases?. 2021
- IV. Brazilian Journal of Development (**B2**). Sono e imunidade: papel do sistema imune, distúrbios do sono e terapêuticas. 2021.

ANEXOS:

Anexo 01: Publicação de Artigo, Revisão Sistemática.

Publicado na revista: *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2021

Doi: 10.1080/08923973.2021.1979034

What are the immunopharmacological effects of furazolidone? A systematic review

Authors and affiliations

Ivan Brito Feitosa^{1,2}, Bruno Mori¹, Ana Paula de Azevedo dos Santos^{3,4}, Janaína Cecília Oliveira Villanova^{5,6}, Carolina Bioni Garcia Teles^{3,4}, Allyson Guimarães Costa^{1,7}.

1. Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA), Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brazil.
2. Departamento de Medicina, Faculdade Metropolitana de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil.
3. Plataforma Técnica de Bioensaio de Malária e Leishmaniose, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz-Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil.
4. Departamento de Medicina, Centro Universitário São Lucas, Porto Velho, Rondônia, Brazil.
5. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brazil.
6. Laboratório de Produção Farmacêutica, Departamento de Farmácia e Nutrição Department of Pharmacy and Nutrition, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brazil.
7. Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Amazonas, Brazil.

Corresponding author

I.B. Feitosa,

Telephone: 55 + 69 99235-2711

E-mail: ivan.pvh.bio@gmail.com

Address: Avenida General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, CEP: 69080-900, Manaus, Amazonas, Brazil