



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

ALINE GISELE VASCONCELOS DE ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO E TESTAGEM DE ESFEROIDES DÉRMICOS
IMUNOCOMPETENTES PARA ESTUDOS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Recife

2025

ALINE GISELE VASCONCELOS DE ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO E TESTAGEM DE ESFEROIDES DÉRMICOS
IMUNOCOMPETENTES PARA ESTUDOS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

Coorientador: Dr. Marton Kaique de Andrade Cavalcante

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Andrade, Aline Gisele Vasconcelos de.

Desenvolvimento e testagem de esferoides dérmicos imunocompetentes para estudos na leishmaniose cutânea / Aline Gisele Vasconcelos de Andrade. - Recife, 2025.

97 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2025.

Orientação: Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro.

Coorientação: Marton Kaique de Andrade Cavalcante.

Inclui referências e apêndice.

1. Leishmaniose tegumentar; 2. Cultura 3D; 3. Esferoides; 4. Testagem de compostos; 5. Piridinas tiazóis. I. Castro, Maria Carolina Accioly Brelaz de. II. Cavalcante, Marton Kaique de Andrade. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

ALINE GISELE VASCONCELOS DE ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO E TESTAGEM DE ESFEROIDES DÉRMICOS
IMUNOCOMPETENTES PARA ESTUDOS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Aprovado em: 27/ 02/ 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Valéria Rêgo Alves Pereira (Examinadora Interna)
Instituto Aggeu Magalhães- FIOCRUZ-PE

Prof. Dr. Policarpo Ademar Sales Junior (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães- FIOCRUZ-PE

Prof. Dr. Alex José de Melo Silva (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães- FIOCRUZ-PE

AGRADECIMENTOS

A jornada até aqui não foi fácil, mas cada desafio superado me tornou mais forte e determinada. Olhando para trás, percebo que essa conquista não é apenas minha, mas também de todos que, de alguma forma, estiveram ao meu lado, oferecendo apoio, incentivo e sabedoria.

Primeiramente, agradeço a Deus, pela força, resiliência e pelas oportunidades que me permitiram chegar até aqui.

À minha família, minha base e porto seguro, por todo o amor e incentivo incondicional. Em especial, aos meus pais, cuja confiança e incentivo constantes foram e são fundamentais para que eu consiga alcançar tudo que almejo.

Ao meu companheiro de vida, Vinicius, pelo carinho, paciência e suporte em todos os momentos, celebrando as pequenas e grandes vitórias sempre ao meu lado.

À minha querida orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Carolina Accioly, por sua orientação precisa, paciência e ensinamentos valiosos, que foram essenciais para a construção deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Marton Kaique, por toda a dedicação e suporte técnico e acadêmico, sempre disposto a ajudar.

À Dr^a. Vália, por ter me acolhido em seu laboratório e proporcionado um ambiente de aprendizado e crescimento científico.

Aos meus amigos Beatriz, Mauro e Valesca, por serem mais do que amigos, mas verdadeiros pilares de apoio. Obrigada por todas as conversas, risadas e por serem o refúgio nos dias ruins.

Aos colegas e amigos de trabalho (LIBMers), que compartilharam comigo essa caminhada, dividindo desafios e conquistas, tornando essa jornada mais leve e significativa.

Ao Instituto Aggeu Magalhães, por toda infraestrutura e equipamentos utilizados para execução deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - (FACEPE), pela concessão da bolsa que contribuiu para desenvolvimento da pesquisa.

E, por fim, agradeço também às pessoas que não citei, mas que, de alguma forma, contribuíram para essa trajetória, seja com um conselho, um gesto de apoio ou simplesmente acreditando em mim. Meu sincero agradecimento a cada um de vocês.

“Tudo o que é seu encontrará uma maneira de chegar até você.”

(Chico Xavier)

RESUMO

A leishmaniose cutânea (LC) é um problema de saúde pública, especialmente em Pernambuco, onde casos são registrados em todas as regiões do Estado. A doença se manifesta por lesões cutâneas, geralmente nódulos crostosos ulcerativos, após a infecção pela *Leishmania* spp. Atualmente, os tratamentos disponíveis são limitados, tóxicos e apresentam uma série de efeitos adversos, além de não haver vacina para a sua prevenção. Nesse contexto, a cultura 2D tem sido amplamente utilizada ao longo dos anos na busca por alternativas terapêuticas, porém, sua incapacidade de refletir com precisão a resposta *in vivo* dificulta a translação dos resultados, mantendo a necessidade de estratégias mais representativas do ambiente biológico. Modelos 3D, como os esferoides, oferecem uma representação mais fiel da geometria e interação da matriz extracelular, além de serem mais fáceis de reproduzir e terem custo e tempo de cultivo reduzidos. Embora esferoides sejam amplamente usados na descoberta de fármacos, ainda não foram desenvolvidos modelos imunocompetentes aplicados em estudos da LC. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver e testar um modelo de esferoide dérmico imunocompetente para estudos na LC. Além disso, testes *in vitro* foram realizados com compostos piridinas tiazóis (3a, 3g e 4e), para investigar a atividade leishmanicida sobre diferentes formas evolutivas promastigotas e amastigotas da *Leishmania amazonensis*. Ao testar os compostos leishmanicidas com as formas promastigotas, o composto 3a se destacou apresentando um melhor valor de IC₅₀ (1,5 µg/mL) e uma maior seletividade para os parasitas do que para a cultura de macrófagos J774 (25,3 µg/mL) e para a co-cultura dessas células com fibroblastos L929 (42,1 µg/mL) quando comparados com as drogas de referência anfotericina B (AmB), antimônio trivalente (Sb III) e os outros compostos testados. Tanto as drogas de referência quanto os compostos se mostraram capazes de diminuir o potencial de membrana mitocondrial e de causar morte celular, principalmente por apoptose recente, nas formas promastigotas do parasita. A construção dos esferoides dérmicos imunocompetente murinos pela técnica de levitação magnética foi bem-sucedida e foi observada a manutenção da integridade, morfologia e compactação ao longo dos experimentos. Ademais, a infecção desses esferoides com a *L. amazonensis* também foi eficiente, sendo observada uma leve degradação dos esferoides a partir das 72 horas de formação. Nos esferoides infectados, o composto 3a se destacou, diminuindo significativamente a carga parasitária, conforme avaliação por RT-qPCR. Quanto à produção de citocinas pelos esferoides, observou-se que, no tratamento com os compostos 3a e AmB, foram detectadas citocinas associadas a um perfil de resposta pró-inflamatória (TNF e IL-6), que desempenham papel importante na resolução da doença. De maneira geral, os esferoides dérmicos imunocompetentes se demonstraram uma ferramenta promissora em estudos de novas drogas para o tratamento da leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar; Cultura 3D; Esferoides; Testagem de compostos; Piridinas tiazóis.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a public health problem, especially in Pernambuco, where cases are reported in all regions of the state. The disease manifests as skin lesions, usually crusted ulcerative nodules, after infection by *Leishmania* spp. Currently available treatments are limited, toxic, and have a range of adverse effects, in addition to the absence of a vaccine for prevention. In this context, 2D culture systems have been widely used over the years in the search for therapeutic alternatives; however, their inability to accurately reflect the in vivo response hinders the translation of results, maintaining the need for strategies that are more representative of the biological environment. 3D models, such as spheroids, provide a more accurate representation of the geometry and interaction with the extracellular matrix, and are easier to reproduce, with reduced cost and cultivation time. Although spheroids are widely used in drug discovery, immunocompetent models applied to CL studies have not yet been developed. Therefore, the aim of this study was to develop and test an immunocompetent dermal spheroid model for CL studies. In addition, in vitro tests were conducted with thiazolylpyridine compounds (3a, 3g, and 4e) to investigate their leishmanicidal activity on different evolutionary forms of *Leishmania amazonensis* (promastigote and amastigote forms). Upon testing the leishmanicidal compounds with the promastigote forms, compound 3a stood out, presenting the best IC₅₀ value (1.5µg/mL) and higher selectivity for the parasites compared to J774 macrophage cultures (25.3µg/mL) and co-cultures of these cells with L929 fibroblasts (42.15µg/mL), when compared to the reference drugs amphotericin B (AmB), trivalent antimony (Sb III), and the other tested compounds. Both reference drugs and the compounds were able to decrease mitochondrial membrane potential and cause cell death, primarily by recent apoptosis, in the promastigote forms of the parasite. The construction of immunocompetent dermal spheroids using magnetic levitation technology was successful, and the integrity, morphology, and compaction of the spheroids were maintained throughout the experiments. Furthermore, the infection of these spheroids with *L. amazonensis* was also efficient, with slight degradation of the spheroids observed starting at 72 hours post-formation. In the infected spheroids, compound 3a stood out by significantly decreasing the parasitic load, as assessed by RT-qPCR. Regarding cytokine production by the spheroids, it was observed that treatment with compounds 3a and AmB induced the detection of cytokines associated with a pro-inflammatory response profile (TNF and IL-6), which play a key role in disease resolution. Overall, the immunocompetent dermal spheroids proved to be a promising tool for studies of new drug candidates for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis; 3D culture; Spheroids; Compound screening; Thiazolyl-pyridines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Formas evolutivas da <i>Leishmania</i> spp. A) formas promastigotas. B) Formas amastigotas.	18
Figura 2- Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.	19
Figura 3- Países endêmicos da leishmaniose cutânea no mundo em 2022.	21
Figura 4- Formas clínicas da Leishmaniose cutânea: A– Forma cutânea localizada; B– Forma disseminada; C– Forma difusa; D– Forma mucocutânea.	22
Figura 5- Esquematização dos aspectos da imunidade inata e adaptativa na infecção por <i>Leishmania</i>	26
Figura 6- Esquematização do diagnóstico da leishmaniose cutânea.	28
Figura 7- Modelos de cultura 2D vs 3D: A–Comportamento celular em cultura de células convencionais 2D; B– Comportamento celular em cultura de células 3D.	35
Figura 8-Tipos de biofabricação para a construção de modelos de tecidos 3D.	38
Figura 9- Métodos de formação dos esferoides celulares. a) Baseados em andaime; b) Gota suspensa; c) Superfície não aderente; d) Cultura rotativa; e) Levitação magnética.	40
Figura 10- Diagrama do processo de formação e infecção dos esferoides celulares.	52
Figura 11- Representação gráfica da citometria de fluxo para análise da ação dos compostos AmB, Sb III, 3a, 3g e 4e no potencial da membrana mitocondrial de promastigotas da <i>Leishmania amazonensis</i>	60
Figura 12- Representação gráfica da avaliação da morte celular por apoptose e necrose das formas promastigotas tratadas com 1x, 2x e 4x os valores da IC ₅₀ dos compostos AmB, SbIII, 3a, 3g e 4e.	61
Figura 13- Aquisição por citometria de fluxo para análise morte celular com Anexina V e iodeto de propídio.	62
Figura 14 - Formação dos esferoides dérmicos murinos ao longo dos dias. Aumento de 20x.	63
Figura 15- Acompanhamento dos esferoides murinos infectados com a <i>L. amazonensis</i> ao longo dos dias. Aumento de 20x.	64
Figura 16- Representação gráfica da quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados tratados com 1x,2x, e 4x o valor da IC ₅₀ da AmB e composto 3a por qPCR.	66

Figura 17- Gráfico de amplificação do kDNA da <i>Leishmania</i> referente ao controle negativo (NTC) do experimento de quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados e tratados	66
Figura 18- Gráfico de amplificação do kDNA da <i>Leishmania</i> referente a curva padrão variando de 50ng a 0,5 fg do experimento de quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados.	67
Figura 19- Gráfico de amplificação do kDNA da <i>Leishmania</i> referente a quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados e sem tratamento.	67
Figura 20- Gráfico de amplificação do kDNA da <i>Leishmania</i> referente a quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados tratados com 1x o valor da IC ₅₀ da AmB.	68
Figura 21- Gráfico de amplificação do kDNA da <i>Leishmania</i> referente a quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados tratados com 2x o valor da IC ₅₀ da AmB.	68
Figura 22- Gráfico de amplificação do kDNA da <i>Leishmania</i> referente a quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados tratados com 4x o valor da IC ₅₀ da AmB.	69
Figura 23- Gráfico de amplificação do kDNA da <i>Leishmania</i> referente a quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados tratados com 1x o valor da IC ₅₀ do composto 3a.....	69
Figura 24- Gráfico de amplificação do kDNA da <i>Leishmania</i> referente a quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados tratados com 2x o valor da IC ₅₀ do composto 3a.....	70
Figura 25- Gráfico de amplificação do kDNA da <i>Leishmania</i> referente a quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados tratados com 4x o valor da IC ₅₀ do composto 3a.....	70
Figura 26- Produção de TNF em esferoides dérmicos murinos não infectados (NI) e infectados (INF) tratados com os compostos AmB e 3a nas concentrações de 1x, 2x e 4x o valor da IC ₅₀	72
Figura 27- Produção de IL-6 em esferoides dérmicos murinos não infectados (NI) e infectados (INF) tratados com os compostos AmB e 3a nas concentrações de 1x, 2x e 4x o valor da IC ₅₀	73
Figura 28- Controles sem tratamento e sem marcação.....	97

Figura 29- Controles sem tratamento e marcados apenas com Anexina V.....	97
Figura 30- Controles sem tratamento e marcados apenas com Iodeto de Propídeo.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Atividade citotóxica de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis frente a macrófagos J774, fibroblastos L929 e J774 e L929 em co-cultura.	55
Tabela 2- Atividade leishmanicida de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis frente a promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	56
Tabela 3- Índice de Seletividade (IS) para a forma promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis.....	57
Tabela 4- Atividade leishmanicida de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis frente a amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	58
Tabela 5- Efeito dos compostos AmB, Sb III, 3a, 3g e 4e concentrações de 1x, 2x e 4x os valores da IC ₅₀ sobre o potencial da membrana mitocondrial.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmB	Anfotericina B
CBA	Cytometric Bead Array
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
DCs	Células dendríticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (Do inglês Enzyme-linked Immunosorbent assay)
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células
IFI	Reação de Imunofluorescência indireta
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
INF	Infectado
iNOS	<i>Óxido nítrico sintase induzida</i>
IS	Índice de Seletividade
IV	Índice de Variação
kDNA	DNA cinetoplastal
LC	Leishmaniose cutânea
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
MEC	Matriz extracelular
MTT	Brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-bifenil tetrazolium)
NETs	Armadilhas extracelulares dos neutrófilos (do inglês neutrophil extracellular traps)
NI	Não infectado
NK	Células Natural Killer
NO	Óxido nítrico
PCR	Reação em cadeia de polimerase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SB III	Antimonial Trivalente
SB V	Antimonial Pentavalente
SFB	Soro fetal bovino
Th	Linfócito T auxiliar (Do inglês T helper)
TNF	Fator de Necrose Tumoral (Tumor necrosis fator)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES	18
2.2 LEISHMANIOSE CUTÂNEA	20
2.2.1 Sintomas e formas clínicas	21
2.2.2 Aspectos imunológicos	23
2.2.3 Diagnóstico	26
2.2.4 Tratamento	28
2.3 PIRIDINAS TIAZÓIS	31
2.4 CULTURA DE CÉLULAS	32
2.4.1 Cultura 2D x cultura 3D	33
2.4.2 Sistemas de cultura celular 3D	35
2.4.3 Esferoides	38
2.5 MÉTODOS DE ESTUDOS EM PESQUISAS COM PELE <i>IN VITRO</i>	41
3 JUSTIFICATIVA	43
4 OBJETIVOS	46
4.1 OBJETIVO GERAL	46
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
5 METODOLOGIA	47
5.1 CULTURAS CELULARES	47
5.1.1 Cultura de células de linhagem murina	47
5.1.2 Cultura do parasito	47
5.2 COMPOSTOS	47
5.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR MTT	47
5.4 ENSAIOS LEISHMANICIDAS	48
5.4.1 Promastigotas	48
5.4.2 Amastigotas	49
5.4.3 Análise do potencial da membrana mitocondrial	49
5.4.4 Análise de viabilidade e morte celular	50
5.5 ELABORAÇÃO E INFECÇÃO DO ESFEROIDE DÉRMICO IMUNOCOMPETENTE MURINO	51

5.6 ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DOS ESFEROIDES DÉRMICOS INFECTADOS.....	52
5.7 DOSAGEM DE CITOCINAS DOS ESFEROIDES DÉRMICOS IMUNOCOMPETENTES POR CITOMETRIA DE FLUXO	52
5.8 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (ON).....	53
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
6 RESULTADOS.....	54
6.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS COMPOSTOS EM CULTURA 2D DE CÉLULAS MURINAS.....	54
6.1.1 Macrófagos J774.....	54
6.1.2 Fibroblastos L929	54
6.2.3 Co-cultura J774 e L929.....	54
6.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS COMPOSTOS EM <i>Leishmania amazonensis</i> ...	55
6.2.1 Formas promastigotas	55
6.2.2 Formas amastigotas	57
6.2.3 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial	58
6.2.4 Avaliação da morte celular por citometria de fluxo.....	61
6.3 ESFEROIDES DÉRMICOS MURINOS.....	62
6.3.1 Esferoides dérmicos não infectados	62
6.3.2 Esferoides dérmicos infectados.....	64
6.4 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DOS ESFEROIDES DÉRMICOS INFECTADOS.....	65
6.5 PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM SOBRENADANTES DAS CULTURAS	71
6.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (ON)	73
7 DISCUSSÃO.....	74
8 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR DOS CONTROLES QUE DELIMITARAM OS GATES DA CITOMETRIA DE FLUXO	98

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença parasitária negligenciada que constitui um grave problema de saúde pública em várias partes do mundo, acometendo mais de 140 países distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com a incidência estimada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de 700.000 a 1 milhão de novos casos anualmente (WHO, 2023).

Essa parasitose é causada pelo agente etiológico *Leishmania* spp., protozoários da ordem dos Kinetoplastidae e da família dos Trypanosomatidae (Knight *et al.*, 2023). A transmissão para o hospedeiro humano se dá através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas pelo parasito no momento do repasto sanguíneo (Carmichael *et al.*, 2021).

Dentre o amplo espectro de manifestações clínicas da leishmaniose, a doença é dividida em leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose visceral (LV), que vão variar de acordo com a espécie de parasito envolvida na infecção e da resposta imune do hospedeiro (Hong *et al.*, 2020; Mann *et al.*, 2021). Entre as diferentes formas clínicas da doença, a LC é a mais comum e é caracterizada pelo aparecimento de uma ou mais úlceras com fundo necrótico e bordas elevadas que se desenvolvem semanas a meses após a picada e inoculação do parasita na pele do hospedeiro (Nieva *et al.*, 2021).

O tratamento utilizado para a leishmaniose até os dias atuais é baseado na utilização de cinco fármacos: os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B e a sua formulação lipossomal, a miltefosina, a paromomicina e a pentamidina. Atualmente não há vacina humana para a doença e existem algumas restrições relacionadas às opções de tratamento disponíveis, incluindo alto custo, baixa eficácia, necessidade de múltiplas injeções e da resistência dos parasitas aos medicamentos utilizados. Além disso, as drogas utilizadas no tratamento da doença são bastante tóxicas e apresentam vários efeitos adversos (Dinc, 2022; Pradhan *et al.*, 2022; Santiago, 2021). Sendo assim, torna-se essencial a busca por compostos com baixa toxicidade, eficazes para todas as formas clínicas da doença e, principalmente, com efeitos colaterais mínimos para o indivíduo (Dos Santos Silva, 2021).

Entre os diversos grupos químicos que vêm sendo estudados para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose, as tiossemicarbazonas apresentam resultados promissores. Os tiazóis, uma classe de

compostos heterocíclicos, apresentam uma ampla gama de atividade biológica, como atividade antitumoral, antibacteriana, antiinflamatória e leishmanicida (de Oliveira, 2020). Do mesmo modo, os derivados de piridina mostraram ser agentes com potente atividade anti-*T. cruzi*, um parasita que faz parte da mesma família (Trypanossomatidae) da *Leishmania* (Dias *et al.*, 2007; Lessa *et al.*, 2011).

Ao longo dos anos, a metodologia de cultura de células veio ganhando espaço nos estudos para diversas doenças, principalmente como um modelo alternativo para o uso de animais, já que são modelos que provaram ser facilmente replicáveis, rápidos e econômicos (Husain *et al.*, 2023). A cultura celular auxilia na compreensão da biologia celular, morfologia dos tecidos, mecanismos das doenças, ação de drogas, produção de proteínas e o desenvolvimento da engenharia de tecidos (Białkowska *et al.*, 2020; Kapałczyńska *et al.*, 2018; Sandle, 2021). Com o avanço das técnicas, a cultura 3D vem sendo amplamente difundida justamente por apresentarem uma facilidade maior de ser manipulada para mimetizar o ambiente natural da célula *in vivo*, a interação célula-matriz e a interação célula-célula (Jensen; Teng, 2020).

Sendo um tipo de cultura 3D, os esferoides são agregados celulares que se automontam de maneira livre de andaimes, preservando assim as interações célula-célula e o fenótipo específico do tecido. Esses esferoides têm sido amplamente utilizados no processo de descoberta de fármacos para diversas patologias (Jensen; Teng, 2020; Langhans, 2018; Shao *et al.*, 2020). Todavia, ainda não há pesquisas utilizando esferoides imunocompetentes para estudos da leishmaniose cutânea.

Dessa forma, neste estudo, utilizando a cultura 3D, elaboramos um modelo de esferoide dérmico imunocompetente, o infectamos com *L. amazonensis* e avaliamos a ação de compostos leishmanicidas, analisando a redução da carga parasitária e a modulação da produção de citocinas no mesmo. Buscamos assim estabelecer um modelo para a triagem de novas drogas que sejam menos tóxicas e mais eficientes contra a leishmaniose cutânea.

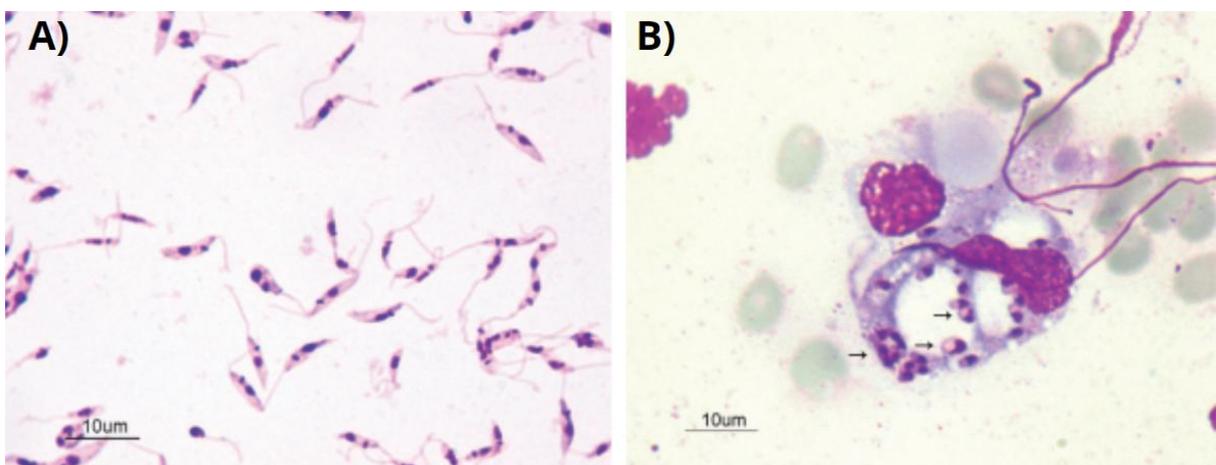
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias negligenciadas causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* da família dos Trypanosomatidae. Atualmente, as leishmanioses encontram-se amplamente distribuídas nas Américas, Ásia, Europa e África, sendo consideradas um grave problema de saúde pública, uma vez que afetam principalmente populações mais vulneráveis. Estima-se que aproximadamente 350 milhões de pessoas correm risco de infecção, havendo uma média de mortes entre 20.000 e 30.000 anualmente (Gurel; Tekin; Uzun, 2020; Pan american health organization, 2019; Who, 2023).

As *Leishmanias* têm um ciclo de vida digenético, apresentando duas formas evolutivas de desenvolvimento: forma extracelular móvel (promastigotas) e intracelular imóvel (amastigotas) (Figuras 1A e B). As promastigotas são as formas alongadas e com flagelos que se desenvolvem nos flebótomos e são inoculadas no hospedeiro mamífero após a refeição sanguínea do vetor. Já as amastigotas, são as formas do parasita que se desenvolvem internalizadas dentro de fagócitos da célula hospedeira. Essas amastigotas apresentam grande importância médica, uma vez que é a responsável pelas manifestações clínicas da infecção, assim como pela manutenção da infecção (Pacakova *et al.*, 2022; Valigurová; Kolářová, 2023).

Figura 1- Formas evolutivas da *Leishmania* spp. A) formas promastigotas. B) Formas amastigotas.

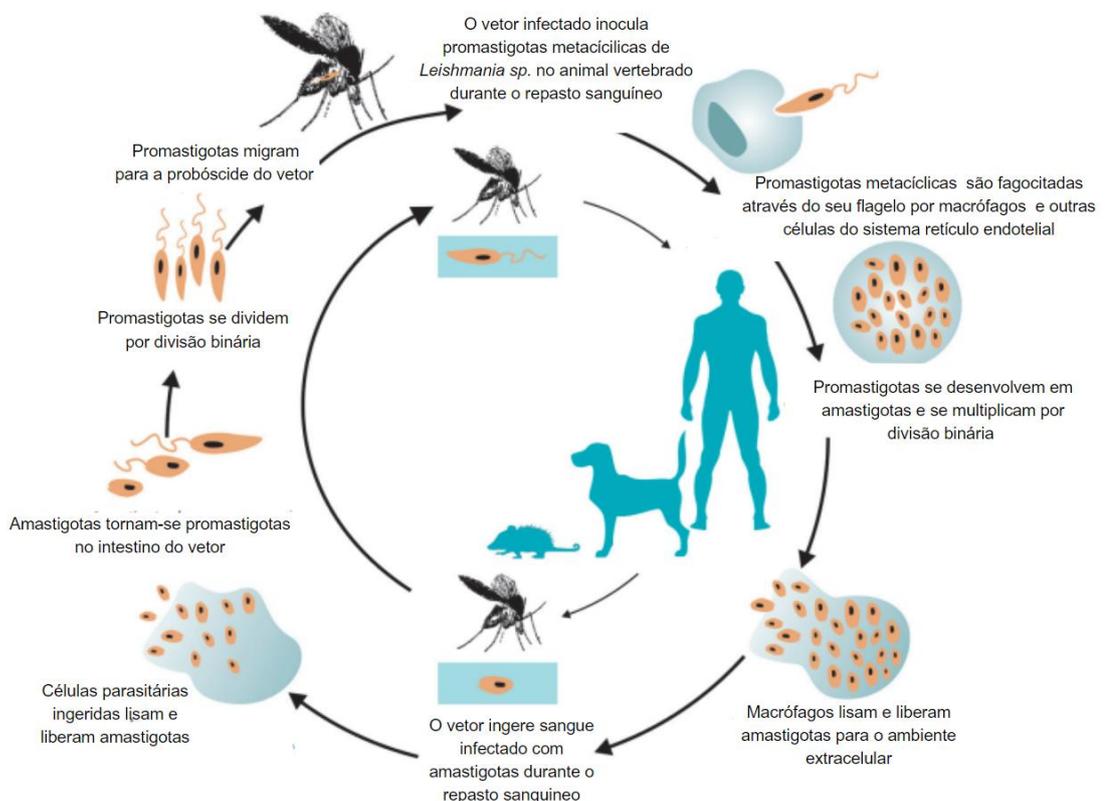


Fonte: Adaptado de Organización Panamericana de la Salud, 2019.

No Brasil, os parasitas que causam as leishmanioses são transmitidos predominantemente através de fêmeas de flebotomíneos infectados do gênero *Lutzomyia*, havendo a inoculação do parasita no momento do repasto sanguíneo. As principais fontes de transmissão são geralmente caninos, roedores ou humanos, dependendo da espécie de parasita, do gênero do vetor e da região geográfica (Pearson; Queiroz, 1990; Wamai *et. al.*, 2020).

Após a inoculação, os parasitas são fagocitados por células do sistema imunológico, principalmente os macrófagos. No entanto, em vez de serem destruídos pelas células de defesa do organismo, os parasitas conseguem sobreviver e multiplicar-se. Uma vez que ocorre a fagocitose pelos macrófagos, os promastigotas se transformam em amastigotas para se adaptarem ao ambiente intracelular, onde podem se multiplicar e persistir por longos períodos (Figura 2). Essa mudança de forma é fundamental para a sobrevivência e replicação dos parasitas dentro das células hospedeiras, contribuindo para a patogênese da leishmaniose (Clos, J., Grünebast, J., & Holm, M, 2022; Vaselek *et al.*, 2020).

Figura 2- Ciclo de vida da *Leishmania* spp.



Tradicionalmente, as leishmanioses têm sido classificadas como do Velho Mundo ou Novo Mundo, dependendo da sua localização geográfica. A leishmaniose do Velho Mundo ocorre na Ásia, África e Europa e é causada principalmente por *L tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica*, *Leishmania infantum* ou *L donovani*. Enquanto a leishmaniose do Novo Mundo, por sua vez, ocorre na América, e é causada principalmente por *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis*, ou *Leishmania infantum chagasi* (Mann *et al.*, 2021).

As manifestações clínicas variam em intensidade de acordo com a espécie do parasita envolvido na infecção e a resposta imune do hospedeiro (Hong *et al.*, 2020). Essas variações abrangem desde a Leishmaniose Visceral (LV), a forma mais grave que, se não tratada corretamente, pode ser fatal, até a Leishmaniose Cutânea (LC), uma forma mais branda da doença que muitas vezes resulta em autocura (Eshetu; Mamo, 2020; Salari, *et al.*, 2022). Na LV, a doença afeta locais sistêmicos, invadindo macrófagos do fígado, baço e medula óssea, com patologia cutânea mínima. No entanto, na LC, a doença concentra-se amplamente na pele (Kaye *et al.*, 2020).

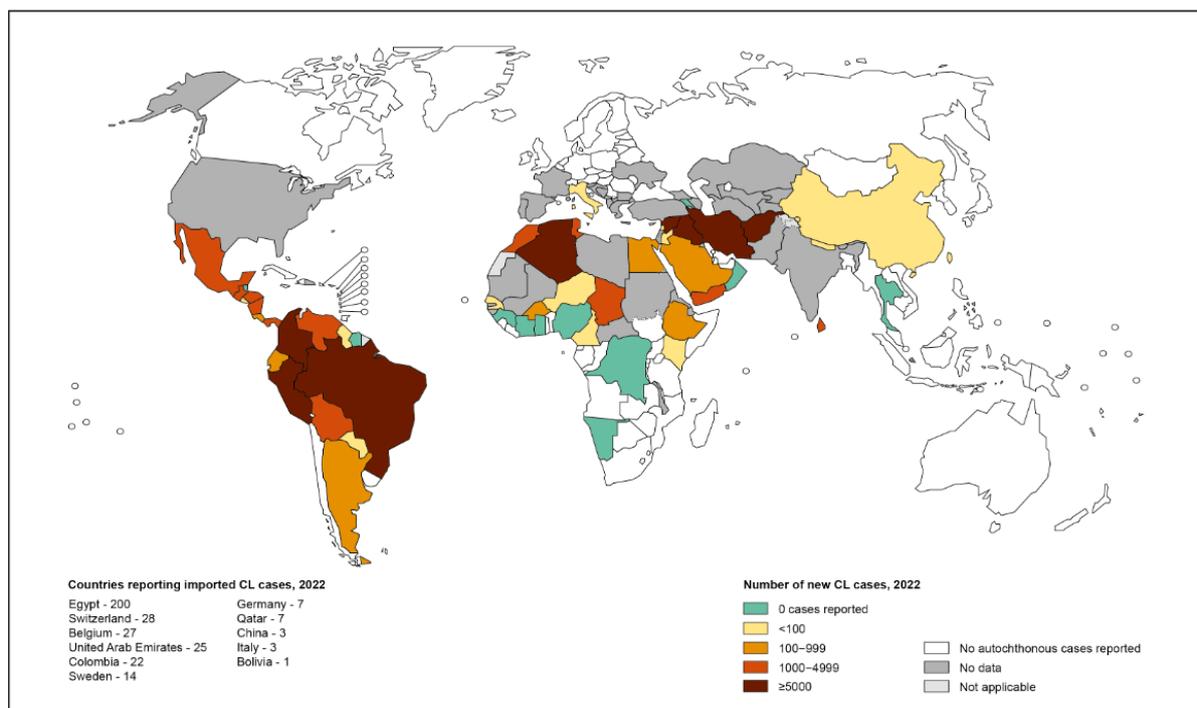
2.2 Leishmaniose cutânea

A leishmaniose cutânea (LC) refere-se a um grupo de doenças negligenciadas, endêmicas nos trópicos e neotrópicos, que apresenta espectro variado de manifestações clínicas (Cecílio; Cordeiro-da-Silva; Oliveira, 2022). É estimado que ocorram anualmente entre 700.000 e 1 milhão de novos casos em todo o mundo, sendo que apenas cerca de 200.000 são notificados à OMS (Who, 2023).

No Brasil, a doença é endêmica em todo território nacional, uma vez que se expandiu também para além dos seus ecótipos naturais devido a perturbações ecológicas antropogênicas, o que possivelmente levou a um aumento nos níveis de exposição aos vetores. Segundo dados do Ministério da Saúde, entre 2003 e 2018, mais de 300.000 casos foram registrados, com uma média anual de 21.158 casos. O Norte e Nordeste do país se destacam nesse panorama, apresentando uma alta prevalência da doença. Isso pode ser atribuído, em parte, à vasta extensão de áreas de mata atlântica nessas regiões, que servem como habitat para uma diversidade de

vetores e reservatórios com distintos padrões de transmissão (Brito *et al.*, 2015; Buzanovsky *et al.*, 2020; Júnior *et al.*, 2019).

Figura 3- Países endêmicos da leishmaniose cutânea no mundo em 2022.



Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2023.

2.2.1 Sintomas e formas clínicas

As lesões na leishmaniose cutânea podem se desenvolver de algumas semanas a meses após a picada do flebotômíneo, sendo geralmente encontradas em partes expostas do corpo, como face, braços e pernas (Volpedo *et al.*, 2021).

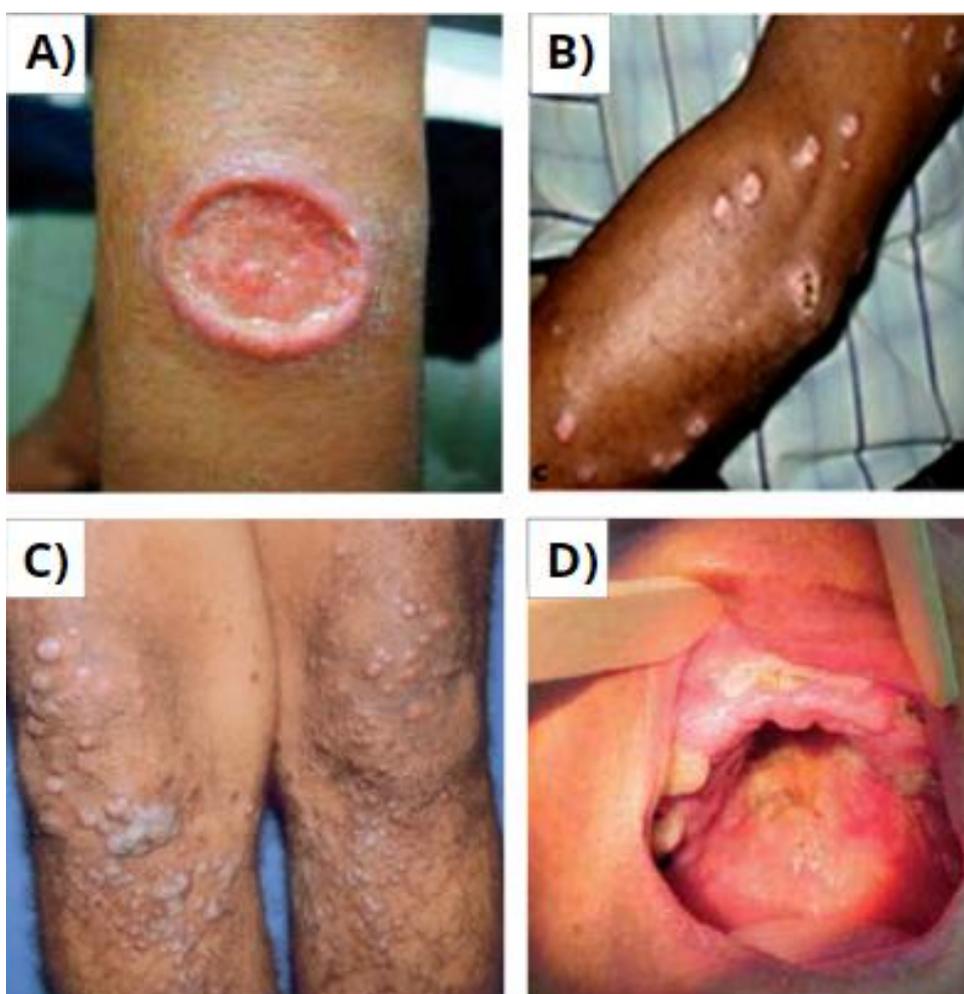
Na LC encontra-se um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo infecção assintomática ou em alguns casos apresentar lesões que se subdividem em formas cutânea localizada, difusa, disseminada e mucocutânea (Figura 4). Essas formas clínicas variam de acordo com a espécie infectante de *Leishmania* envolvida e a resposta imunológica desempenhada pelo hospedeiro (Brasil, 2017; Hong *et al.*, 2020).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a principal forma clínica da doença e se caracteriza por uma ou mais úlceras bem limitadas e com bordas elevadas, que se desenvolvem no local da picada do flebotômíneo infectado. Nesses casos, o eritema evolui para uma pápula, depois nódulo que úlcera progressivamente durante

um período de 2 semanas a 6 meses para se tornar a lesão que é característica de LCL (Figura 4A) (Saldanha *et al.*, 2017; Severino *et al.*, 2022).

A leishmaniose cutânea difusa é geralmente caracterizada por numerosos nódulos e placas não ulceradas com estrutura histopatológica granulomatosa formadas por macrófagos contendo muitos parasitas e poucos elementos linfóides (Figura 4C). Ainda podem ser observadas formas disseminadas, as quais caracterizam-se clinicamente pela presença de múltiplas lesões papulares e ulceradas (Figura 4B). Já na leishmaniose mucocutânea observa-se a destruição das cavidades oral-nasal e faríngea, podendo evoluir para lesões desfigurantes (Figura 4D) (Abadías-Granado, I., *et al.*, 2021; Machado *et al.*, 2024; Sampaio *et al.*, 2021).

Figura 4- Formas clínicas da Leishmaniose cutânea: A- Forma cutânea localizada; B- Forma disseminada; C- Forma difusa; D- Forma mucocutânea.



Fonte: (Brasil, 2017; Vélez *et al.*, 2015; Zerpa *et al.*, 2007).

As lesões e cicatrizes causadas pela doença podem levar à desfiguração significativa e estigmatização social, uma vez que atinge gravemente o funcionamento social e psicológico dos indivíduos afetados, causando ansiedade, depressão, diminuição da satisfação corporal e baixa qualidade de vida. Além disso, a forma mucosa pode também representar uma ameaça à vida, uma vez que a forma mucosa pode levar a complicações graves, como destruição dos tecidos das vias aéreas superiores (Hagos; Zerihun, 2024; Nuwangi *et al.*, 2023).

2.2.2 Aspectos imunológicos

2.2.2.1 Resposta imune inata

Durante a resposta imunológica inata na LC, ocorre o recrutamento de macrófagos, neutrófilos, células *natural killer* (NK) e células dendríticas (DCs), possuindo a importante missão de reconhecer e limitar a propagação do parasita. Os neutrófilos são as primeiras células a migrar para locais infectados e podem exercer uma variedade de mecanismos efetores tais como fagocitose, liberação de enzimas e proteínas antimicrobianas e também a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Eles eliminam agentes infecciosos através de uma potente explosão oxidativa e liberam mediadores tóxicos no vacúolo parasitário (Conceição-Silva; Morgado, 2019; De Menezes; Saraiva; Da Rocha-Azevedo, 2016).

Os macrófagos apresentam grande importância na resposta imunológica à doença. Estas células desempenham um papel fundamental na infecção e persistência do parasita no hospedeiro, pois servem como principais locais de hospedagem para o parasita. Nos macrófagos, os parasitas se diferenciam em amastigotas e essas células proporcionam um ambiente permissivo para a sobrevivência a longo prazo de parasitas persistentes. Porém, os macrófagos também operam como células efetoras anti-*Leishmania*, limitando a proliferação do parasita pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Embora os macrófagos não façam parte diretamente da resposta imune adaptativa, eles desempenham um papel significativo ao serem ativados pelo interferon-gama (IFN- γ) e pelo fator de necrose tumoral (TNF). Esses sinais sinergizam para induzir a expressão da enzima iNOS, que por sua vez é responsável

pela produção de óxido nítrico (NO) (Loría-Cervera; Andrade-Narvaez, 2020; Saidi *et al.*, 2023).

As células *natural killer* (NK) são importantes células do sistema imunológico inato que, uma vez ativadas, têm a capacidade de lisar diretamente macrófagos e DCs infectadas pelo parasita que expressam um fenótipo de superfície celular alterado. Essas células utilizam a atividade citotóxica e a produção precoce de citocinas e quimiocinas antes que a imunidade adaptativa seja induzida, o que pode ajudar no direcionamento da resposta imune para Th1, sendo crucial para o controle eficaz dos parasitas (Becker *et al.*, 2003; Dubie *et al.*, 2020). Simultaneamente, também ocorre uma resposta inflamatória local, envolvendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como CCL3, que atraem outras células imunes para o local da infecção. Monócitos são recrutados da corrente sanguínea por meio da sinalização via CCR2 e podem se diferenciar em células dendríticas derivadas de monócitos, que também fagocitam o parasita e expressam antígenos de *Leishmania*. As células dendríticas, após fagocitarem as *Leishmanias* ou células apoptóticas infectadas, migram para os linfonodos onde apresentam fragmentos do parasita às células T, desencadeando a resposta imunológica adaptativa (Carvalho *et al.*, 2016; de Freitas e Silva; Von Stebut, 2021) (Figura 5).

2.2.2.2 Resposta imune adaptativa

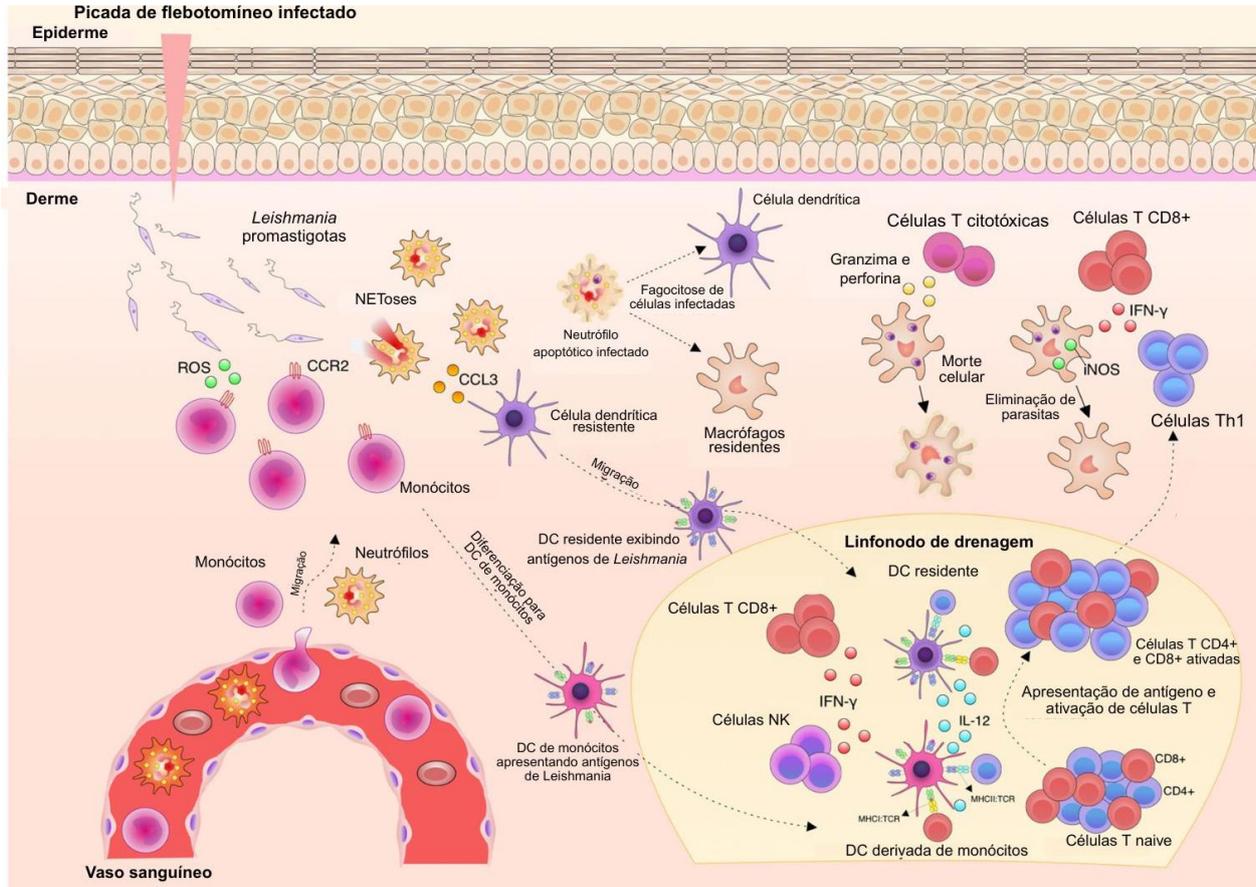
Na leishmaniose cutânea, a resposta imune adaptativa é um elemento essencial na luta contra o parasita e na regulação da inflamação associada à infecção. Essa resposta começa com a ativação das células T específicas para o parasita, desencadeada pela apresentação de antígenos de *Leishmania* pelas células apresentadoras de antígenos. Essas células T, tanto CD4+ quanto CD8+, desempenham papéis distintos na resposta imune (Araujo Flores *et al.*, 2020). As citocinas produzidas pelas células T CD4+ são responsáveis pelo perfil de cura ou agravamento da doença, enquanto as células T CD8+ geralmente estão relacionadas ao processo de cicatrização e proteção imunológica. No entanto, alguns autores também as descrevem como sendo associadas a lesões teciduais (Brelaz-de-Castro *et al.*, 2018; Dubie; Mohammed, 2020; Von Stebut, 2021).

As células T CD4+ podem se diferenciar em subpopulações distintas, como células Th1, Th2, Th17, dependendo do ambiente imunológico local. A capacidade de

resistência à leishmaniose está correlacionada com a geração de uma resposta imune do tipo Th1, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 e IL-23. Essas citocinas ativam os macrófagos, induzem a geração de ROS e aumentam a fagocitose, resultando na eliminação dos parasitas. Por outro lado, a suscetibilidade à infecção está associada ao desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th2 e à produção de citocinas Th2, como IL-4, IL-10, IL-5 e IL-13, que promovem a replicação e persistência dos parasitas (Yasmin *et al.*, 2022; Mirzaei *et al.*, 2021; Morales-Primo *et al.*, 2024; Volpedo *et al.*, 2021). Já as células Th17 produzem citocinas como IL-6, IL-17 e IL-22. É relatado que a resposta de perfil T17 pode influenciar no equilíbrio de citocinas anti e pró-inflamatórias através da expressão de IL-17 que permite modular a resposta adaptativa, podendo mediar também o dano tecidual. Além disso, a IL-17 também contribui para o recrutamento de neutrófilos (Dubie *et al.*, 2020; Gonçalves-de-Albuquerque *et al.*, 2017).

As células T CD8+, também conhecidas como células citotóxicas, podem contribuir para a morte da *Leishmania* ou para a imunopatologia deste parasita (Cunha *et al.*, 2020). Ao reconhecerem as células infectadas, as células CD8+ liberam substâncias citotóxicas, como a perforina, que se insere na membrana lipídica formando poros que colapsam o potencial da membrana e, mais importante, permitindo a entrada de grânulos líticos da família das catepsinas, como a granzima B, que ativa a cascata de sinalização levando à apoptose mediada por caspases. Esse processo ajuda a reduzir a carga parasitária na pele e a controlar a disseminação da infecção, contribuindo para a resolução da doença. No entanto, alguns estudos indicam que também podem contribuir para lesões teciduais devido ao aumento da produção de Granzima B, TNF- α e IL-1 β , além da ativação do inflamossomo, resultando no agravamento da doença (Ruiz; Becker, 2007; de Freitas e Silva; Von Stebut, 2021) (Figura 5).

Figura 5- Esquemática dos aspectos da imunidade inata e adaptativa na infecção por *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de Freitas e Silva; Von Stebut, 2021.

2.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose cutânea pode ser desafiador, especialmente em áreas endêmicas, onde múltiplas espécies de *Leishmania* podem provocar lesões com aparência extremamente semelhantes, havendo ainda a complicação adicional da ocorrência de outras doenças de pele com sintomas clínicos semelhantes. Além dessa variedade de manifestações clínicas, as espécies de *Leishmania* variam em sensibilidade às terapias disponíveis, tornando a determinação de espécies crítica para o resultado clínico da leishmaniose. Ademais, a adoção de diagnósticos avançados geralmente representa um desafio devido às restrições de recursos. (Mouttaki *et al.*, 2014; Piyasiri *et al.*, 2023).

Atualmente, o diagnóstico da LC consiste em um arranjo que é composto por aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (Figura 6). Os métodos de diagnósticos laboratoriais da doença se dão através de exames parasitológicos diretos

(microscopia, histopatologia e cultura parasitária), diagnóstico molecular e/ou testes indiretos com sorologia (de Vries; Schallig, 2022; Melo *et al.*, 2020).

Os exames parasitológicos são bastante utilizados para o diagnóstico da doença por possuírem uma alta especificidade e se baseiam na visualização de formas amastigotas de *Leishmania* em tecidos infectados. Nesses exames a amostra é obtida por meio de biópsia, punção ou raspagem de mucosa ou lesões cutâneas e corada com Giemsa, seguindo para exame histopatológico, onde são identificadas amastigotas através de análise microscópica. Porém, por mais que esse método apresente técnicas altamente específicas para o diagnóstico de leishmaniose cutânea, elas são insuficientemente sensíveis (Piyasiri *et al.*, 2023; Reimão *et al.*, 2020).

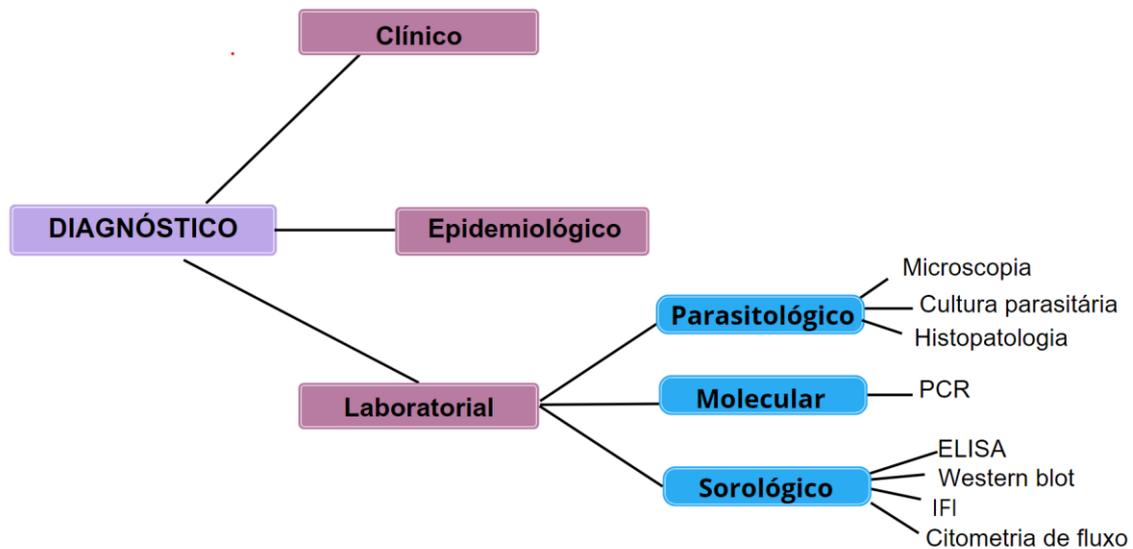
As técnicas moleculares também têm sido utilizadas para o diagnóstico da LC. O uso da PCR apresenta diversas vantagens sobre os métodos convencionais, possuindo alta sensibilidade, rapidez e sendo aplicável para a identificação de espécies/cepas em diferentes amostras clínicas. Porém, as exigências técnicas, o custo relativamente alto e a persistência do parasita na lesão após o tratamento dificultaram sua aplicabilidade rotineira, havendo uma necessidade urgente de padronização, otimização e simplificação das aplicações do método para serem usadas principalmente em áreas endêmicas (Dixit; Singh; Salotra, 2020; Sarkari *et al.*, 2014; Mesa *et al.*, 2020).

Os testes sorológicos são métodos indiretos utilizados no diagnóstico da leishmaniose cutânea, visando detectar a presença de anticorpos específicos no soro sanguíneo do paciente, os quais são produzidos como resposta à infecção pelo parasita. Dentre os tipos de testes sorológicos mais comuns estão o ELISA (Ensaio Imunoabsorção Enzimática), Western blot e os testes de imunofluorescência indireta (IFI). O princípio básico desses testes é o uso de antígenos da *Leishmania* spp. para reagir com os anticorpos presentes no soro do paciente. Quando há anticorpos contra o parasita, estes se ligam aos antígenos, formando complexos que podem ser detectados. A citometria de fluxo também é uma abordagem a ser considerada para o diagnóstico da LC. Essa metodologia permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão, onde sua tecnologia é aplicada a LC, permitindo a análise quantitativa de anticorpos anti-*Leishmania* (Ashrafmansouri *et al.*, 2015; Lévêque *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2016)

Porém, é importante salientar que não há um único teste que possa ser considerado o padrão ouro para o diagnóstico da LC devido às limitações individuais

de cada método relacionadas à sua sensibilidade e/ou especificidade. Em vez disso, o diagnóstico ideal muitas vezes envolve a combinação de múltiplas abordagens para obter uma avaliação abrangente e precisa da infecção (Chávez-Fumagalli *et al.*, 2015).

Figura 6- Esquemática do diagnóstico da leishmaniose cutânea.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

2.2.4 Tratamento

Atualmente faltam medicamentos eficazes, acessíveis e fáceis de usar para o tratamento da leishmaniose, não existindo meios reconhecidos e confiáveis de quimioprofilaxia ou vacinação contra infecções por suas diferentes formas. Os medicamentos utilizados no tratamento da doença estão associados a uma série de deficiências tais como toxicidade, baixa eficácia, efeitos colaterais, resistência, alto custo e necessidade de administração prolongada (Nieva *et al.*, 2021; Tiwari *et al.*, 2019).

O antimoniato de meglumina Sb(V), comercialmente chamado de Glucantime®, está disponível no Brasil desde a década de 1940 e continua sendo o principal medicamento utilizado e recomendando pelo Ministério da Saúde brasileiro para uso no tratamento de primeira ou segunda linha contra todas as formas de LC. O mecanismo de ação deste medicamento atua interferindo no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando à uma depleção dos níveis de ATP

intracelular (Carvalho *et al.*, 2019; Moreira *et al.*, 2017). Esse medicamento apresenta como efeitos adversos como cardiotoxicidade, aumento no teste de função hepática, ureia e creatinina, anorexia, náusea, vômito, mialgia e artralgia. O Sb III, presente como resíduo ou gerado pela redução de Sb V, é a forma responsável pelos efeitos colaterais e ação antileishmania. (Fabrino *et al.*, 2021; Garza-Tovar *et al.*, 2020). A injeção intramuscular de antimoniato de meglumina de 10-20 mg/kg/dia de antimônio é usada para tratar as formas mais graves da LC. Entretanto, a administração intralesional é cada vez mais reconhecida como uma alternativa viável à terapia sistêmica para casos não complicados de leishmaniose cutânea. Este método envolve a injeção do medicamento diretamente na lesão, o que demonstrou ser eficaz com menos efeitos colaterais sistêmicos. Todavia, apesar de ter menos efeitos adversos, a administração intralesional pode causar dor e edema locais (Arboleda *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2016).

Devido a necessidade do interrompimento do tratamento com o medicamento de primeira escolha, outras drogas de segunda escolha também são usadas no tratamento da doença, sendo elas a anfotericina B e a pentamidina, que são igualmente tóxicas e administradas sistemicamente (Carvalho *et al.*, 2019; Garza-Tovar *et al.*, 2020). A anfotericina B (AmB) é uma molécula antifúngica polieno macrocíclica gerada por *Streptomyces nodosus*, onde a administração generalizada do agente foi evitada devido à sua toxicidade renal e sistêmica, ao preço e aos obstáculos ao uso intravenoso em regiões endêmicas de leishmaniose. Dessa forma, a introdução de produtos de anfotericina B associados a lipídios, chamada de anfotericina B lipossomal (AmBisome) com menor toxicidade renal permitiu um uso mais difundido (Frézard *et al.*, 2022; Shirzadi, 2019;). Esse fármaco exerce sua atividade leishmanicida através de uma interação de alta afinidade com o ergosterol, o principal componente da membrana dos parasitas, e sua ligação induz a formação de canais de membrana que aumentam a permeabilidade a íons e pequenas moléculas, levando à morte do parasita (Abu *et al.*, 2019). Porém, a toxicidade renal ainda é uma preocupação significativa para esse tratamento, com estudos indicando que cerca de 45% dos pacientes podem apresentar insuficiência renal leve (Wortmann *et al.*, 2010). Além disso, o alto custo da anfotericina B lipossomal representa uma barreira significativa para muitos sistemas de saúde, especialmente em países mais pobres. Embora seja um medicamento eficaz, seu uso é limitado devido ao seu preço elevado e à necessidade de hospitalização do paciente durante a administração.

Esses fatores restringem a disponibilidade e a acessibilidade do medicamento, o que é crítico, considerando a crescente incidência de LC em regiões endêmicas (López *et al.*, 2018).

Já a pentamidina é um derivado sintético da amidina e é eficaz contra muitos protozoários patogênicos, incluindo espécies de *Leishmania*. Esse medicamento atua inibindo a topoisomerase II mitocondrial, a síntese de poliamina, o transporte de cálcio, o transporte de lisina-arginina e, eventualmente, impede o sistema de transporte ativo e o potencial da membrana mitocondrial causando a morte do parasita (Madusanka; Silva; Karunaweera, 2022; Neves *et al.* 2011). Embora a pentamidina seja uma alternativa de tratamento para a leishmaniose cutânea, seu uso é dificultado pela variabilidade na eficácia entre as diferentes espécies da *Leishmania*, desafios relacionados a sua administração e aos efeitos colaterais notáveis (Couto *et al.*, 2014; Madusanka *et al.*, 2022).

Ademais, há também o uso de drogas orais, como a miltefosina que vêm sendo difundida nos últimos anos. Essa droga induz a morte da *Leishmania* com condensação e fragmentação do DNA em padrão escada, apresentando assim um mecanismo de eliminação do parasita por apoptose (Vercosa, 2015). Desde sua introdução no SUS em 2018, a miltefosina surgiu com a finalidade de melhorar a adesão ao tratamento, especialmente em áreas rurais onde o acesso a unidades de saúde para tratamentos injetáveis é limitado (Teixeira *et al.*, 2023).

Além dos tratamentos feitos com o uso de medicamentos, há também o surgimento de novas modalidades, como as termoterapias e crioterapias, que vêm se mostrando eficazes para a leishmaniose cutânea. A termoterapia é baseada na aplicação calor nas lesões e é particularmente eficaz para lesões localizadas. Não apresenta efeitos sistêmicos, porém apresenta efeitos colaterais mínimos, como coceira e sensação de queimação (Cardona-Arias; Vélez; Lopez-Carvajal, 2025; Gonçalves *et al.*, 2018). A crioterapia envolve a aplicação de frio extremo, tipicamente usando nitrogênio líquido, às lesões causadas pela leishmaniose cutânea. Já é relatado na literatura que a eficácia da crioterapia é comparável à dos antimoniais pentavalentes, o tratamento tradicional de primeira linha, mas com um risco muito menor de toxicidade (Linqest *et al.*, 2023).

No entanto, ainda não há um tratamento totalmente eficiente para a leishmaniose cutânea e, por mais que novos medicamentos estejam sendo propostos ao longo dos anos, os resultados ainda são insatisfatórios (Garza-Tovar *et al.*, 2020).

Considerando as deficiências evidenciadas no tratamento atualmente disponível, é crucial buscar novas moléculas com ação leishmanicida eficaz, baixa toxicidade e custo acessível para combater essa doença.

2.3 Piridinas tiazóis

Com o aumento da resistência dos medicamentos atuais, a necessidade do tratamento a longo prazo e os problemas de toxicidade, fica evidente a necessidade de investigar novas alternativas terapêuticas anti-*Leishmania* (Dinc, 2022). Nos últimos anos, muitos compostos com propriedades leishmanicidas foram relatados na literatura e, além disso, vários alvos potenciais para medicamentos foram propostos e validados. Dentre esses compostos, as tiosemicarbazonas são promissoras, onde através da ciclização da tiosemicarbazona em tiazol e a condensação do anel piridina com esta nova molécula mostrou atividade anti-*Leishmania* (Martin-Montes *et al.*, 2017).

Além disso, o tiazol é relatado na literatura como uma importante classe de compostos heterocíclicos que exibem um amplo espectro de atividade biológica, como antitumoral, antibacteriana, anti-inflamatória e atividades leishmanicidas. O núcleo piridina também se destaca, uma vez que representa o esqueleto principal em inúmeras substâncias farmacológicas naturais e sintéticas de interesse significativo. As piridinas são uma importante classe de compostos heterocíclicos porque ocorrem em muitos compostos naturais que possuem atividade biológica, como vitamina B3 (niacina) e vitamina B6 (piridoxina) e alcalóides naturais (Alqahtani; Bayazeed, 2021; de Oliveira *et al.*, 2020; Khidre; Radini, 2021).

Os compostos contendo porções tiazol e piridina têm sido utilizados na concepção de novos ligantes para terapêutica. As piridinas tiazóis vêm sendo relatadas como compostos que se apresentam como promissores nos estudos de novas drogas para tratamento das leishmanioses em testes *in vitro* através de culturas 2D (Bera, 2022; Silva, 2021). Todavia, ainda não há relatos na literatura sobre a avaliação desses compostos em culturas de células 3D para estudos na leishmaniose cutânea.

2.4 Cultura de células

A cultura celular está relacionada a um complexo de processos de isolamento celular do seu ambiente natural (*in vivo*) e subsequente crescimento numa condição ambiental artificial controlada (*in vitro*). Essa técnica teve seu início no século XX e vem sendo utilizada por anos, trazendo grandes achados em diversas áreas (Zhao, 2023).

As células em cultura podem se desenvolver formando uma monocamada celular sobre uma superfície (células aderentes) ou crescer em suspensão (células não aderentes). Além disso, elas podem ser de linhagens primárias ou contínuas. As células de linhagens primárias são derivadas de um fragmento de tecido obtidas diretamente de um organismo e transferidas imediatamente para um ambiente de cultura celular. Embora tenham um período limitado em cultura, essas culturas podem exibir comportamento fisiológico semelhante ao observado *in vivo*. Existem também células de linhagens contínuas com alta capacidade proliferativa, capazes de serem mantidas em cultura por longos períodos e preservando em grande parte as características do tecido original. Para garantir a adaptação das células em um ambiente artificial, é fundamental tentar reproduzir as condições em que estariam no organismo de origem, fornecendo-lhes nutrientes ou outros materiais necessários (Bilodeau, 2024; Alves, 2010; Sandle *et al.*, 2021).

As culturas celulares provaram ser uma técnica essencial para explorar os mecanismos biofísicos e biomoleculares que governam a agregação celular em tecidos e órgãos, além de compreender o funcionamento desses tecidos e as alterações associadas a doenças. Esse método contribui para o entendimento do comportamento celular em condições *in vivo*, abrangendo processos como diferenciação, migração, crescimento e propriedades mecânicas das células, todos modulados por seu microambiente bioquímico e biomecânico (Sandle, 2021; Zhao, 2023).

Dessa forma, a cultura celular fornece diversas contribuições, apresentando sistemas apropriados para estudar a fisiologia e bioquímica padrão das células; os efeitos de drogas e compostos tóxicos nas células, mutagênese e carcinogênese; na triagem e desenvolvimento de medicamentos. Ademais, também permitem resultados consistentes e reproduzíveis (Antoni *et al.*, 2015).

2.4.1 Cultura 2D x cultura 3D

As culturas 2D, ou seja, culturas em monocamadas cultivadas em superfícies planas, são baseadas no cultivo de um único tipo celular ou mais (cocultura). É uma técnica simples e facilmente executável, que gera uma quantidade substancial de resultados, o que é vantajoso para fins específicos de pesquisa. Nas culturas 2D, as células aderem a uma superfície plana, como o fundo de um recipiente de plástico, enquanto estão expostas a um meio líquido (Figura 7A) (Duval *et al.*, 2017).

Dessa forma, essas condições de cultivo diferem substancialmente do ambiente *in vivo*, onde a maioria dos tecidos no corpo humano é tridimensional (3D). Nos últimos anos, tornou-se evidente que os modelos convencionais de cultivo celular em duas dimensões (2D), usados para pesquisa básica, avaliação de citotoxicidade e triagem de drogas, apresentam limitações significativas (Abbas *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2021). Essas limitações incluem a falta da sinalização célula-contatos célula e célula-matriz extracelular (MEC), onde tais características limitam a representação fidedigna do que é observado no ambiente natural, refletindo na exclusão sinais físicos responsáveis por vários processos celulares, como a mitose e diferenciação, por exemplo. Ademais, apresentam alterações na forma celular, comprometimento das funções celulares e respostas celulares que não refletem com precisão o comportamento observado *in vivo* (Juarez-Moreno *et al.*, 2022; Moysidou; Barberio; Owens, 2021; Zhao, 2023).

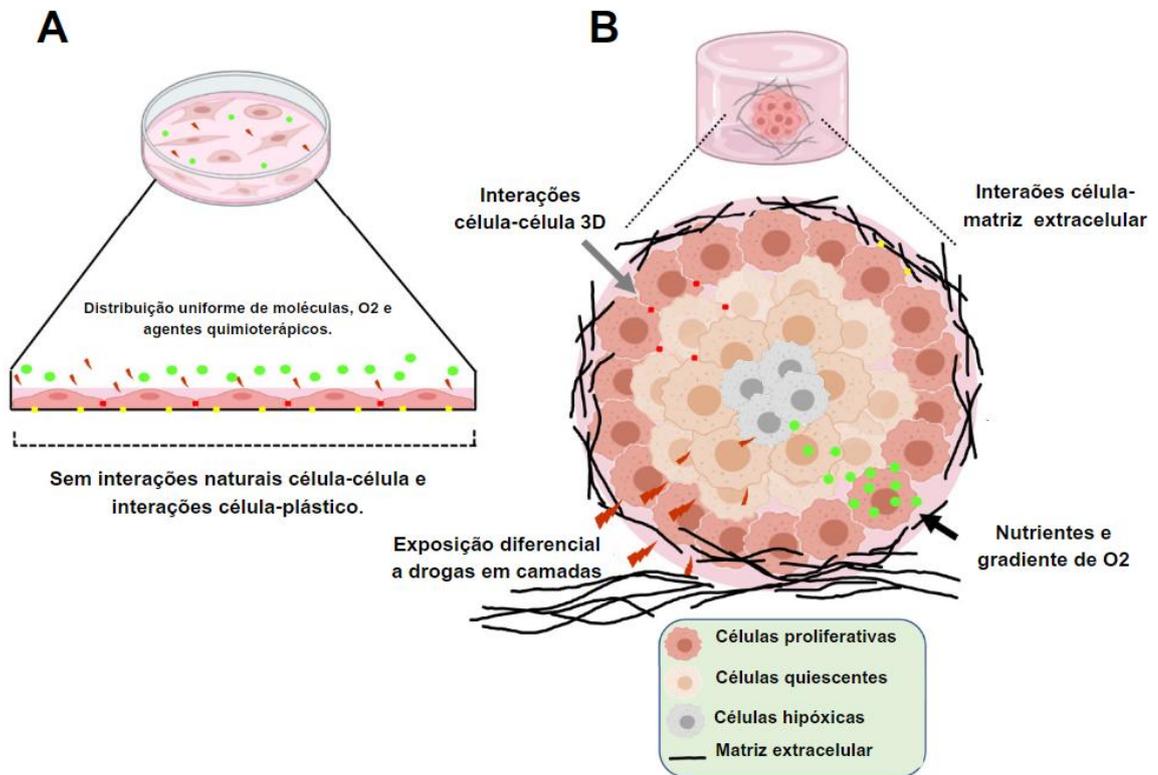
Para superar essas limitações, as plataformas de cultura celular 3D surgem como uma estratégia para imitar melhor as condições *in vivo* (El Feky *et al.*, 2021). As culturas 3D têm crescido e evoluído nos últimos anos, envolvendo a formação de um microambiente ideal para o crescimento celular, diferenciação e função. Isso inclui a reprodução fiel das interações intercelulares e das interações com a matriz extracelular, assim como os parâmetros biológicos, físico-químicos e mecânicos observados *in vivo*. Essas culturas 3D têm demonstrado melhorias em estudos focados na morfologia, monitoramento do número celular, proliferação, resposta a estímulos, diferenciação, metabolismo de fármacos e síntese de proteínas (Habanjar *et al.*, 2021; Jensen; Teng, 2020).

Muitos estudos comparativos foram realizados ao longo dos anos entre os dois tipos de cultura celular, demonstrando que as células cultivadas em 3D apresentam diferenças significativas em sinalização celular e respostas a medicamentos em

comparação com as células cultivadas em 2D. Isso ocorre porque a organização celular específica no microambiente 3D reproduz de forma mais fiel as características observadas *in vivo* (Foglietta *et al.*, 2020). Além disso, estudos mostram que as células cultivadas em 3D apresentam maior heterogeneidade, com gradientes de oxigênio, nutrientes e metabólitos. Isso resulta em uma variação mais ampla nas respostas às drogas, refletindo melhor as condições *in vivo* e ampliando seu potencial na identificação de novos biomarcadores e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas. As culturas 3D apresentam maior resistência aos medicamentos, semelhante ao que ocorre *in vivo* e se deve em grande parte ao fato de as células estarem em diferentes estágios de crescimento, incluindo proliferação, hipóxia, apoptose, necrose e fase quiescente (Figura 7B). (Fontoura *et al.*, 2020 ; Park; Park; Suh *et al.*, 2024 ; Salinas-Vera *et al.*, 2022; Urzi *et al.*, 2023).

De maneira geral, as culturas 2D têm mais área de superfície em contato com o plástico e o meio de cultura do que com outras células, o que as direciona para uma polarização que não reflete as condições fisiológicas. Por outro lado, os modelos 3D oferecem várias vantagens, incluindo: perfil de crescimento celular; heterogeneidade celular; interação e sinalização célula-célula; interação célula-matriz extracelular; perfil de expressão gênica; estrutura interna formada por diferentes camadas; e perfil de resistência a medicamentos (Barbosa *et al.*, 2021; Nath; Devi 2016; Fontoura, 2020). Sendo assim, a transição das culturas 2D para as 3D representa um avanço nas pesquisas científicas, uma vez que os modelos tridimensionais são fisiologicamente mais relevantes e garantem resultados mais realistas, possibilitando modelar uma célula *in vivo* enquanto ela é cultivada *in vitro* (Cacciamali; Villa; Dotti, 2022).

Figura 7- Modelos de cultura 2D vs 3D: A–Comportamento celular em cultura de células convencionais 2D; B– Comportamento celular em cultura de células 3D.



Fonte: Adaptado de Salinas-Vera *et al.*, 2022.

2.4.2 Sistemas de cultura celular 3D

Os modelos de cultura de células 3D são os que mais se aproximam do que acontece *in vivo*, pois esses modelos induzem as células a se comportarem da maneira mais semelhante com o que acontece nas condições naturais (Caleffi *et al.*, 2021).

Os modelos 3D geralmente são construídos a partir de três abordagens: com andaimes, sem andaimes e híbridos. Nos modelos com andaimes, as células interagem com um substrato, enquanto nos modelos sem andaimes, as células não se fixam a uma superfície, promovendo a formação de agregados. Já os modelos híbridos combinam características das duas abordagens anteriores, incluindo matrizes sintéticas e suportes físicos externos, proporcionando interações mais complexas entre as células e a matriz extracelular (Figura 8) (Fontoura *et al.*, 2020).

Nos sistemas baseados em andaimes, destaca-se o modelo de scaffolds, onde é utilizada uma matriz tridimensional para facilitar o crescimento, adesão, proliferação e diferenciação das células. Esses scaffolds podem ser feitos de materiais naturais ou sintéticos, como por exemplo colágeno, fibrinas, matrizes extracelulares derivadas de tecido, polímeros e outros materiais, onde ambos apresentam vantagens e desvantagens (Figura 8) (Reddy *et al.*, 2021). Em paralelo, os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais insolúveis que contêm grandes quantidades de água e têm uma grande variedade de aplicações. No contexto da cultura celular, formam um ambiente altamente hidratado, são fáceis de manusear, possuem propriedades mecânicas e físico-químicas ajustáveis e formam arquiteturas 3D reais para contatos célula-célula que podem se assemelhar à matriz extracelular (Figura 8) (Bodenberger *et al.*, 2016).

A técnica de bioimpressão também é um sistema baseado em andaimes que apresenta uma tecnologia avançada de biofabricação que permite a criação de estruturas complexas (Figura 8). Nessa técnica as células são impressas em uma matriz tridimensional usando uma impressora 3D. Essa técnica permite o controle preciso da posição espacial de biomateriais, fatores de crescimento e células vivas, com o objetivo final de produzir estruturas complexas, como a criação de tecidos e órgãos funcionais. Pode ser empregada para o desenvolvimento de modelos para testes de medicamentos e terapias. Além disso, a bioimpressão 3D automatizada já é reconhecida na literatura como uma técnica potencial de escolha para combinar a replicação de microambientes complexos com alto nível de padronização, reprodutibilidade e capacidade de triagem (Barbosa *et al.*, 2021; Cacciamali; Villa; Dotti, 2022; Jian *et al.*, 2018).

Nos sistemas de cultura 3D livres de andaimes, os organoides visam a construção de tecido *in vitro* multicelular que imitam seu órgão *in vivo* correspondente, de modo que possa ser usado para estudar aspectos desse órgão na placa de cultura de tecidos. Eles são produzidos a partir de células-tronco (pluripotentes, fetais ou adultas) e que mimetizam a complexidade funcional, estrutural e biológica chave de um órgão (Figura 8) (De Souza, 2018; Zhao *et al.*, 2022). Os organoides de pele podem ser usados para investigar funções fisiológicas, como sensação nervosa cutânea e interações microbioma-pele, bem como para pesquisa exploratória em modelos de

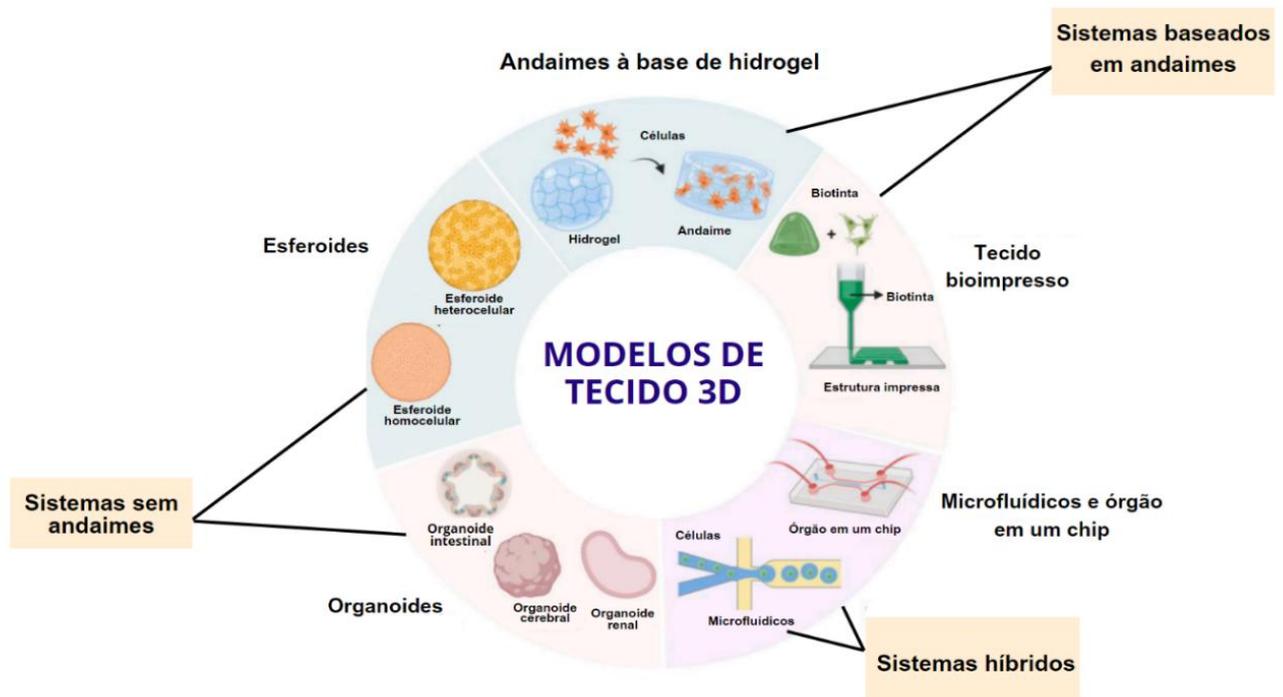
coinfecções virais-bacterianas cutâneas, testes de maquiagem e triagem de drogas de alto rendimento (Sun; Zhang; Li, 2021).

Esferoides também são modelos formados sem a utilização de andaimes que são bastante utilizados e que possuem esse nome devido à sua aparência com a forma esférica (Figura 8). Os esferoides imitam as características arquitetônicas e funcionalidades de tecido nativo e possuem vantagens distintas sobre as monocamadas celulares ou o encapsulamento celular em hidrogéis 3D naturais e sintéticos, incluindo interações diretas célula-célula e altas densidades celulares, que imitam melhor aspectos de muitos tecidos. (Achilli; Meyer; Morgan, 2012; Di Caprio; Burdick, 2023).

Nos sistemas híbridos, os órgãos-em-chip é um dispositivo microfluídico no qual as células são semeadas e perfundidas em uma matriz semelhante a um chip (Figura 8). Essas plataformas são especificamente projetadas para cultura de células e tecidos sob perfusão contínua, garantindo um fornecimento consistente de oxigênio e nutrientes, enquanto eliminam efetivamente os resíduos. Esse modelo pode auxiliar na compreensão das interações entre o hospedeiro e o patógeno, realizar análises dos processos de infecção, avaliar a interação entre diferentes tipos de células, bem como entre vários órgãos, e resumir alguns dos aspectos fisiopatológicos da doença (de Dios-Figueroa *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2024).

No entanto, não há um modelo em 3D que atualmente satisfaça todos os requisitos para fornecer um ambiente propício ao crescimento, diferenciação e funcionamento celular e os pesquisadores devem selecionar o método apropriado de acordo com suas necessidades (Afewerki *et al.*, 2019; Knight; Przyborski, 2015).

Figura 8-Tipos de biofabricação para a construção de modelos de tecidos 3D.



Fonte: Adaptado de Xie *et al.*, 2023.

2.4.3 Esferoides

Os esferoides são agregados celulares, automontados em um ambiente que impede a fixação a uma superfície plana. Nessa técnica é aproveitada a tendência natural de agregar exibida por muitos tipos de células, para criar massas celulares de maneira consistente em formato de esfera. Em culturas de esferoides, as células secretam a matriz extracelular (MEC) na qual residem e podem interagir com células de seu microambiente original, preservando assim as interações célula-célula e o fenótipo específico do tecido (El Harane *et al.*, 2023; Henrique *et al.*, 2022).

Existem diversas formas com metodologias de elaboração diferentes onde os esferoides podem ser construídos. As técnicas de gota suspensa, levitação magnética, cultura rotativa, com placas de baixo adesão e as baseadas em andaimes são as que mais se destacam (Figura 9). A escolha de qual método utilizar para a construção desses esferoides vai depender de vários fatores, incluindo os objetivos do estudo, os tipos de células envolvidas, a aplicação pretendida dos esferoides e a disponibilidade de recursos (Białkowska *et al.*, 2020).

A técnica de gota suspensa é uma das mais utilizadas devido à sua

simplicidade e baixo custo. Nessa metodologia, as células são depositadas por gravidade no fundo das gotículas suspensas, formando gradualmente um esferoide. Isso é realizado ao adicionar uma pequena gota de suspensão celular na tampa da microplaca e então invertê-la, permitindo que as células se acumulem no fundo da gota devido à gravidade. Porém, a formação de múltiplos esferoides em um espaço restrito apresenta desafios, pois há risco de coalescência de gotículas, especialmente durante o manuseio (Figura 9B) (Decarli *et al.*, 2021; Shao *et al.*, 2020; Guimaraes *et al.*, 2024).

A técnica de cultura rotativa refere-se à técnica em que a suspensão celular em recipientes de biorreatores de frasco giratório é continuamente misturada por agitação. Nesse modelo, as condições do fluido e da massa nos recipientes são afetadas pela força convectiva da barra de agitação, que é crucial para formar o esferoide (Figura 9D) (Liu; Chen; Naing, 2021).

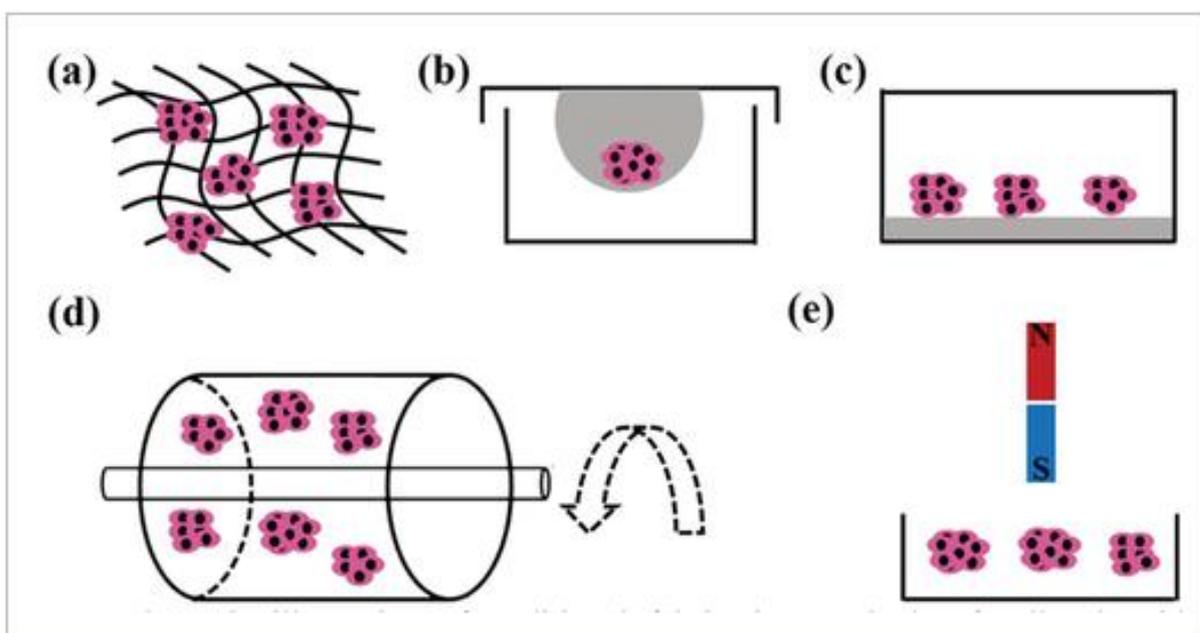
O método utilizando placas de baixa adesão baseia-se na utilização de placas de cultura celular revestidas com biomateriais adesivos não celulares para inibir a ligação de células ou esferoides e facilitar a interação célula-célula para a formação de esferoides (Costa *et al.*, 2018) (Figura 9C). Há também a possibilidade da elaboração dos esferoides com a utilização de andaimes. Essa técnica permite um suporte físico através de microestruturas fabricadas para automontagem de células, sendo úteis no controle do tamanho dos esferoides, no entanto, permanecem as dificuldades na coleta e separação eficazes de esferoides dos andaimes (Figura 8A) (Gong *et al.*, 2015).

Todos esses métodos citados têm em comum levar tempo relativamente longo para os esferoides formarem aglomerados densos e que muitas vezes não apresentam uma formação tão satisfatória. Para acelerar e melhorar esse processo, as nanopartículas magnéticas entraram em foco. A nanotecnologia tem se mostrado capaz de beneficiar a engenharia de tecidos devido à sua capacidade de controlar interações em níveis subcelulares que não são possíveis usando técnicas comuns de engenharia de tecidos (Kappes *et al.*, 2022; Mattix *et al.*, 2014).

No método de suspensão magnética, as células são carregadas com íons e um campo magnético é aplicado, seja por baixo ou por cima das células, para acelerar sua sedimentação ou para levitá-las. Ou seja, nessa metodologia as células são incorporadas com partículas magnéticas e levantadas pela força magnética. As

células carregadas podem então levitar sobre qualquer substrato rígido usando excitadores magnéticos de neodímio. Ademais, esse sistema de levitação magnética demonstrou ser não tóxico, não interferindo na proliferação celular nem induzindo resposta inflamatória em culturas de células. (Figura 9E) (Caleffi *et al.*, 2021; Gaitán-Salvatella *et al.*, 2021).

Figura 9- Métodos de formação dos esferoides celulares. a) Baseados em andaime; b) Gota suspensa; c) Superfície não aderente; d) Cultura rotativa; e) Levitação magnética.



Fonte: Shao *et al.*, 2020.

Alguns estudos com esferoides vêm sendo usados na descoberta de fármacos para diversas patologias, como para avaliar a resistência e a sensibilidade a drogas e geralmente mostram mais resistência à quimioterapia e à radioterapia quando comparados com culturas de monocamada 2D. Além disso, esses esferoides provaram ser úteis em muitas áreas da biologia, incluindo estudos de diferenciação, proliferação celular, expressão de genes e proteínas, apoptose e farmacologia, auxiliando no desenvolvimento de novas drogas (Jensen; Teng, 2020; Verjans *et al.*, 2020).

Esse modelo também já se mostrou eficaz para o estudo da interação parasita-hospedeiro, uma vez que consegue simular o que acontece *in vivo* durante a infecção. Uma aplicação notável envolve o parasita protozoário *Trypanosoma cruzi*, que causa a doença de Chagas. Pesquisas demonstraram que esferoides feitos com

células HeLa conseguem modelar efetivamente a transmigração de tripomastigotas de *T. cruzi*, permitindo o estudo de sua dinâmica de invasão e interações com células hospedeiras (Rodríguez *et al.*, 2020). Dessa forma, através do modelo se torna possível elucidar questões relacionadas à citotoxicidade e danos à célula causada pelo parasita, auxiliar no entendimento sobre como as células reagem e são capazes de provocar a resposta imune e na compreensão da patogênese de diversas doenças (Chua *et al.*, 2019; Ribeiro; Santos; Benchimol, 2015; Rodrigues *et al.*, 2020). Porém, ainda não há estudos utilizando esferoides para a leishmaniose cutânea.

2.5 Métodos de estudos em pesquisas com pele *in vitro*

A pele desempenha um papel crucial como uma das primeiras linhas de defesa do organismo, controlando a regulação de água, nutrientes, íons e interações ambientais, além de fornecer proteção contra patógenos. Composta por três camadas estruturais - epiderme, derme e hipoderme - e uma variedade de células que influenciam sua resposta imune, a pele é um órgão complexo e diversificado. No entanto, apesar desses mecanismos de defesa, a pele está continuamente sujeita ao ataque de patógenos como a *Leishmania*, que podem resultar em infecções cutâneas (Chau *et al.*, 2013; Bergers *et al.*, 2016; Niehues *et al.*, 2018; Pupovac *et al.*, 2018).

Durante o processo de pesquisa, os modelos animais são amplamente empregados, especialmente em estágios pré-clínicos. Apesar de compartilharem muitas funções anatômicas, fisiológicas e imunológicas com os seres humanos, há notáveis diferenças entre a pele de humanos e camundongos. A pele humana, por exemplo, é mais espessa e possui menos folículos capilares (Gerber *et al.*, 2014). Quando examinamos a resposta imunológica, observamos diversas disparidades, como a presença e localização de diferentes subpopulações de células T, a expressão de quimiocinas e a presença ou ausência de peptídeos antimicrobianos. Essas diferenças podem comprometer a tradução dos resultados obtidos em modelos animais para a compreensão e tratamento de doenças humanas, potencialmente resultando em falhas nos ensaios clínicos (Bergers *et al.*, 2016; Pupovac *et al.*, 2018).

Um vasto conhecimento também foi adquirido pelo uso de culturas de explantes *ex vivo*, que apresentam todas as células, organelas e componentes de matriz importantes, mas geralmente não são viáveis para testes padrão devido à variabilidade dos doadores e à disponibilidade limitada (Mathes; Ruffner; Graf-Hausner, 2014).

Existe um amplo espectro de modelos *in vitro* da pele humana, que diferem em sua complexidade biológica dependendo do estudo científico individual e/ou demandas técnicas. Essas estruturas teciduais reconstruídas *in vitro* evoluíram a partir de culturas simples de monocamadas celulares bidimensionais de um tipo de célula e culturas 3D monotípicas até culturas 3D organotípicas compostas por diferentes tipos de células co-cultivadas (Planz; Lehr; Windbergs, 2016).

Além disso, avanços na tecnologia de cultivo de tecidos possibilitaram a criação de equivalentes de pele humana que reproduzem tanto a epiderme quanto a derme (a pele completa) *in vitro*. Equivalentes de pele, disponíveis comercialmente, são empregados na avaliação da segurança de cosméticos e na triagem de toxicidade de diversos compostos farmacêuticos (Pellevoisin; Bouez; Cotovio, 2018; Ma; Wang; Wang, 2021). Recentemente, essa tecnologia de cultivo de tecidos tem sido utilizada para desenvolver modelos *in vitro* de doenças cutâneas, como psoríase, dermatite atópica e câncer de pele. Esse avanço tem como objetivo principal a pesquisa de medicamentos dermatológicos, permitindo evitar o uso de animais em experimentações. Estes produtos comerciais incluem uma gama de opções, como o Apligraf®, BioSeed®, Epicel®, Dermagraft®, Laserskin®, MySkin®, Orcel®, e TransCyte® (Stanton *et al.*, 2022; Semlin *et al.* 2011; Oualla-Bachiri *et al.*, 2020; Vig *et al.* 2017).

No entanto, é importante salientar que esses modelos de pele disponíveis comercialmente geralmente consistem em sistemas de uma ou duas bicamadas, havendo a ausência de células imunes na maioria dos modelos. Essa estrutura limitada pode restringir sua capacidade de fornecer insights abrangentes sobre as complexas interações entre diferentes camadas da pele, bem como as interações entre a pele e os patógenos (Bolle *et al.*, 2020).

A pele humana real, por sua vez, é notavelmente mais complexa, contendo uma variedade de tipos celulares, incluindo células imunológicas, que esses modelos não conseguem replicar completamente (Davison-Kotler *et al.*, 2018; Niehues *et al.*, 2018; Vidal *et al.*, 2019; Zhang; Michniak-Kohn, 2012). Assim, ainda há uma necessidade contínua de desenvolver modelos mais sofisticados que possam capturar com maior precisão a complexidade da pele humana e suas interações dinâmicas com o ambiente externo.

3 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose cutânea (LC) é um grave problema de saúde pública no mundo e no Brasil com grande impacto no Estado de Pernambuco (Cavalcante *et al.*, 2022). A *Leishmania* spp. é o agente etiológico da leishmaniose, sendo um parasito intracelular obrigatório. Esta parasitose se caracteriza pelo surgimento de lesões cutâneas, após inoculação do parasito na pele do indivíduo. As lesões podem variar de uma única a centenas, dependendo da resposta imune na pele e a espécie do parasita envolvida na infecção, sendo a maioria das lesões de aparência nódulos-crostosa ulcerativa (Abadías-Granado *et al.*, 2021). Atualmente, ainda não há uma vacina para prevenir a leishmaniose cutânea e as drogas utilizadas para o tratamento da doença são bastante tóxicas e apresentam efeitos adversos (Dinc, 2022).

Na LC tem se demonstrado a associação entre a resposta imunológica desenvolvida pelo paciente e o curso da infecção. Alguns pacientes que se recuperam da doença podem apresentar uma imunidade duradoura e proteção contra reinfecções, mas ainda não se conhece qual o tipo de imunidade necessária para controlar a doença (Scott; Novais, 2016). Estudos com biópsia da lesão são importantes para que se tenha entendimento da resposta imune *in situ* na pele. Contudo, uma série de fatores limitam esse tipo de estudo, uma vez que é um procedimento invasivo para o paciente já debilitado, requer um dermatologista especializado para realizar e a lesão deve estar sem quadro de infecção secundária.

No intuito de mitigar este problema, pode-se lançar mão de modelos equivalentes dérmicos para estudo da pele. A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a cerca de 15% do peso total de um indivíduo. Esta apresenta uma estrutura complexa no que diz respeito a sua formação, além de controlar a temperatura corporal, síntese de vitamina D, barreira contra a penetração de microrganismos e patógenos, e proteção de órgãos internos (Jiao *et al.*, 2024; Joshi *et al.*, 2023).

Os modelos de pele 3D assemelham-se melhor à arquitetura natural e às funções da pele e devem ser considerados como padrão-ouro ao realizar estudos *in vitro* sobre a pele humana (Niehues *et al.*, 2018). Substratos bidimensionais são consideravelmente limitados na emulação destes microambientes 3D complexos, devido à falta de arquitetura estrutural e não reflete o comportamento fisiológico das células em tecidos reais. Além disso, habitar um substrato rígido 2D requer uma

adaptação dramática pelas células sobreviventes devido à falta do ambiente da matriz extracelular única de cada tipo de célula (Habanjar *et al.*, 2021; Moysidou; Barberio; Owens, 2021). Novas tecnologias em química de materiais, ferramentas de fabricação, processamento e compreensão de biologia, levaram à criação de matrizes de células 3D que representam melhor a geometria de um microambiente e microarquitetura semelhantes ao *in vivo*, apresentando mais relevância biológica e fisiológica, com várias interações célula-célula e célula-matriz extracelular e o acesso diferente a nutrientes e oxigênio, como ocorre em tecidos humanos (Marques *et al.*, 2022).

Atualmente, há diversas técnicas para a elaboração de modelos de pele em 3D, uma delas sendo os esferoides magnéticos. Esta técnica consiste na adição de nanopartículas magnéticas na cultura celular, sendo estas incorporadas nas células, sem haver alteração em sua função metabólica. Em seguida, as células que incorporaram as nanopartículas são cultivadas em placas de cultura com baixa adesão celular, podendo ser feita a manipulação delas através da adição de campos magnéticos. Isso leva a uma agregação celular com a formação do esferoide. Essa técnica permite que haja uma flutuação dessas células em direção à interface ar-líquida podendo ser utilizada para diversos tipos de células (Gaitán-Salvatella *et al.*, 2021; Labusca *et al.*, 2021; Tepe; Aslanbay Guler; Imamoglu, 2023).

A cultura 3D leva a sistemas celulares mais complexos, permitindo que múltiplas linhas celulares sejam co-cultivadas, o que tem provado ser uma excelente alternativa para, ou um complemento a modelos animais experimentais. Ao considerar patógenos, os estudos com *Dichelobacter nodosus*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*, *Candida albicans*, *Herpes simplex*, ácaros da sarna, *Acanthamoeba*, *Strongyloides ratti* e *Schistosoma mansoni* demonstraram o potencial de equivalentes de pele para se estudar a biologia da infecção (Havliova *et al.*, 2020; Kitisin *et al.*, 2020; Maboni *et al.*, 2017; Morgan; Arlian, 2010; Popov *et al.*, 2014; Walochnik *et al.*, 2009).

No entanto, não há relatos sobre a aplicação de esferoides imunocompetentes investigando a interação parasita-hospedeiro na leishmaniose cutânea ou em testes de novos compostos. Dessa forma, o estabelecimento de um modelo de esferoide dérmico imunocompetente devidamente testado e validado poderá contribuir para

uma melhor compreensão das interações *Leishmania*-hospedeiro avançando nosso conhecimento sobre elementos-chave no ciclo de vida do parasita e na patogênese da doença, melhorando assim a criação de estratégias para o seu tratamento.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver e testar um modelo de esferoide dérmico imunocompetente para estudos na leishmaniose cutânea.

4.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer um modelo de esferoide dérmico imunocompetente;
- Otimizar a infecção do modelo com *L. amazonensis*;
- Avaliar mecanismo de ação e a toxicidade *in vitro* de compostos leishmanicidas;
- Validar os esferoides dérmicos imunocompetente infectados com *L. amazonensis* em ensaios com compostos leishmanicidas;
- Avaliar a produção de citocinas do modelo de esferoide dérmicos imunocompetentes e o potencial imunomodulador dos compostos leishmanicidas testados.

5 METODOLOGIA

5.1 Culturas celulares

5.1.1 Cultura de células de linhagem murina

Foram cultivadas duas linhagens murinas de origem tumoral: fibroblastos de tecido conjuntivo murino (clone L929) e macrófagos J774 1.6 *in vitro*, em estufa de CO₂ à 37 °C. Para o cultivo destas, foi utilizado o meio RPMI suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina/ estreptomicina, sendo feita a manutenção a cada 48 horas.

5.1.2 Cultura do parasito

Formas promastigotas da *L. amazonensis* (cepa WHOM/00 LTB 0016), foram cultivadas *in vitro*, em incubadora BOD à 27°C, com meio de cultura Schneider's (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO) até a fase de crescimento exponencial. Para a realização dos ensaios de infecção, a massa parasitária foi centrifugada a 2500 RPM por 10 minutos, sendo feita a contagem em hemocítmetro e ajustes para os ensaios leishmanicidas e de infecção dos esferoides dérmicos imunocompetentes.

5.2 Compostos

Foram utilizados três compostos sintéticos, 3a, 3g e 4e, desenvolvidos no Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LPQM), vinculado ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A rota sintética utilizada para a obtenção desses compostos e seus respectivos substitutos foi descrita previamente por Da Silva et al. (2017). Ademais, a Anfotecina B (AmB) e o Antimonial trivalente (SbIII) foram utilizados como fármacos de referência. Todos os compostos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenados a -20°C até o momento de sua utilização nos experimentos, sendo posteriormente diluídos no meio de cultura apropriado para cada ensaio.

5.3 Ensaio de viabilidade celular MTT

O ensaio de viabilidade celular foi feito através da técnica de MTT [3-(4,5-dimetil -2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio], baseado na análise quantitativa da

atividade da desidrogenase dos produtos da reação NADH ou NADPH, que por sua vez reduz a atividade formazan do MTT em células viáveis. Para os ensaios em 2D, as células murinas foram tripsinizadas e contadas em hemocítmetro para obter a concentração de 1×10^5 por poço. Nas placas de co-cultura, foi utilizada a proporção de 8 fibroblastos para cada macrófago, a melhor proporção obtida no ensaio de padronização da construção dos esferoides feita em estudos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (dados ainda não publicados). As células foram então plaqueadas em uma placa de 96 poços e levadas para a estufa de CO₂ a 37°C por 24 horas. Após esse período, foi feita a adição dos compostos leishmanicidas: AmB, Sb III, 3a, 3g, 4e. Os compostos foram testados nas concentrações de 100ug/ml, 50ug/m, 25ug/ml, 12,5ug/ml, 6,25ug/ml, 3,125ug/ml, 1,56ug/ml e 0,78ug/ml. Após a adição dos compostos, a placa foi incubada novamente nas mesmas condições anteriores por 48 horas. Após esse período, o reagente MTT foi adicionado e a placa foi incubada por 2 horas. Passando esse tempo, o meio foi descartado e 100uL de DMSO foi adicionado aos poços. Em seguida, feita a leitura das placas, onde a absorbância foi avaliada pelo espectrofotômetro a 570nm (Multiskan FC- Thermo Scientific).

5.4 Ensaios leishmanicidas

5.4.1 Promastigotas

Formas promastigotas da *L. amazonensis* foram cultivadas a 27°C com meio Schneider's (Sigma, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino até a sua fase exponencial. Para avaliar a atividade leishmanicida dos compostos 3a, 3g, 4e, AmB e Sb III, os parasitas foram plaqueados na quantidade de 1×10^5 por poço e incubados a 27°C com diferentes concentrações dos compostos (0,78- 100 µg/mL) por 48 horas. Após esse período, a viabilidade dos parasitas foi avaliada a partir do metabolismo do resazurina, utilizando o reagente AlamarBlue® (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Sendo assim, foi adicionado 40uL por poço de uma solução de AlamarBlue® a 50% e os parasitas foram incubados sob as mesmas condições por mais 24 horas. Em seguida, foi feita a análise colorimétrica através da leitura em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm e as porcentagens de inibição do crescimento foram calculadas utilizando-se umas das fórmulas preconizadas pelo fabricante do AlamarBlue®. O valor de IC₅₀ foi

calculado com base na porcentagem de inibição do crescimento celular, em relação ao grupo controle não tratado.

5.4.2 Amastigotas

Macrófagos da linhagem J774 foram plaqueados na quantidade de 1×10^5 por poço em placas de 96 poços e incubados por 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Após esse período, foi realizada a infecção, na qual promastigotas de *L. amazonensis* foram adicionadas à placa na proporção de 20 parasitos por macrófago e incubadas por 24 horas a 27°C. Em seguida, os compostos 3a, 3g, 4e foram adicionados em concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 e 0,78 µg/mL por 48 horas. Após o tratamento, foram realizadas cinco lavagens dos poços com meio RPMI não suplementado com SFB para remover os parasitas não internalizados. Para a lise celular e liberação das amastigotas do meio intracelular, os poços foram incubados com 0,02% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Isofar, Duque de Caxias, RJ, BRA) por 30 minutos a 27°C. Em seguida, foi adicionado meio Schneider contendo 20% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina para neutralizar o SDS, e a placa foi incubada a 27°C por 72 horas. Após esse período, foi adicionado o reagente de viabilidade celular AlamarBlue® por 24 horas a 27°C. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para análise colorimétrica nos comprimentos de onda de 570 e 600nm. A determinação da IC₅₀ foi feita usando o software GraphPad Prism® versão 8.0.1 por meio de regressão não linear. Como controles negativos, foram utilizados poços com macrófagos sem infecção e poços com macrófagos infectados e sem tratamento. Macrófagos infectados e tratados com AmB e Sb III foram usados como controle positivo. Células não infectadas foram usadas como branco na leitura do espectrofotômetro.

5.4.3 Análise do potencial da membrana mitocondrial

Para determinar o efeito dos compostos sobre a integridade da membrana mitocondrial, promastigotas de *L. amazonensis* na concentração de 1×10^6 por poço foram tratadas por 48 horas com 1x, 2x e 4x o valor da IC₅₀, previamente estabelecido no item 5.3.1. Após o tratamento, as células foram colocadas em tubos de poliestireno de 5ml em triplicata. Como controle positivo, parasitos foram tratados com 5µM de valinomicina por 20 min. Os parasitas tratados e não tratados foram lavados uma vez com PBS e centrifugados por 5min a 2000 RPM. Em seguida, foi feita a incubação

com 10 µg/mL de rodamina 123 (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) por 20 min. Parasitos não tratados e sem marcação foram utilizados como controle negativo. Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes com PBS, sendo submetidos a centrifugações a 2000 RPM por 5 minutos em cada lavagem. Em seguida, foram ressuspensos em 200µL de PBS e levados para aquisição. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA), equipado com o software Cell Quest, usando o canal FL1-H (20.000 eventos\tubo). As análises foram realizadas usando o software FlowJo versão 10. As alterações na polarização da membrana mitocondrial foram medidas usando o Índice de Variação (VI) obtido pela equação $(MT-MC)/MC$, onde MC é a intensidade mediana de fluorescência do controle e MT a intensidade mediana de fluorescência das células tratadas. Valores negativos para VI representam despolarização da membrana mitocondrial (Dos Santos Aliança et al., 2014).

5.4.4 Análise de viabilidade e morte celular

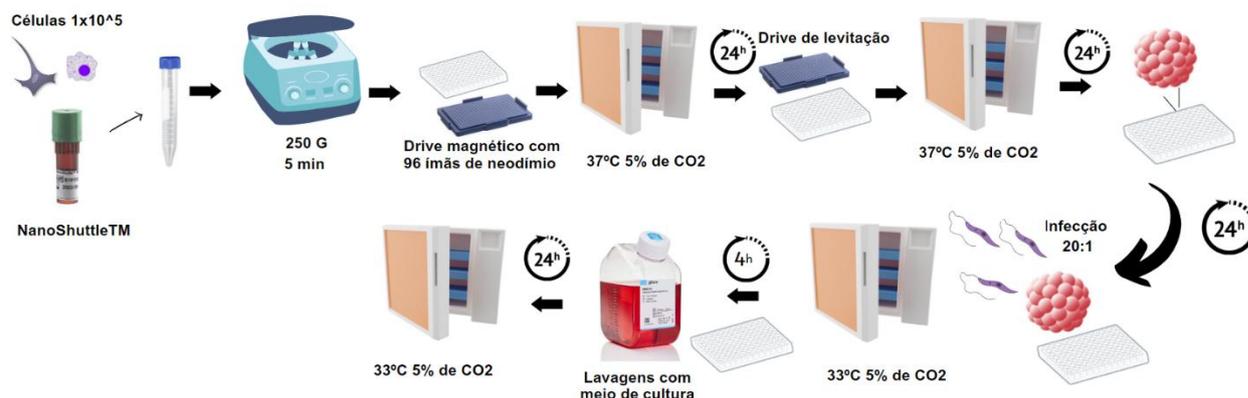
Para analisar o mecanismo de morte celular, promastigotas de *L. amazonensis* foram marcadas na concentração de 1×10^6 por poço, tratadas por 48 horas com 1x, 2x e 4x o valor da IC_{50} , além de um grupo não tratado. A marcação foi realizada com Anexina e Iodeto de Propídeo (PI) em tubos de poliestireno de 5 ml. Nos controles positivos, foram adicionados 500 µL de álcool 70% aos tubos que não receberiam nenhuma marcação, tubos que receberiam apenas Anexina ou apenas PI e tubos com dupla marcação. Os parasitos tratados e não tratados foram lavados uma vez com 500 µL de solução tampão de ligação (Binding Buffer) e incubados com 5 µL de Anexina por 10 minutos. Após outra lavagem com 500 µL da solução tampão, centrifugando a 2000 RPM por 5 minutos, os parasitos foram ressuspensos em 200 µL da solução tampão e 5 µL de PI foram adicionados. Parasitos não tratados e não marcados foram utilizados como controle negativo. A aquisição dos dados foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA), equipado com o software Cell Quest. Os dados foram obtidos através dos canais FL1 (Anexina) x FL2-H (PI), analisando-se vinte mil eventos por amostra. As análises foram realizadas usando o software FlowJo versão 10. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células marcadas para cada condição testada.

5.5 Elaboração e infecção do esferoide dérmico imunocompetente murino

Após a expansão das células descritas no item 5.1.1, cada linhagem celular foi tripsinizada, contada em hemocítmetro e ajustada para o experimento. Foram realizados cálculos proporcionais para utilizar 8 fibroblastos para cada macrófago. Após os cálculos, as células foram adicionadas na concentração de 1×10^5 células por esferoide em tubos Falcon de 15 ml, aos quais foi adicionado 1 μ L de NanoShuttle™. As células e a NanoShuttle™ foram submetidas a uma centrifugação de 1500 RPM por 5 minutos. Em seguida, o pellet foi ressuspense no meio e novamente centrifugado. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes, até o pellet obter uma coloração marrom homogênea, indicando a internalização das nanopartículas nas células. Ao final, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspense em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram então distribuídas em uma placa de 96 poços de fixação ultrabaixa (Greiner, Bio-One), sendo semeadas 1×10^5 células por poço. Em seguida, a placa foi colocada sobre um drive magnético de 96 ímãs de neodímio para atrair as células e formar os esferoides, sendo incubada por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, o drive magnético foi removido e a placa foi incubada por mais 24 horas para remodelação e levitação dos esferoides.

Com os esferoides formados, foi realizado o processo de infecção com a *L. amazonensis*. O meio de cultura foi removido dos poços e adicionado meio de cultura contendo os parasitos na proporção de 20 parasitos por macrófago. Após a adição dos parasitos, a placa foi incubada por 4 horas a 33°C e 5% de CO₂. Passado esse período, foram realizadas lavagens dos poços para remover os parasitos não internalizados, adicionando-se 100 μ L de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após duas lavagens, a placa foi incubada novamente por mais 24 horas.

Figura 10- Diagrama do processo de formação e infecção dos esferoides celulares.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

5.6 Ensaio de quantificação da carga parasitária dos esferoides dérmicos infectados

As triplicadas dos esferoides infectados com a *L. amazonensis* com e sem tratamento foram lisadas por ação mecânica utilizando ponteiras e, em seguida, e transferidas para microtubos de 2 mL, constituindo um pool para cada condição experimental. Após a transferência foi realizada a extração do DNA através do Kit Qiagen (QIAamp® DNA Mini Kit) seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados com e sem tratamento foi realizada pelo sistema de detecção com intercaladores não específicos SYBER® Green. O volume final foi de 25 µl contendo primers, DNA e SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). A curva padrão foi construída a partir de diluições seriadas da cultura de *L. amazonensis* (0,5ng, 50pg, 5pg, 0,5pg, 50fg e 5fg) e usada como controles positivos. As amostras foram testadas em duplicatas, usando condições padrão (40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento a 60 °C por 1 min), no Sistema QuantStudio Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific).

5.7 Dosagem de citocinas dos esferoides dérmicos imunocompetentes por citometria de fluxo

As citocinas TNF, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A foram mensuradas em sobrenadante dos esferoides tratados com 1x, 2x e 4x o valor da IC₅₀ dos compostos 3a e AmB, obtidas a partir dos testes com amastigotas da espécie de *L. amazonensis*. Foi utilizado neste ensaio o kit CBA mouse Th1/Th2/Th17 (BD™ Cytometric Bead Array CBA, BD Bioscience, San Jose, CA) de acordo com as recomendações do

fabricante. A aquisição dos dados foi realizada através do citômetro FACSCalibur (BD Bioscience) e as análises através do software FCAP Array v3 (Soft Flow Inc). Este ensaio foi realizado apenas com o composto que se destacou nos testes iniciais.

5.8 Dosagem de Óxido Nítrico (ON)

Foram feitas as dosagens de óxido nítrico nas placas infectadas e não infectadas de culturas 2D e 3D contendo apenas macrófagos J774 e desses macrófagos em co-cultura com fibroblastos da linhagem L929. Para o ensaio, 50 μ L do sobrenadante das placas das culturas em monocamada e contendo os esferoides não infectados e infectados com e sem tratamento com os compostos leishmanicidas nas concentrações de 1x, 2x e 4x IC₅₀ foram coletados no último dia de experimento. Para tanto, transferiu-se 50 μ l do sobrenadante de cada poço para placas de 96 poços e o mesmo volume do reagente de Griess (solução de sulfanilamida 1% e dihidrocloronaftiletileno diamina 0,1% em H₃PO₄ a 0,3 M) para avaliar a quantidade de ON. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan FC- Thermo Scientific) a 540 nm e a concentração de ON foi determinada comparando-se a absorbância das amostras com uma curva padrão preparada com nitrito de sódio. O percentual de produção de ON de cada composto foi avaliado comparando os resultados das absorbâncias com os das culturas não tratadas com os compostos.

5.9 Análise Estatística

As análises foram conduzidas utilizando testes paramétricos ou não paramétricos após a confirmação da normalidade com o teste de Shapiro-Wilk. A variabilidade entre os grupos tratados e o grupo controle foi analisada com o teste de Mann-Whitney, uma vez verificada a não normalidade. Para determinar os valores de IC₅₀ e CC₅₀, foram aplicados testes de regressão não linear simples. O índice de seletividade foi calculado a partir da razão entre os valores da CC₅₀ e IC₅₀ obtidos. Todas as análises foram feitas com o software GraphPad Prism 8.0, e as conclusões foram consideradas significativas ao nível de 5% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação da atividade citotóxica dos compostos em cultura 2D de células murinas

6.1.1 Macrófagos J774

Os valores de concentração citotóxica para os macrófagos J774, obtidos através do ensaio de MTT, variaram entre 3,5 µg/mL (Sb III) e 25,3 µg/mL (composto 3a), conforme representado na Tabela 1. Dentre todos os compostos avaliados, o composto 3a destacou-se como o menos tóxico, apresentando a menor citotoxicidade em comparação às drogas de referência, cujos valores de CC₅₀ foram 24,5 µg/mL para a AmB e 3,5 µg/mL para o Sb III. Além disso, o composto 4e também apresentou baixa toxicidade com um valor de 16,1 µg/mL. Em contraste, o composto 3g destacou-se negativamente (7,7 µg/mL), mostrando-se mais tóxico do que a droga de referência AmB, porém menos tóxico que o Sb III (Tabela 1).

6.1.2 Fibroblastos L929

A avaliação da citotoxicidade dos compostos nos fibroblastos L929 revelou que todos os compostos testados apresentaram valores de CC₅₀ superiores ao da AmB (4,2 µg/mL) e do Sb III (11,9 µg/mL). Esses valores variaram de 14,2 µg/mL (composto 4e) a 26,2 µg/mL (composto 3g), sendo o composto 3g o menos tóxico entre os compostos testados para essa linhagem celular, conforme mostrado na Tabela 1. Esses resultados sugerem que os compostos possuem uma menor toxicidade em fibroblastos L929 quando comparados à AmB e SbIII, com destaque para o composto 3g, que apresentou a maior segurança (Tabela 1).

6.2.3 Co-cultura J774 e L929

O potencial citotóxico dos compostos estudados também foi avaliado sobre as células das linhagens L929 e J774 em co-cultura na proporção de 8:1, respectivamente. Os resultados descritos na Tabela 1 apresentaram os valores de CC₅₀ que variaram de 8,8 µg/mL (composto 3g) a 42,1 µg/mL (composto 3a). Os resultados indicam que entre os compostos avaliados para essas células em co-cultura, o composto 3a é o que mais se destaca, apresentando CC₅₀ de 42,1 µg/mL e se mostrando menos tóxico e superando as drogas de referência. Em contrapartida,

os compostos 3g e 4e se mostraram mais tóxicos do que a AmB. Ademais, o composto 3g foi o único entre os compostos testados que se mostrou mais tóxico do que ambas as drogas de referência (Tabela 1).

Tabela 1- Atividade citotóxica de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis frente a macrófagos J774, fibroblastos L929 e J774 e L929 em co-cultura.

Compostos	J774	L929	J774+L929
	CC ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)
AmB	24,5	4,2	32,0
Sb III	3,5	11,9	11,2
3a	25,3	21,6	42,1
3g	7,7	26,2	8,8
4e	16,1	14,2	11,6

Fonte: Elaborado pela autora, 2025.
CC₅₀: Concentração citotóxica para 50% das células.

6.2 Avaliação da ação dos compostos em *Leishmania amazonensis*

6.2.1 Formas promastigotas

Os valores de inibição das formas promastigotas variaram entre 1,5 µg/mL para o composto 3a, 1,6 µg/mL para o composto 3g e 1,8 µg/mL para o composto 4e. Todos os compostos testados apresentaram valores de IC₅₀ significativamente melhores em comparação com as drogas de referência, AmB (28,3 µg/mL) e Sb III (43,1 µg/mL), conforme detalhado na Tabela 2. Apesar dos valores muito próximos, entre todos os compostos analisados, o composto 3a foi o que mais se destacou, demonstrando a melhor atividade leishmanicida (Tabela 2). Esses resultados indicam um potencial terapêutico promissor tanto do composto 3a quanto dos outros compostos, superando a eficácia da AmB e SBIII nas formas promastigotas do parasito.

Tabela 2- Atividade leishmanicida de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis frente a promastigotas de *L. amazonensis*.

Compostos	<i>Leishmania amazonensis</i> IC ₅₀ µg/mL
AmB	28,3
Sb III	43,1
3a	1,5
3g	1,6
4e	1,8

Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

IC₅₀: concentração inibitória para 50% das promastigotas de *L. amazonensis*.

6.2.1.1 Índice de Seletividade

Os compostos também foram avaliados quanto ao seu índice de seletividade (IS), que é a razão entre os valores de citotoxicidade (CC₅₀) para as células de mamíferos e os valores de atividade leishmanicida (IC₅₀). Dessa forma, foi calculada a razão entre os valores de CC₅₀ dos macrófagos J774, fibroblastos L929 e das duas células em co-cultura com os valores das IC₅₀ dos compostos 3a, 3g, 4e, AmB e Sb III frente a promastigotas da *L. amazonensis*. O IS obtido para as formas do parasito indicou que, em relação aos macrófagos J774, todos os compostos se mostraram mais seletivos para o parasito do que para as células murinas, exceto a AmB e o SBIII, com o composto 3a sendo o mais seletivo (16,9) (Tabela 3).

Já sobre os fibroblastos L929, todos os compostos também se mostraram mais seletivos para o parasito do que para as células, com a exceção também da AmB (0,2) e do Sb III (0,3). Além disso, o composto 3g foi o que apresentou uma maior seletividade (Tabela 3).

Em relação a co-cultura de J774 e L-929, todos os compostos mostraram uma maior seletividade para o parasita, exceto o Sb III (0,3). Ademais, nessa condição de co-cultura o destaque foi dado ao composto 3a, que se ressaltou apresentando um IS de 28,1 (Tabela 3).

Tabela 3- Índice de Seletividade (IS) para a forma promastigota de *Leishmania amazonensis* de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis.

Compostos	J774	L-929	J774+L-929
	IS (promastigotas)	IS (promastigotas)	IS (promastigotas)
AmB	0,9	0,2	1,1
Sb III	0,1	0,3	0,3
3a	16,9	14,4	28,1
3g	4,8	16,4	5,5
4e	8,9	7,9	6,4

Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

IS: Índice de seletividade.

6.2.2 Formas amastigotas

As concentrações inibitórias das formas amastigotas com as drogas de referência e os compostos da nova classe das piridinas tiazóis também foram determinadas. Durante os testes, observou-se que a AmB apresentou um desempenho superior nesta forma do parasito, exibindo um valor de inibição na concentração de 2,6 µg/mL. Em relação a AmB, para essa forma do parasita, todos os compostos apresentaram um desempenho inferior. Porém, todos os compostos se mostraram mais eficientes do que a o Sb III, que apresentou IC₅₀ de 20,6 µg/mL.

Ademais, a maioria dos compostos apresentou uma maior seletividade para os parasitos do que para os macrófagos, com apenas o Sb III e o composto 3g sendo mais seletivos para as células. Dentre todos os compostos, a AmB foi a mais seletiva para os parasitos e, dentre os nossos compostos, o 3a mostrou o melhor potencial. Nossos resultados indicam que a diferença na atividade antileishmania entre as diferentes classes de compostos testados depende do estágio do ciclo de vida do parasita (Tabela 4).

Tabela 4- Atividade leishmanicida de uma nova classe de compostos piridinas tiazóis frente a amastigotas de *L. amazonensis*.

Compostos	<i>Leishmania amazonensis</i> IC₅₀ (µg/mL)	J774 IS
AmB	2,6	9,4
Sb III	20,6	0,2
3a	12,6	2,0
3g	9,1	0,8
4e	8,3	1,9

Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

IC₅₀: Concentração inibitória para 50% das promastigotas de *L. amazonensis*.

IS: Índice de seletividade

6.2.3 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial

A marcação com a rodamina123 foi usada para avaliar o efeito dos compostos AmB, Sb III, 3a, 3g e 4e em diferentes concentrações (1x, 2x e 4x IC₅₀) no potencial da membrana mitocondrial, onde as células foram analisadas por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que promastigotas *da L. amazonensis* tratadas diminuíram a intensidade de fluorescência da rodamina123, demonstrando assim diminuição no potencial mitocondrial nos parasitos tratados quando comparada com os parasitos não tratados. Com base na Tabela 5 e na Figura 11, pode-se interpretar que todos os compostos despolarizam a membrana dos parasitas em todas as concentrações testadas. A despolarização aumenta progressivamente conforme a concentração é elevada na maioria dos compostos, atingindo o maior nível na concentração de 4xIC₅₀. No entanto, o composto 3g apresenta a maior despolarização na concentração de 2xIC₅₀ (Figura 11, Tabela 5).

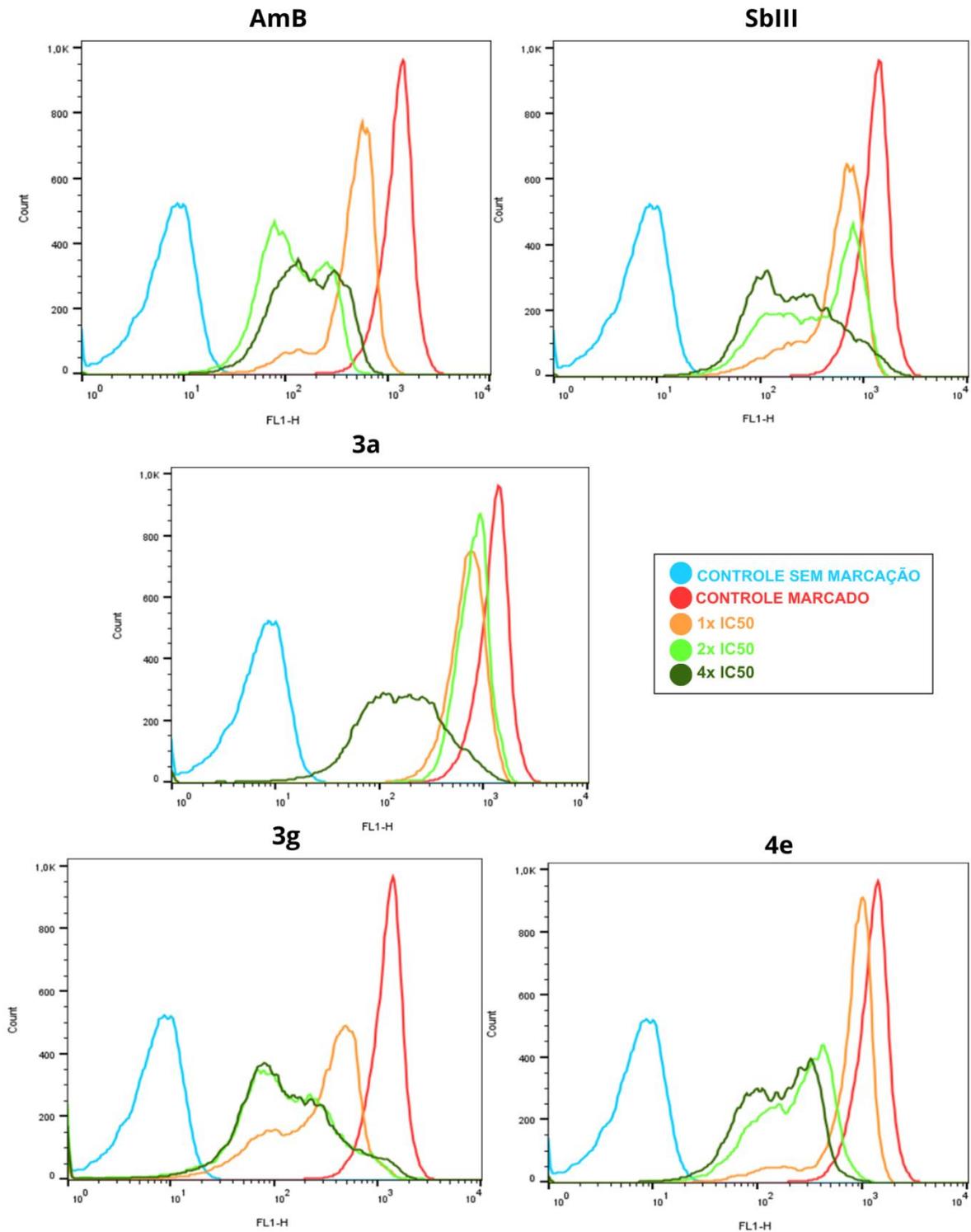
Tabela 5- Efeito dos compostos AmB, Sb III, 3a, 3g e 4e nas concentrações de 1x, 2x e 4x os valores da IC₅₀ sobre o potencial da membrana mitocondrial.

Tratamento	IV
Sem marcação	0
Controle marcado	-0,33
AmB 1x	-0,73
AmB 2x	-0,88
AmB 4x	-0,89
Sb III 1x	-0,63
Sb III 2x	-0,70
Sb III 4x	-0,84
3a 1x	-0,58
3a 2x	-0,55
3a 4x	-0,82
3g 1x	-0,83
3g 2x	-0,88
3g 4x	-0,87
4e 1x	-0,58
4e 2x	-0,87
4e 4x	-0,89

Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

IV: Índice de Variação

Figura 11- Representação gráfica da citometria de fluxo para análise da ação dos compostos AmB, Sb III, 3a, 3g e 4e no potencial da membrana mitocondrial de promastigotas da *Leishmania amazonensis*.

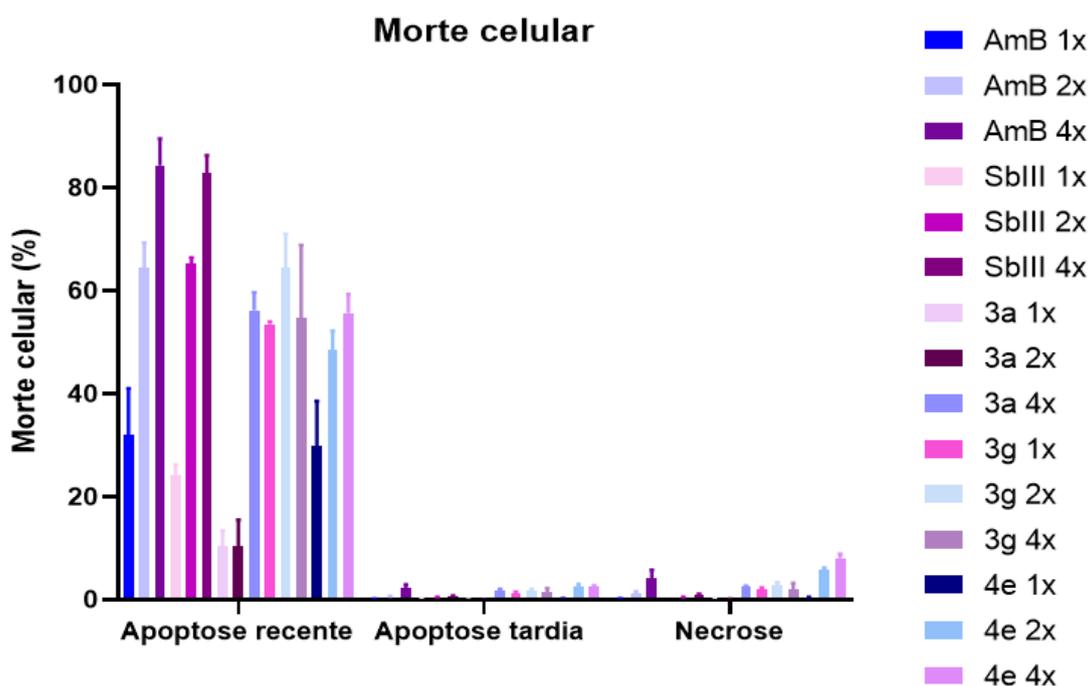


Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

6.2.4 Avaliação da morte celular por citometria de fluxo

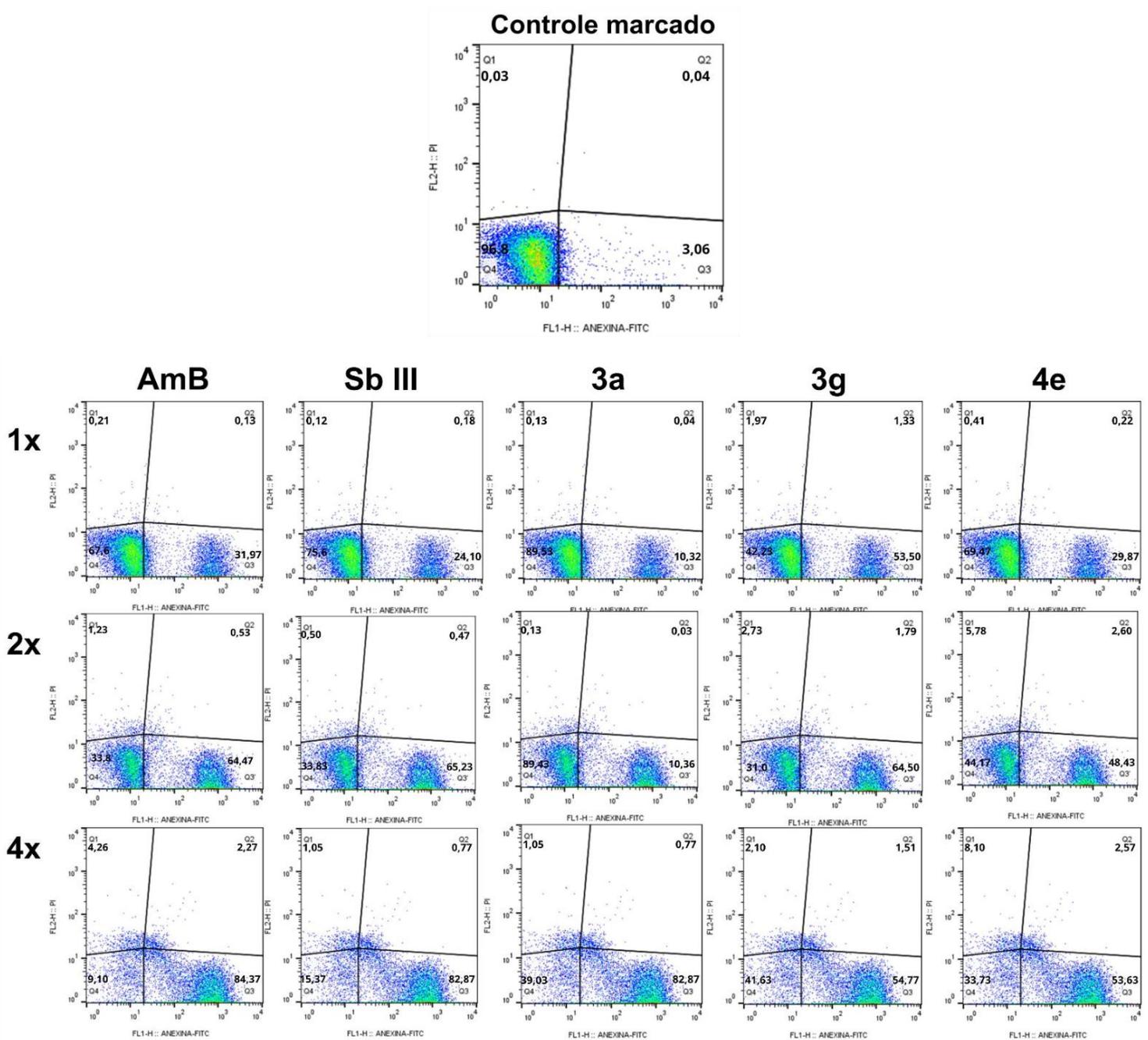
Os dados apresentados na figura 12 mostram a porcentagem de morte celular nas formas promastigotas tratadas com os compostos AmB, Sb III, 3a, 3g e 4e por 48 horas em diferentes concentrações (1x, 2x e 4x IC_{50}), marcadas com anexina V e iodeto de propídio. A análise diferenciou entre apoptose recente, apoptose tardia e necrose. De acordo com os resultados, todos os compostos induziram uma alta porcentagem de apoptose recente nas formas promastigotas. Observou-se que a apoptose recente foi exibida principalmente nas concentrações mais altas (4x IC_{50}) dos compostos, com exceção do composto 3g, que teve seu pico na concentração de 2x IC_{50} (Figura 12). Além disso, houve uma menor incidência de apoptose tardia, com a maioria das células não apresentando sinais significativos desse tipo de morte celular, independentemente da concentração do composto utilizado (Figura 12). Em relação à necrose, os dados indicam que esse tipo de morte celular foi mínimo em todas as condições testadas, sugerindo que os compostos testados induzem predominantemente apoptose nas formas promastigotas em vez de necrose (Figura 12 e 13).

Figura 12- Representação gráfica da avaliação da morte celular por apoptose e necrose das formas promastigotas tratadas com 1x, 2x e 4x os valores da IC_{50} dos compostos AmB, SbIII, 3a, 3g e 4e.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 13- Aquisição por citometria de fluxo para análise morte celular com Anexina V e iodeto de propídio.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

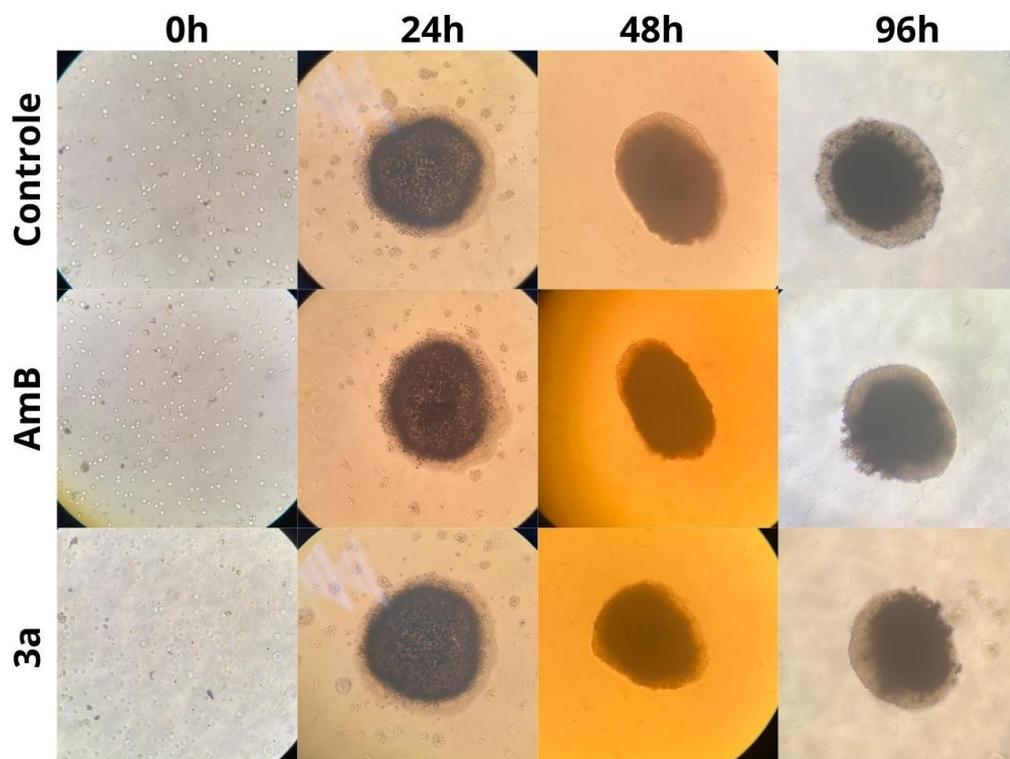
6.3 Esferoides dérmicos murinos

6.3.1 Esferoides dérmicos não infectados

Após 24 horas do plaqueamento das células magnetizadas na placa repelente celular, acoplada ao drive magnético contendo 96 ímãs de neodímio, observou-se a

formação inicial de esferoides celulares. Esses esferoides apresentavam pequenas aglomerações de células ao redor, indicando um estágio inicial de organização. As células começaram a se agrupar, criando as primeiras estruturas esferoidais visíveis ao microscópio. Após a adição do drive de levitação, os esferoides começaram a levantar, o que contribuiu para uma compactação mais homogênea e eficiente. A levitação permitiu que as células se organizassem de maneira mais uniforme, reduzindo os espaços entre elas e aumentando a densidade celular. Essa etapa foi crucial para melhorar a integridade estrutural dos esferoides, facilitando a formação de uma esfera mais compacta e estável. Os compostos foram adicionados após as 48 horas de formação e no último dia do ensaio, após mais 48 horas de incubação com os compostos, totalizando 96 horas de experimento, os esferoides mantiveram notavelmente a integridade de sua morfologia e compactação. A zona proliferativa dos esferoides, que é crucial para a viabilidade e crescimento celular, estava bem definida e ativa, demonstrando que as condições experimentais suportavam não apenas a formação, mas também a manutenção e o crescimento dos esferoides (Figura 14).

Figura 14 - Formação dos esferoides dérmicos murinos ao longo dos dias. Aumento de 20x.



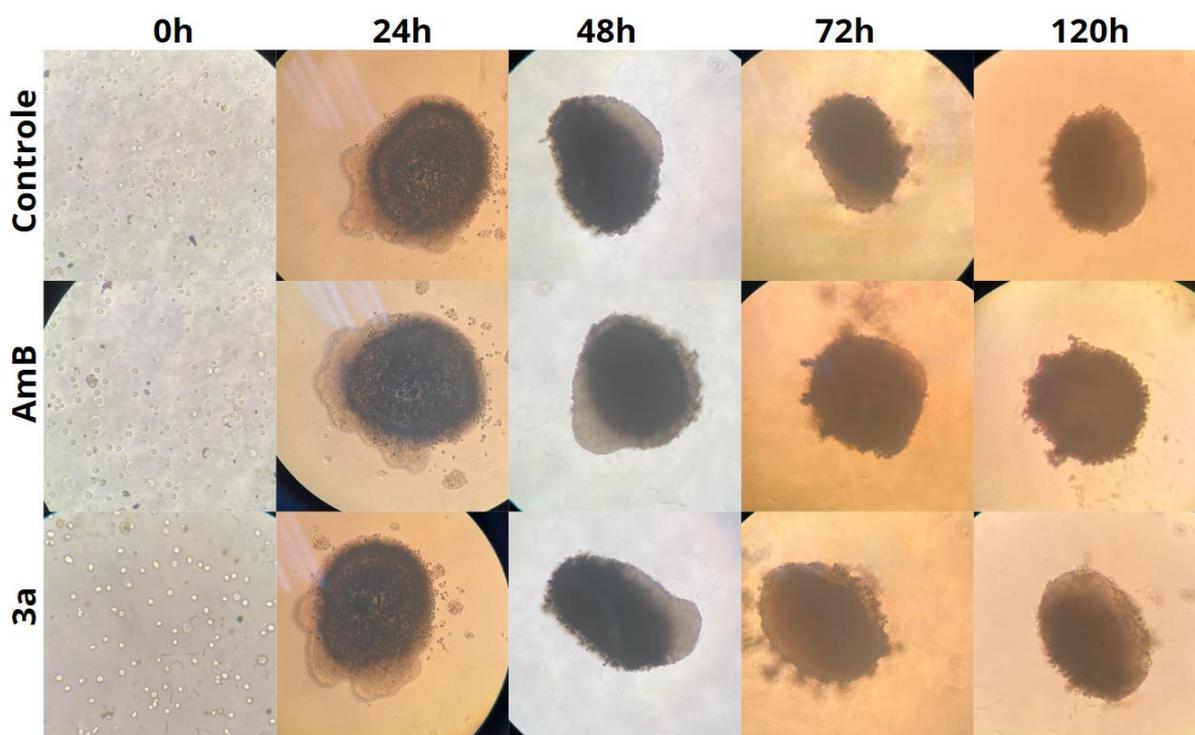
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Legenda: 0h- Dia do plaqueamento. Células ainda dispersas; / 24h: Esferoides formados. Dia da remoção do ímã magnético e adição do drive de levitação;/ 48h: Esferoides levitando. Dia da adição dos compostos;/ 96h: Imagem dos esferoides com a concentração mais alta dos compostos (4x IC₅₀) após o período de incubação.

6.3.2 Esferoides dérmicos infectados

Nos ensaios com esferoides destinados à infecção, a formação seguiu um padrão semelhante ao observado no experimento anterior até o momento da infecção. Os esferoides apresentaram uma estrutura compacta e bem definida, mantendo características morfológicas consistentes. Após 48 horas de formação, os parasitos foram introduzidos, e ao longo das 72 horas de experimento, observou-se uma leve degradação dos esferoides. Essa degradação foi acompanhada por uma perda significativa de células, evidenciada pela redução do tamanho dos esferoides e por alterações em sua morfologia. As zonas proliferativas, inicialmente bem demarcadas, começaram a apresentar sinais de desorganização e perda celular a partir das 72 horas, momento em que os compostos foram adicionados (Figura 15).

Figura 15- Acompanhamento dos esferoides murinos infectados com a *L. amazonensis* ao longo dos dias. Aumento de 20x.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

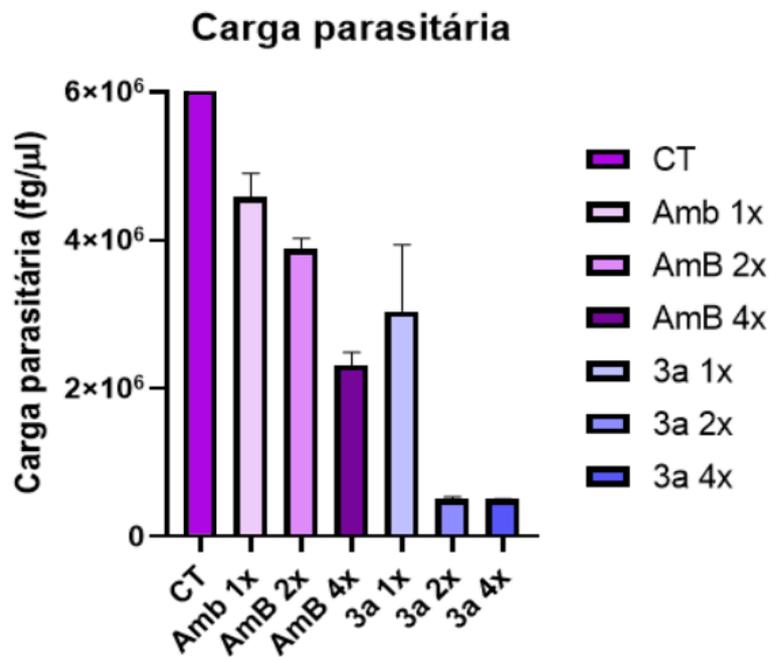
Legenda: 0h- Dia do plaqueamento. Células ainda dispersas; / 24h: Esferoides formados. Dia da remoção do ímã magnético e adição do drive de levitação;/ 48h: Esferoides levitando antes da realização do ensaio de infecção. Dia da infecção com a *L. amazonensis*; /72h: Esferoides infectados. Dia da adição dos compostos; / 120h: Esferoides infectados e tratados. Imagem dos esferoides com a concentração mais alta dos compostos (4x IC₅₀) após o período de incubação.

6.4 Quantificação da carga parasitária dos esferoides dérmicos infectados

A carga parasitária (fg/μl) dos esferoides infectados submetidos a tratamentos por 48h com os compostos AmB e 3a nas concentrações de 1x, 2x e 4x IC₅₀ foi quantificada por qPCR. A análise dos dados revela que o grupo controle, sem tratamento, exibiu a maior carga parasitária, com uma média de 16.833.858 fg/μl, servindo como referência para a carga sem intervenção terapêutica.

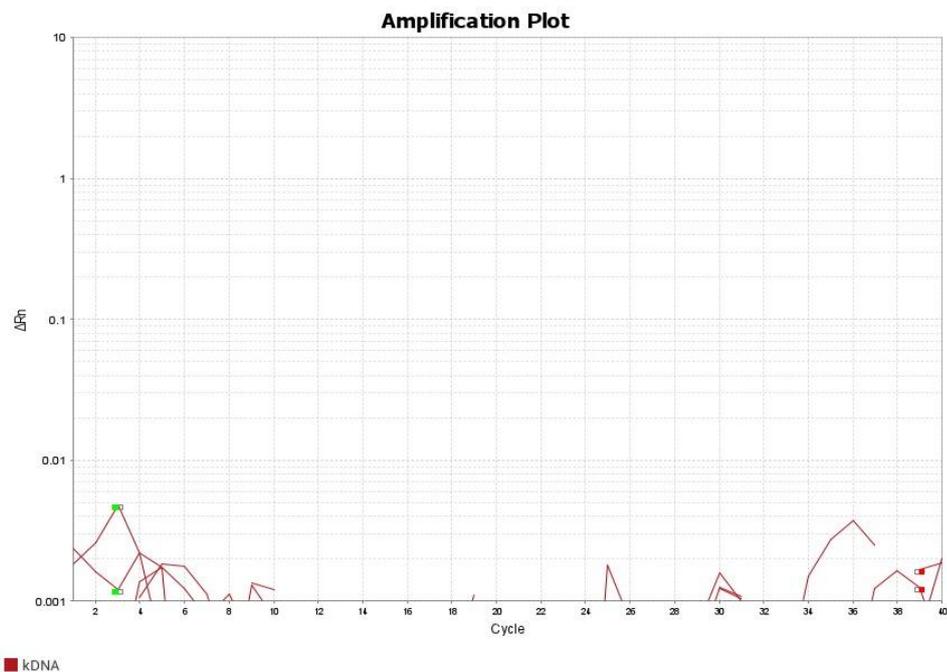
Nos esferoides infectados tratados com a concentração IC₅₀ de AmB (AmB 1x), a carga parasitária foi reduzida 3,67 vezes (4.581.786,5 fg/μl) em relação ao controle. Ao aumentar para 2x a concentração IC₅₀ de AmB (AmB 2x), a carga parasitária continuou a diminuir, reduzindo-se 4,34 vezes (3.883.541,875 fg/μl). Com o tratamento utilizando 4x IC₅₀ de AmB (AmB 4x), observou-se uma redução ainda mais acentuada, diminuindo 7,28 vezes (2.313.084,75 fg/μl) a carga parasitária (Figura 16). Os esferoides tratados com a concentração IC₅₀ de 3a (3a 1x) apresentaram uma carga parasitária reduzida 4,16 vezes (4.042.084,25 fg/μl) em relação ao controle. Entretanto, os esferoides tratados com duas e quatro vezes a concentração IC₅₀ de 3a (3a 2x e 3a 4x) destacaram-se por suas reduções drásticas, diminuindo 32,65 vezes (515.536,531 fg/μl) e 33,36 vezes (504.712,375 fg/μl), respectivamente. Esses resultados indicam que o composto 3a, em concentrações aumentadas, possui uma eficácia extremamente elevada na redução da carga parasitária. Dessa forma, os dados demonstram que, embora ambos os tratamentos (AmB e 3a) sejam eficazes na redução da carga parasitária, o composto 3a, especialmente em concentrações mais altas, se sobressai consideravelmente, destacando-se como um tratamento potencialmente mais eficaz no combate ao parasito (Figuras 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25).

Figura 16- Representação gráfica da quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados tratados com 1x,2x, e 4x o valor da IC₅₀ da AmB e composto 3a por qPCR.



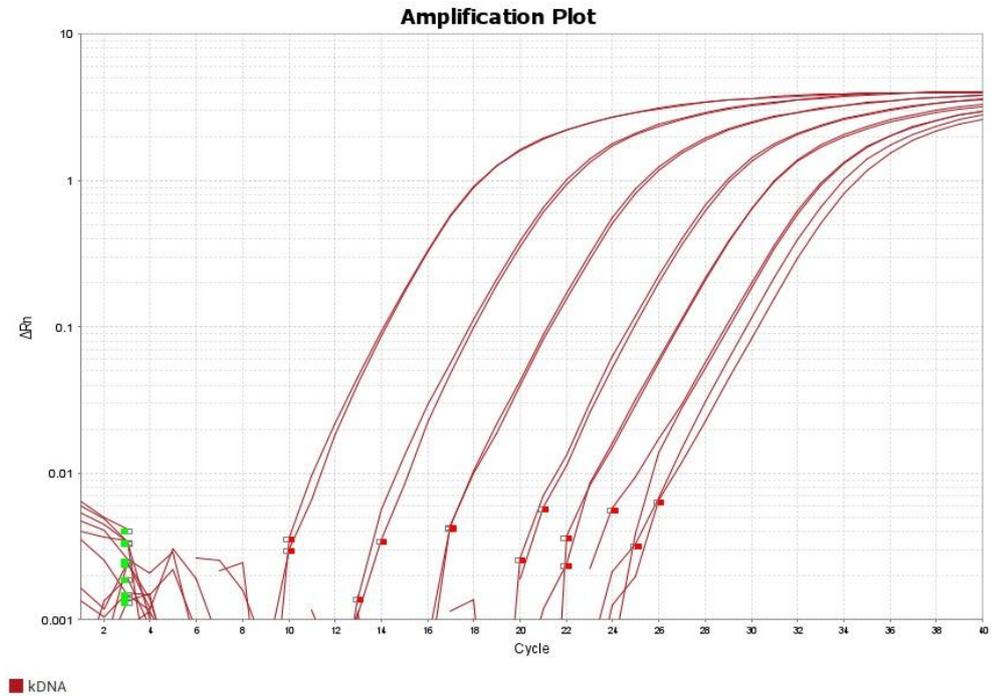
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 17- Gráfico de amplificação do kDNA da Leishmania referente ao controle negativo (NTC) do experimento de quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados e tratados



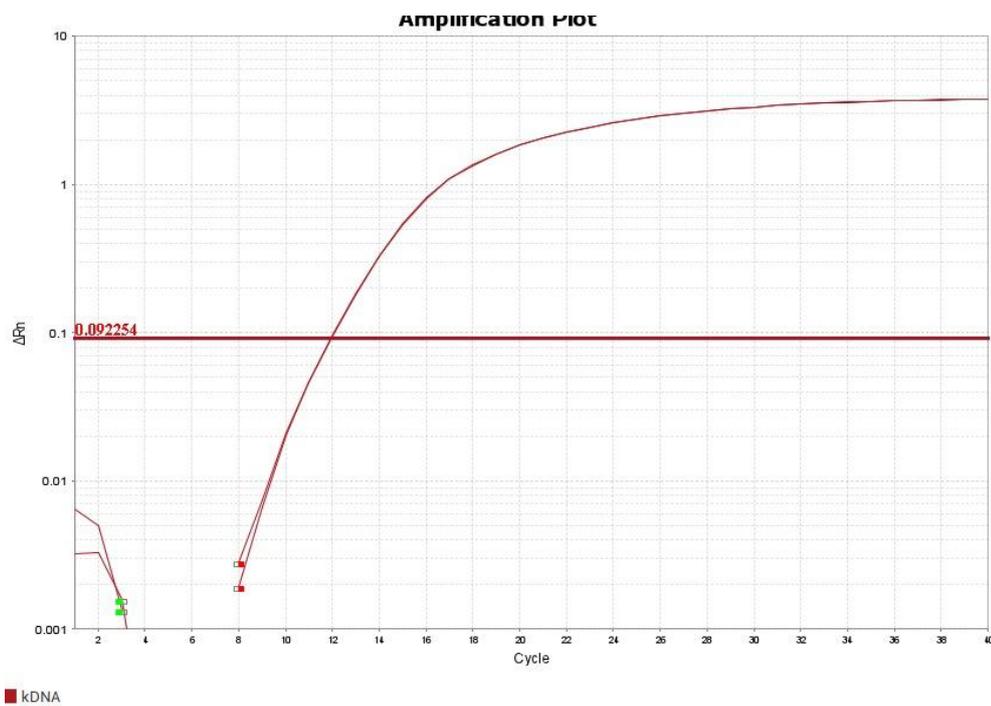
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 18- Gráfico de amplificação do kDNA da *Leishmania* referente a curva padrão variando de 50ng a 0,5 fg do experimento de quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados.



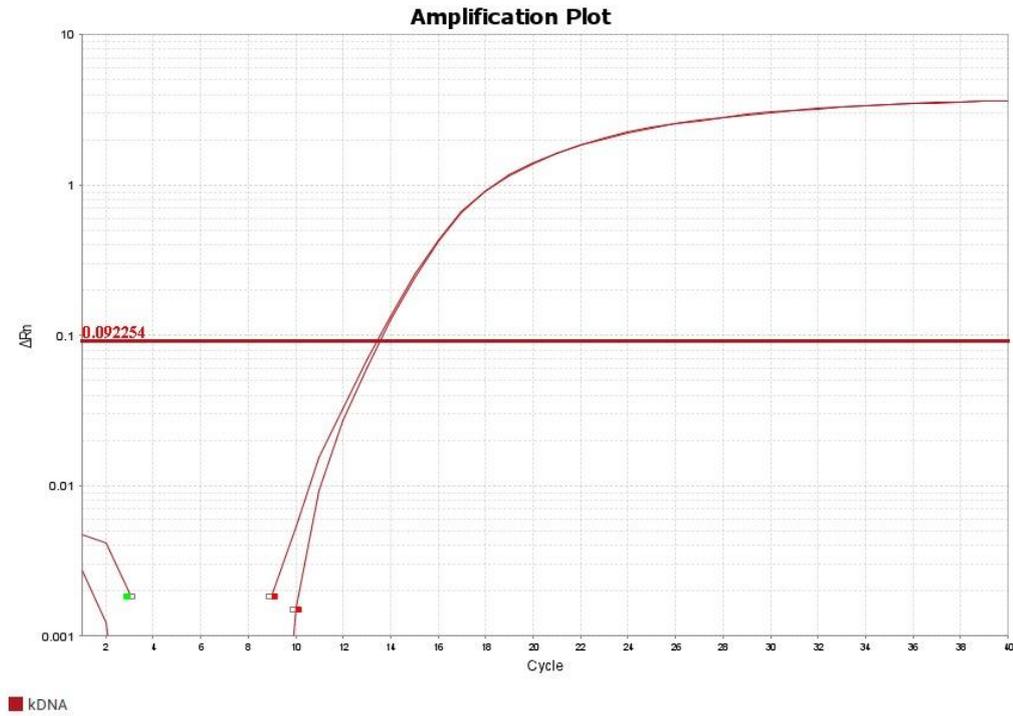
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 19- Gráfico de amplificação do kDNA da *Leishmania* referente a quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados e sem tratamento.



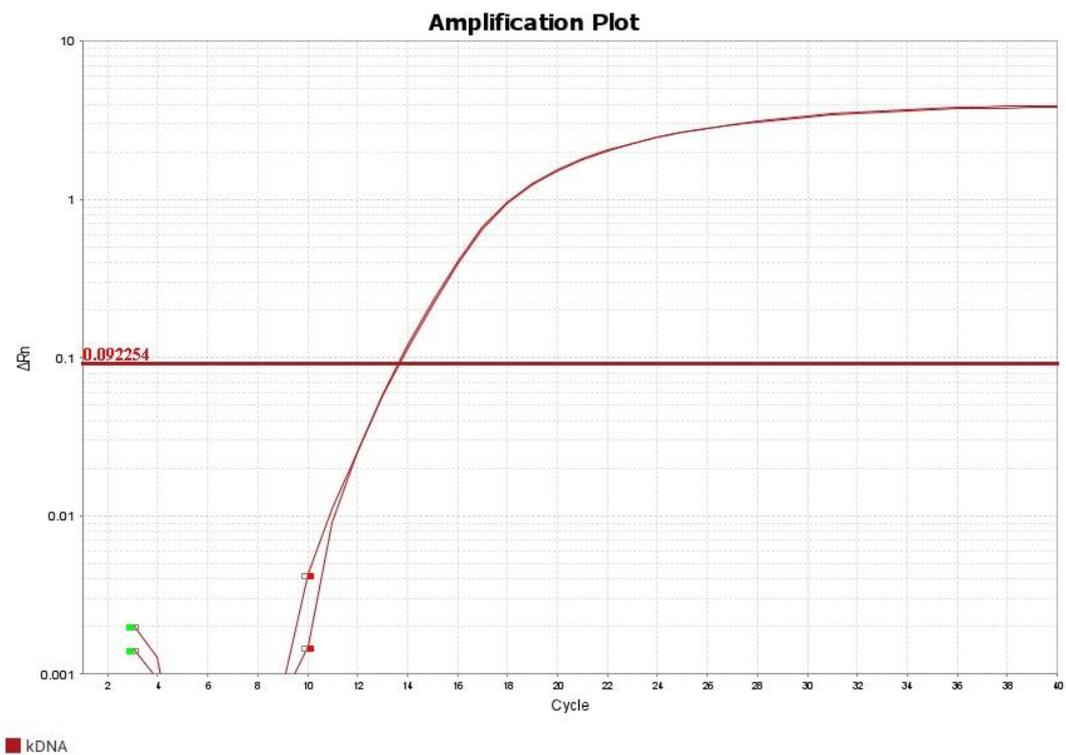
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 20- Gráfico de amplificação do kDNA da *Leishmania* referente a quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados tratados com 1x o valor da IC₅₀ da AmB.



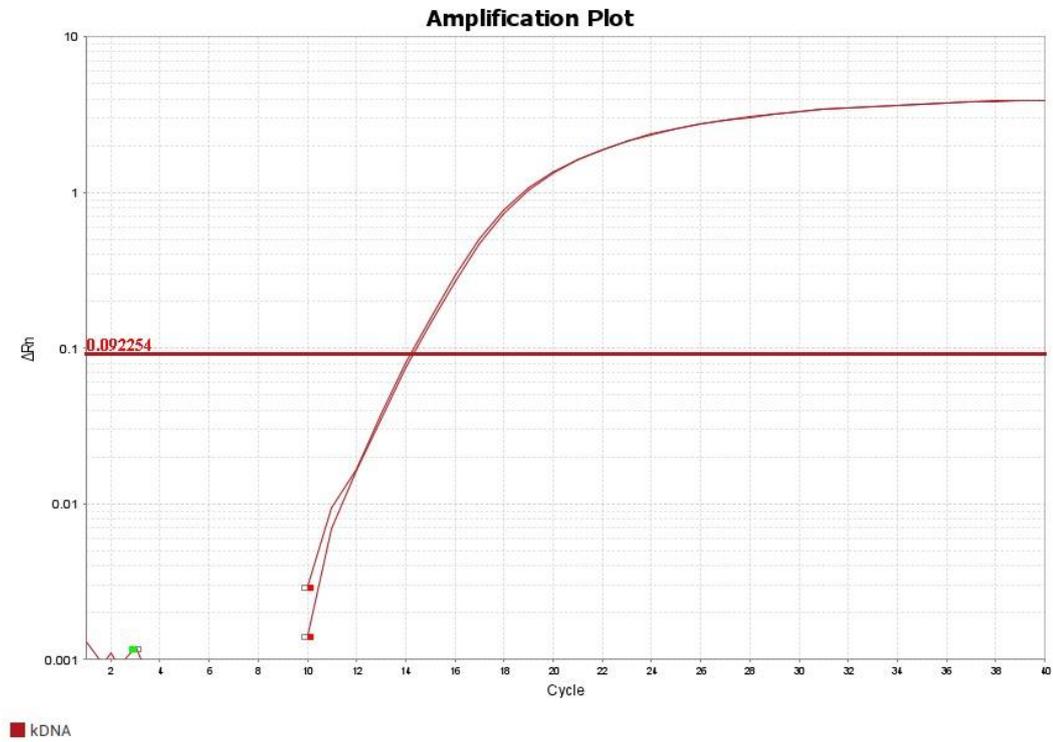
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 21- Gráfico de amplificação do kDNA da *Leishmania* referente a quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados tratados com 2x o valor da IC₅₀ da AmB.



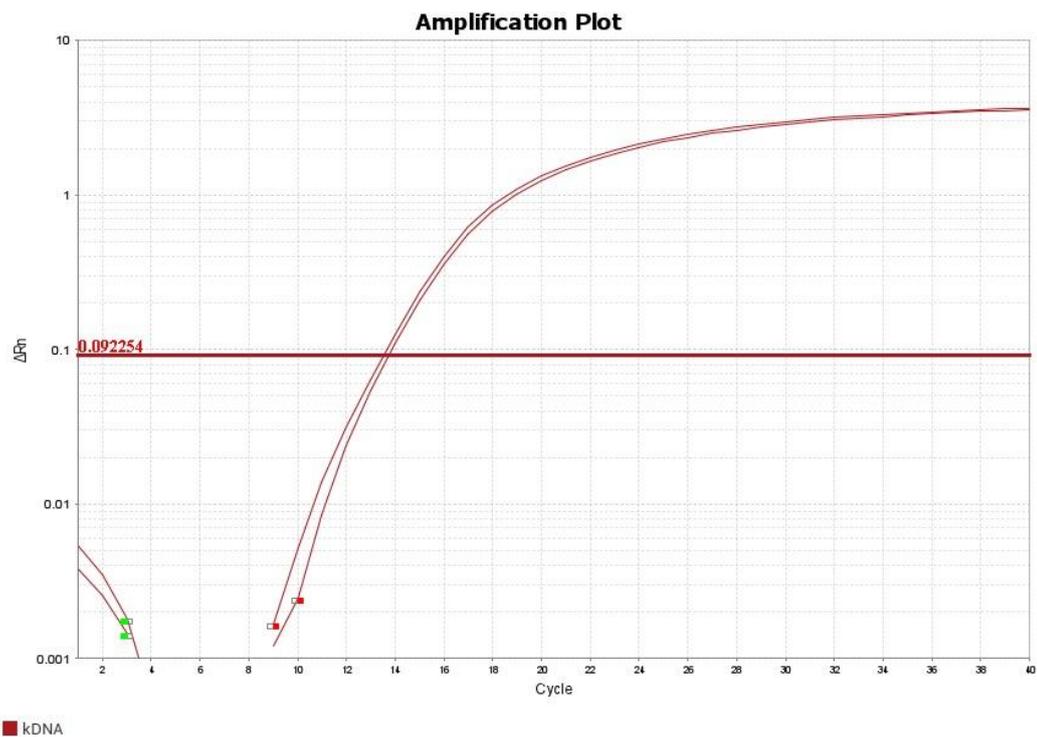
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 22- Gráfico de amplificação do kDNA da *Leishmania* referente a quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados tratados com 4x o valor da IC₅₀ da AmB.



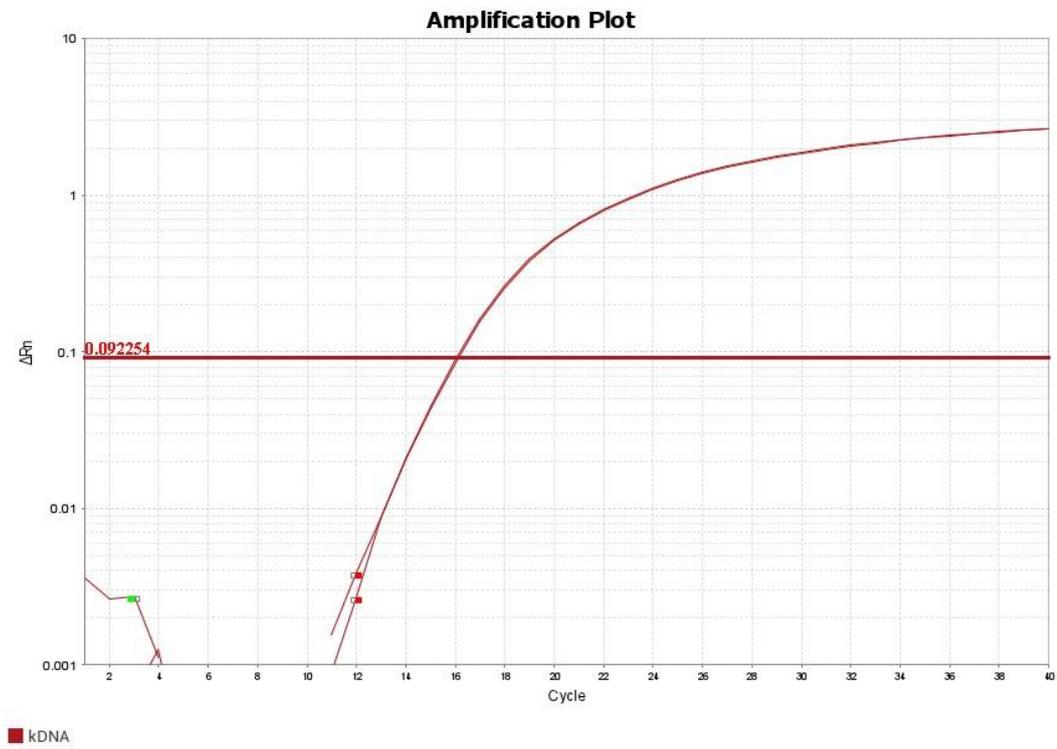
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 23- Gráfico de amplificação do kDNA da *Leishmania* referente a quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados tratados com 1x o valor da IC₅₀ do composto 3a.



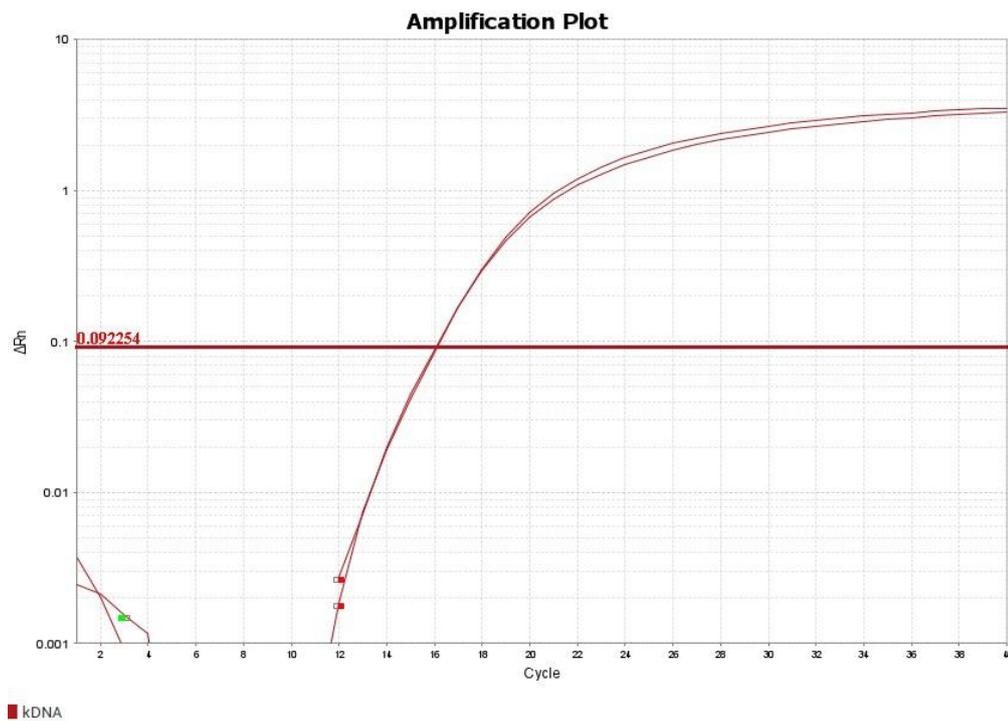
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 24- Gráfico de amplificação do kDNA da *Leishmania* referente a quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados tratados com 2x o valor da IC₅₀ do composto 3a.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Figura 25- Gráfico de amplificação do kDNA da *Leishmania* referente a quantificação da carga parasitária dos esferoides infectados tratados com 4x o valor da IC₅₀ do composto 3a.



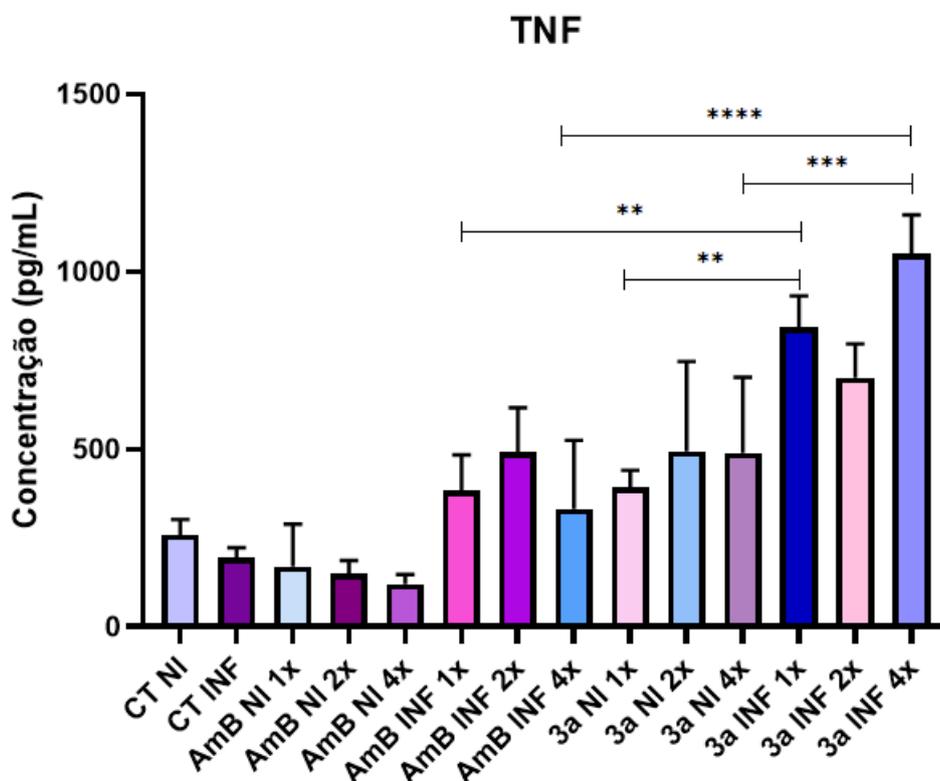
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

6.5 Produção de citocinas em sobrenadantes das culturas

As citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-6 e TNF), Th2 (IL-4 e IL-10) e Th17 (IL-17A) em sobrenadante dos esferoides foram avaliadas 48 horas após a incubação com a droga de referência (AmB) e o composto 3a, o qual se destacou nos testes de atividade leishmanicida e citotoxicidade para macrófagos, utilizando citometria de fluxo. Os resultados mostraram uma indução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1, especificamente TNF e IL-6 (Figuras 26 e 27).

Sobre a produção de TNF, na concentração de 1x IC₅₀, os esferoides infectados tratados com o composto 3a apresentaram uma produção de TNF significativamente maior do que os esferoides não infectados tratados com o mesmo composto ($p=0,0093$). Também foi observada uma indução duas vezes maior de TNF nos esferoides infectados tratados com 3a em comparação com aqueles tratados com AmB ($p=0,0072$). Na concentração de 2x IC₅₀, não houve diferenças estatisticamente significativas na produção de TNF entre os esferoides tratados com AmB e os tratados com 3a, tanto entre esferoides não infectados quanto para infectados. Por outro lado, na concentração de 4x IC₅₀, a produção de TNF foi novamente significativamente mais alta nos esferoides infectados tratados com o composto 3a em comparação com os esferoides não infectados tratados com o mesmo composto ($p=0,0006$). Além disso, a produção de TNF nos esferoides infectados tratados com 3a superou significativamente a dos esferoides tratados com AmB ($p < 0,0001$), sendo três vezes maior. Esses resultados sugerem que o composto 3a induz uma produção de TNF significativamente maior em esferoides infectados do que em esferoides não infectados e em comparação ao tratamento com AmB, especialmente nas concentrações mais altas do composto 3a (Figura 26).

Figura 26- Produção de TNF em esferoides dérmicos murinos não infectados (NI) e infectados (INF) tratados com os compostos AmB e 3a nas concentrações de 1x, 2x e 4x o valor da IC₅₀.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

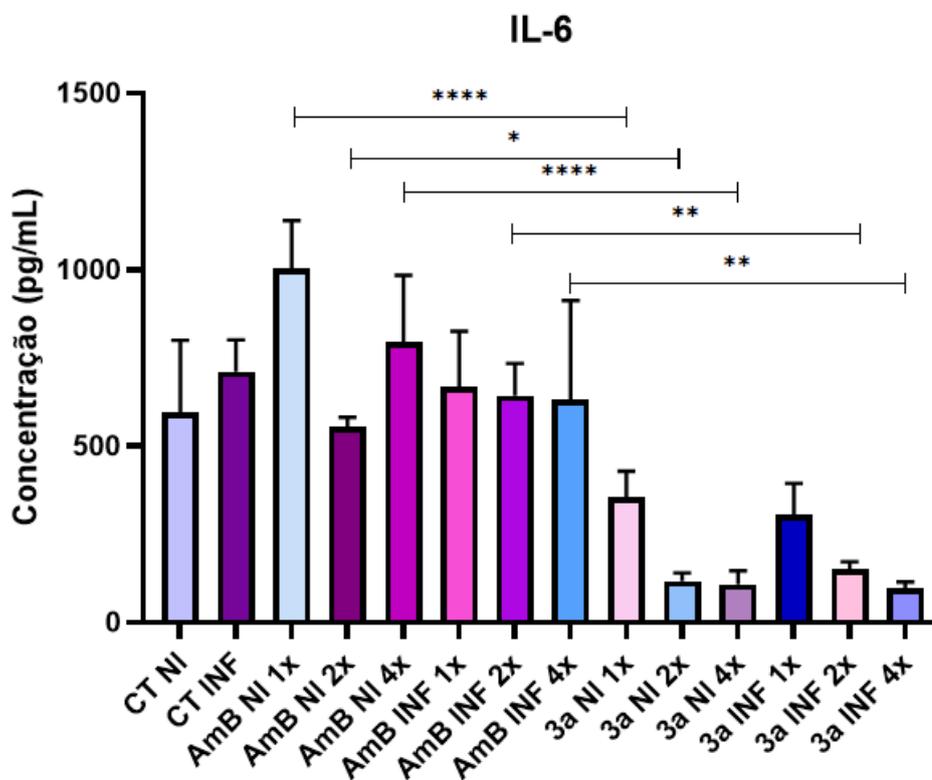
CT NI: Controle não infectado e sem tratamento / CT INF: Controle infectado e sem tratamento.

*: Significância estatística com um valor de $p < 0,05$; / **: Significância estatística com um valor de $p < 0,01$; / ***: Significância estatística com um valor de $p < 0,0001$.

Em relação à IL-6, foi observado que a AmB estimulou a maior produção dessa citocina. Nos esferoides não infectados, a produção de IL-6 foi significativamente maior em todas as concentrações testadas (1x IC₅₀ $p < 0,0001$; 2x IC₅₀ $p = 0,0163$; e 4x IC₅₀ $p < 0,0001$) quando comparada ao composto 3a, com a AmB induzindo níveis mais elevados de IL-6.

Nos esferoides infectados, observou-se que a AmB induziu uma maior produção de citocinas em todas as concentrações testadas. A diferença significativa foi observada apenas entre os esferoides tratados com AmB e com o composto 3a nas concentrações de 2x IC₅₀ ($p = 0,0044$) e 4x IC₅₀ ($p = 0,0015$). Nessas condições, a AmB induziu uma produção de IL-6 aproximadamente quatro vezes maior na concentração de 2x IC₅₀ e seis vezes maior na concentração de 4x IC₅₀ em comparação com o composto 3a (Figura 27).

Figura 27- Produção de IL-6 em esferoides dérmicos murinos não infectados (NI) e infectados (INF) tratados com os compostos AmB e 3a nas concentrações de 1x, 2x e 4x o valor da IC₅₀.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

CT NI: Controle não infectado e sem tratamento / CT INF: Controle infectado e sem tratamento.

*: Significância estatística com um valor de $p < 0,05$; / **: Significância estatística com um valor de $p < 0,01$; / ****: Significância estatística com um valor de $p < 0,0001$.

6.6 Produção de Óxido Nítrico (ON)

Os ensaios realizados de dosagem de óxido nítrico em sobrenadantes de culturas 2D e 3D com macrófagos J774 não infectados e infectados em monocultura ou em co-cultura com fibroblastos L929 indicaram que nenhum composto avaliado no estudo induziu a produção de ON por estas células em ambos os modelos (dados não mostrados).

7 DISCUSSÃO

A Leishmaniose cutânea é caracterizada por lesões cutâneas que podem levar a morbidade significativa, incluindo desfiguração e estigma social (Mokni, 2019). Embora a LC na maioria dos casos não seja fatal, seu tratamento apresenta desafios significativos devido às limitações das terapias atuais, incluindo efeitos colaterais, resistência e problemas de acesso. Pesquisas e desenvolvimento contínuos de novas opções de tratamento são essenciais para melhorar os resultados dos pacientes e reduzir o impacto da doença nas populações afetadas (Garza-Tovar *et al.*, 2020; Madusanka; Silva; Karunaweera, 2022).

Nos últimos anos, os estudos de interação parasita-hospedeiro na leishmaniose utilizando cultura de células 3D têm se mostrado uma ferramenta valiosa para a compreensão desses mecanismos, o que pode contribuir para influenciar o desenvolvimento de novas estratégias de profilaxia e terapia (Gabriel *et al.*, 2019).

A utilização dessa técnica para realização de estudos contribuiu positivamente para diversos achados na literatura. Através de estudos com modelos em 3D já se conseguiu observar a caracterização das diferentes formas do parasita (promastigotas e amastigotas) e a análise de suas interações com a matriz extracelular e células hospedeiras (macrófagos), bem como morte desses macrófagos infectados e o aumento da produção de citocinas inflamatórias, indicando uma resposta imune inflamatória típica da infecção por *Leishmania*. Além disso, esses modelos também já se mostraram úteis para testagem de drogas (Petropolis *et al.*, 2014; O’Keeffe *et al.*, 2020).

Um estudo com o modelo de leishmaniose visceral (LV) utilizando esferoides de células hepáticas para simular o ambiente *in vivo*, permitiu a análise precisa da interação entre o parasita e as células hepáticas. Este estudo forneceu *insights* valiosos sobre a resposta imune do fígado aos parasitas, contribuindo para uma melhor compreensão da patogênese da LV e abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias e intervenções mais eficazes contra essa doença (Rodrigues *et al.*, 2020).

Para a validação dos modelos de esferoides desenvolvidos nesse estudo, foram feitos ensaios em cultura 2D com as células que seriam utilizadas no modelo de esferoide dérmico imunocompetente e os compostos. Nesses ensaios, o composto 3a se mostrou menos tóxico e com uma maior seletividade para as formas

promastigotas da *L. amazonensis* do que para a cultura de macrófagos J774 e para a co-cultura dessas células com fibroblastos L929. Resultados semelhantes foram descritos por Silva e colaboradores (2021), onde esse mesmo composto demonstrou uma baixa toxicidade frente a macrófagos da linhagem RAW 264.7, também apresentando uma ótima seletividade para promastigotas da *L. amazonensis*. Esses resultados são promissores, uma vez que os macrófagos são as principais células hospedeiras do parasita, onde neles se transformam em amastigotas e proliferam (Bogdan, 2020; Chaparro *et al.*, 2022).

Nossos ensaios leishmanicidas também constataram a maior eficácia do composto 3a contra a forma promastigota da *L. amazonensis* entre os compostos testados. Porém, nas formas amastigotas, a droga de referência, a anfotericina B, se sobressaiu. Isso sugere que muitos compostos podem ter como alvo estágios específicos do ciclo de vida do parasita. Além disso, a localização intracelular das amastigotas dentro dos macrófagos pode representar uma barreira para muitos compostos (González *et al.*, 2021; Lamotte *et al.*, 2019). Por outro lado, a anfotericina B é conhecida por afetar a integridade da membrana celular direta ou indiretamente, sendo capaz de exercer ação antileishmania independente dos mecanismos parasiticidas (Vermeersch *et al.*, 2009).

Avaliar o potencial mitocondrial dos parasitas torna-se essencial nos ensaios leishmanicidas, uma vez que alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial do parasita podem levar à morte celular programada (Salomão *et al.*, 2013). No presente estudo, todos os compostos apresentaram ação sobre a diminuição do potencial da membrana mitocondrial dos parasitos. Essa característica torna-se de extrema importância, uma vez que os tripanossomatídeos possuem apenas uma mitocôndria, tornando esta organela um alvo potencial para drogas (dos Santos Aliança *et al.*, 2017).

Ademais, todos os compostos testados induziram morte celular por apoptose recente, especialmente em concentrações mais elevadas. Essa predominância de apoptose sobre necrose demonstra a eficácia dos compostos em promover morte celular programada, o que pode ser benéfico para reduzir a resposta inflamatória excessiva no hospedeiro, uma característica desejável em tratamentos antiparasitários (Rock; Kono, 2008; Sachet, Liang, Oehler, 2017).

No nosso estudo, construímos um modelo de esferoide dérmico imunocompetente murino que demonstrou uma manutenção da integridade estrutural

e das zonas proliferativas, sendo possível a visualização ao microscópio invertido mesmo após 96h de experimento. Isso sugere a robustez do modelo para servir em estudos de triagem de compostos terapêuticos, uma vez que as diferentes zonas podem ser usadas para avaliar o quão bem as drogas penetram e afetam as células (Griffin; Fok; Kent Leach, 2022). A presença de uma zona proliferativa é um fator importante para permitir a observação de como os tratamentos afetam as células em divisão ativa e a manutenção da sua integridade auxilia para que as respostas observadas durante os testes de drogas reflitam reações biológicas reais (Friedrich *et al.*, 2009; Hamilton; Rath, 2019).

Após a sua construção, o modelo de esferoides dérmicos imunocompetentes foi testado e validado frente a infecção por *Leishmania amazonensis*. Foi observada a capacidade do modelo à infecção pelo parasito. A introdução dos parasitos resultou em maior degradação dos esferoides e alteração na morfologia. Isso sugere a eficácia do esferoide murino construído em responder aos danos celulares causados pela infecção.

A perda celular devido a infecção já foi previamente demonstrada em estudos com esferoides de células de glioma infectados por reovírus, onde constataram que a infecção pode perturbar a integridade estrutural dos esferoides. Foi visto também que esferoides infectados tendem a diminuir de tamanho ao longo do tempo devido ao desprendimento de células mortas, indicando uma perda de coesão e viabilidade celular (Dautzenberg *et al.*, 2017). Outro exemplo descrito na literatura é a infecção de esferoides neurais pelo parasita *Toxoplasma gondii*. Os esferoides do estudo demonstraram uma alteração morfológica notável, apresentando uma diminuição de 42% do seu tamanho devido a perda da viabilidade celular causada pela infecção (Leite *et al.*, 2021).

Os esferoides infectados pela *L. amazonensis* foram tratados e usados para confirmar e avaliar a carga parasitária da infecção por meio da PCR em tempo real. O uso dessa técnica é de grande valia, pois permite quantificar o DNA do cinetoplasto da *Leishmania* spp., podendo atingir uma sensibilidade muito alta e permitindo a quantificação de baixas cargas parasitárias. Além do diagnóstico, essa técnica também pode ser usada para monitorar a carga parasitária em pacientes durante o tratamento e acompanhamento como uma forma de avaliar ou prever o resultado da terapia (Jara *et al.*, 2013; Castelli *et al.*, 2021). Sendo assim, através dessa metodologia foi possível relatar a maior eficácia do composto 3a em reduzir

consideravelmente a carga parasitária dos esferoides infectados. Reforçando tais resultados, estudos recentes destacaram a eficácia de derivados de tiazol contra patógenos como *Leishmania* e *Trypanosoma*, destacando a inibição efetiva da *L. amazonensis* e *T. cruzi in vitro* (Cruz Filho *et al.*, 2023).

Os resultados obtidos nos modelos 2D e 3D revelam diferenças marcantes na eficácia dos compostos testados, destacando a influência do microambiente tridimensional na resposta ao tratamento. No modelo 2D, a AmB demonstrou ser o composto mais eficaz contra os parasitas intracelulares, enquanto o 3a apresentou um potencial promissor, embora inferior à AmB. Por outro lado, no modelo 3D, o composto 3a mostrou eficácia significativamente superior, especialmente em concentrações elevadas, resultando em uma redução drástica da carga parasitária em comparação com a AmB. Essa discrepância pode ser atribuída à complexidade estrutural dos esferoides, que mimetizam melhor a arquitetura tecidual e promovem interações celulares mais realistas, refletindo com maior precisão a resposta *in vivo*. Além disso, a distribuição e penetração dos fármacos em um ambiente tridimensional diferem das observadas na cultura bidimensional, o que pode impactar a biodisponibilidade e a eficácia dos compostos (Białkowska *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2024). Dessa forma, a técnica dos esferoides se sobressai em relação ao modelo 2D ao recriar um microambiente mais fisiológico, permitindo uma avaliação mais precisa da ação dos fármacos. A diferença nos resultados entre os esferoides e as culturas 2D reforça essa vantagem, pois estudos demonstram que os esferoides replicam de maneira mais fiel as respostas biológicas observadas *in vivo*, tornando os resultados mais relevantes para estudos clínicos (Fang; Eglen, 2017; Tosca *et al.*, 2023).

Ademais, no presente trabalho buscou-se compreender o papel imunomodulador dos compostos testados, visando sua contribuição nos mecanismos imunológicos desenvolvidos na infecção pela *L. amazonensis* nos modelos de esferoides. Em relação à produção de citocinas nos modelos de esferoides não infectados e infectados tratados com o composto 3a e com AmB, observou-se que, dentre as citocinas avaliadas dos perfis Th1, Th2 e Th17, apenas IL-6 e TNF foram detectadas, ambas de caráter pró-inflamatório. A presença dessas citocinas sugere que as células imunes presentes no modelo estão respondendo à infecção por meio da ativação de mecanismos inflamatórios, visando o controle do parasita (Lacy & Stow, 2011; Zhang, 2007).

A produção de TNF foi observada de forma significativa pelo modelo após o tratamento com o composto 3a em comparação com a AmB (droga de referência). A indução dessa citocina é devida principalmente a macrófagos ativados e células T. Dessa forma, o TNF está envolvido na ativação dos macrófagos, aumentando a sua capacidade de matar os parasitas intracelulares (Scott; Novais, 2016). Nosso modelo contém macrófagos e acreditamos que eles participaram na produção de TNF observada.

Níveis aumentados de TNF têm sido associados à cura na leishmaniose cutânea, pois aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio e promovem a expressão da sintase de óxido nítrico induzível (iNOS), que é crucial para gerar óxido nítrico (ON). O ON é uma molécula efetora potente que ajuda a matar os parasitas dentro dos macrófagos, uma vez que pode interromper a respiração mitocondrial *da Leishmania*, induzindo naturalmente uma inativação metabólica letal, limitando a proliferação do parasita (Cabral *et al.*, 2021; Maspi, Abdoli, Ghaffarifar, 2016).

Um estudo destacou que o tratamento bem-sucedido na LC levou a uma diminuição posterior nos níveis de TNF, indicando que, embora a citocina seja benéfica para iniciar uma resposta imune, seus níveis se normalizam após um tratamento que resolva a infecção (Ribeiro-de-Jesus *et al.*, 1998). Assim, a presença da indução de uma alta produção de TNF durante a infecção ativa se correlaciona com um resultado positivo do tratamento para a doença, podendo contribuir para um efeito terapêutico mais eficaz.

Para mais, também foi avaliado a produção de ON em culturas 2D e 3D de macrófagos J774 e em co-cultura com L929 infectados e não infectados tratados com os compostos e não houve nenhuma indicação de produção significativa de ON dosados nos sobrenadantes de cultura destas células. Um estudo, nesse contexto de infecção, relatou que em macrófagos J774 infectados com *T. gondii*, esses se mostraram capazes de degradar a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que é crucial para a produção de NO, prejudicando assim a produção de NO durante a infecção (da Cruz Padrão *et al.*, 2014). Isso indica, portanto, que a linhagem J774 pode ter mecanismos regulatórios distintos que afetam a síntese de NO, e por isso, não foi observada tal produção no atual estudo. Além disso, o método de dosagem, o ensaio de Griess, apresenta um baixo limite de detecção, não conseguindo detectar baixas quantidades (Pinto *et al.*, 2020), o que pode ter sido um fator limitante no nosso estudo.

A IL-6 desempenha um papel complexo na leishmaniose cutânea, sendo uma citocina pró-inflamatória que influencia tanto a resposta imunológica quanto na inflamação (Maspi; Abdoli; Ghaffarifar, 2016). Os resultados do estudo mostram que, embora a IL-6 tenha sido uma das poucas citocinas detectadas, sua produção foi mais elevada nos esferoides tratados com Anfotericina B (AmB), tanto nos modelos não infectados quanto infectados. Por outro lado, o tratamento com o composto 3a resultou em uma redução significativa dos níveis de IL-6, sugerindo um possível efeito imunomodulador ou anti-inflamatório.

Os achados na literatura corroboram que a utilização da AmB na leishmaniose cutânea está associada a uma maior produção de IL-6, podendo indicar uma resposta inflamatória robusta. Isso pode ser benéfico para controlar a infecção inicial, porém, também pode resultar em inflamação crônica e agravamento das lesões cutâneas (Oryan; Bemani; Bahrami, 2023). Em contraste, o composto 3a, com menor indução de IL-6, sugere um perfil mais moderado na indução da mesma, o que pode ser vantajoso em termos de reduzir a inflamação excessiva e as complicações associadas à leishmaniose cutânea (Paiva *et al.*, 2021).

Neste estudo, conseguimos elaborar com sucesso esferoides dérmicos imunocompetentes murinos e infectá-los eficientemente com *L. amazonensis*. Testamos compostos piridina tiazóis promissores e investigamos em formas promastigotas os mecanismos de ação do composto mais promissor, que se mostrou predominantemente mitocondrial. Apresentamos os resultados da validação dos esferoides murinos dérmicos imunocompetentes infectados e o seu tratamento com AmB e o nosso composto escolhido (3a), com o objetivo de contribuir para pesquisas sobre a leishmaniose cutânea. Assim, vimos que esse modelo pode ser promissor para a testagem de drogas, revelando-se útil na avaliação da redução da carga parasitária e da imunomodulação frente aos compostos leishmanicidas. O desenvolvimento deste protótipo visa facilitar futuros estudos e desempenhar um papel importante na avaliação de medicamentos menos tóxicos e mais eficazes para o tratamento da doença.

8 CONCLUSÕES

- a) Elaboramos, de maneira bem-sucedida, esferoides dérmicos imunocompetentes, vendo a manutenção da sua integridade, morfologia e compactação ao longo dos experimentos;
- b) Ocorreu a infecção dos esferoides com a *L. amazonensis* de maneira eficiente, sendo observada uma leve degradação ao longo dos seis dias de experimento;
- c) Em modelos 2D, o composto 3a se mostrou menos tóxico e com uma maior seletividade para promastigotas da *L. amazonensis* do que para a cultura de macrófagos J774 e para a co-cultura dessas células com fibroblastos L929;
- d) O composto 3a foi o que mais se destacou entre os demais com o melhor valor de IC₅₀ para as formas promastigotas em comparação as drogas de referência (AmB e Sb III);
- e) Todos os compostos demonstraram diminuição no potencial mitocondrial nos parasitos tratados;
- f) Todos os compostos apresentaram morte celular nas formas promastigotas da *L. amazonensis* por apoptose recente, com a apoptose tardia e necrose praticamente inexistente.
- g) O composto 3a apresentou uma diminuição mais efetiva da carga parasitária nos esferoides infectados em comparação com a AmB;
- h) Sobre a capacidade imunomoduladora avaliada em sobrenadantes de culturas 3D de esferoides infectados e não infectados após o tratamento com os compostos 3a e AmB, foi possível observar a detecção de citocinas associadas a um perfil de resposta pró-inflamatória (TNF e IL-6), algo que pode ser considerado positivo na busca por novas drogas leishmanicidas tendo em vista que este perfil de resposta auxilia para progressão de cura da doença. Quanto a produção de ON, sua produção não foi observada;
- i) A utilização de esferoides dérmicos imunocompetentes no presente trabalho forneceu uma perspectiva promissora para avaliação de compostos testados, reforçando seu potencial como ferramenta de triagem para auxiliar o desenvolvimento de novas terapias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Zaid Nsaif et al. Comparative analysis between 2D and 3D colorectal cancer culture models for insights into cellular morphological and transcriptomic variations. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 18380, 2023.

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

ABU AMMAR, Aiman et al. Amphotericin B-loaded nanoparticles for local treatment of cutaneous leishmaniasis. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 9, p. 76-84, 2019.

ACHILLI, Toni-Marie; MEYER, Julia; MORGAN, Jeffrey R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. **Expert opinion on biological therapy**, v. 12, n. 10, p. 1347-1360, 2012.

AFEWERKI, Samson et al. Gelatin-polysaccharide composite scaffolds for 3D cell culture and tissue engineering: towards natural therapeutics. **Bioengineering & translational medicine**, v. 4, n. 1, p. 96-115, 2019.

ALQAHTANI, Alaa M.; BAYAZEED, Abrar A. Synthesis and antiproliferative activity studies of new functionalized pyridine linked thiazole derivatives. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 102914, 2021.

ALVES, Emanuele Amorim et al. Cultivo celular.

ANTONI, Delphine et al. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 3, p. 5517-5527, 2015.

ARAUJO FLORES, Gabriela Venicia et al. Th17 lymphocytes in atypical cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Central America. **Parasite immunology**, v. 42, n. 11, p. e12772, 2020.

ARBOLEDA, Margarita et al. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with intralesional meglumine antimoniate: A case series. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. e20180211, 2019.

ASHRAFMANSOURI, Marzieh et al. Utility of western blot analysis for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Iranian journal of parasitology**, v. 10, n. 4, p. 599, 2015.

BARBOSA, Mélanie AG et al. 3D cell culture models as recapitulators of the tumor microenvironment for the screening of anti-cancer drugs. **Cancers**, v. 14, n. 1, p. 190, 2021.

BECKER, Ingeborg et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 130, n. 2, p. 65-74, 2003.

BERA, Pradip et al. Instigating the in vitro anticancer activity of new pyridine–thiazole-based Co (III), Mn (II), and Ni (II) complexes: synthesis, structure, DFT, docking, and MD simulation studies. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 62, n. 6, p. 1437-1457, 2022. BERGERS, Lambert IJC et al. Immune-competent human skin disease models. **Drug discovery today**, v. 21, n. 9, p. 1479-1488, 2016.

BIAŁKOWSKA, Kamila et al. Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 17, p. 6225, 2020.

BILODEAU, Ann. The Pros and Cons of Adherent Versus Suspension Cell Culture. **Biopharm International**, v. 37, n. 1, p. 18–22-18–22, 2024.

BODENBERGER, Nicholas et al. A novel cheap and easy to handle protein hydrogel for 3D cell culture applications: a high stability matrix with tunable elasticity and cell adhesion properties. **ChemistrySelect**, v. 1, n. 7, p. 1353-1360, 2016.

BOGDAN, Christian. Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in leishmaniasis: Impact of tissue micro-environment and metabolism. **Cytokine: X**, v. 2, n. 4, p. 100041, 2020.

BOLLE, Eleonore CL et al. An in vitro reconstructed human skin equivalent model to study the role of skin integration around percutaneous devices against bacterial infection. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 670, 2020.

BRASIL, M. DA S. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. [s.l.: s.n.].

BRELAZ-DE-CASTRO, Maria Carolina Accioly et al. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. **Cellular Immunology**, v. 279, n. 2, p. 180-186, 2012.

BRELAZ-DE-CASTRO, Maria Carolina Accioly et al. Combination of flow cytometry and qPCR to study the immune response of american cutaneous leishmaniasis patients. **Microbial pathogenesis**, v. 123, p. 433-439, 2018.

BRESLIN, Susan; O'DRISCOLL, Lorraine. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 18, n. 5-6, p. 240-249, 2013.

BRITO, F. F. DE et al. Estudo clínico, epidemiológico e imunológico para leishmaniose tegumentar americana em centro de referência em dermatologia. **Hansen. int**, v. 40, n. 1, p. 17–24, 2015.

BUZANOVSKY, Lia Puppim et al. Major environmental and socioeconomic determinants of cutaneous leishmaniasis in Brazil—a systematic literature review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. e20190291, 2020.

CABRAL, Fernanda V. et al. Nanopartículas de quitosana liberadoras de óxido nítrico para tratamento eficaz da leishmaniose cutânea. **Nitric Oxide**, v. 113, p. 31-38, 2021.

CALEFFI, Juliana Trindade et al. Magnetic 3D cell culture: State of the art and current advances. **Life Sciences**, v. 286, p. 120028, 2021.

CACCIAMALI, Andrea; VILLA, Riccardo; DOTTI, Silvia. 3D cell cultures: Evolution of an ancient tool for new applications. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 836480, 2022.

CARMICHAEL, Samuel et al. Variable bites and dynamic populations; new insights in Leishmania transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. e0009033, 2021.

CARVALHO, A. K. et al. Differential recruitment of dendritic cells subsets to lymph nodes correlates with a protective or permissive T-cell response during Leishmania (Viannia) braziliensis or Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. **Mediators of inflammation**, v. 2016, 2016.

CARVALHO, Sílvia H. et al. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 4, p. 380-391, 2019.

CASTELLI, Germano et al. Molecular diagnosis of leishmaniasis: quantification of parasite load by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Pathogens**, v. 10, n. 7, p. 865, 2021.

CAVALCANTE, M. K. de A. et al. Individuals in an endemic region for Leishmania braziliensis 8 display lower levels of CD45RO in T cells. *Research, Society and Development*, v. 11, p. 1–9, 2022.

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

CHAPARRO, Visnu et al. Transcriptional profiling of macrophages reveals distinct parasite stage-driven signatures during early infection by Leishmania donovani. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 6369, 2022.

CHAU, David YS et al. The development of a 3D immunocompetent model of human skin. **Biofabrication**, v. 5, n. 3, p. 035011, 2013.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, Miguel Angel et al. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 235-242, 2015.

CHUA, Adeline CY et al. Hepatic spheroids used as an in vitro model to study malaria relapse. **Biomaterials**, v. 216, p. 119221, 2019.

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

CONCEIÇÃO-SILVA, Fatima; MORGADO, Fernanda N. Leishmania spp-host interaction: there is always an onset, but is there an end?. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 330, 2019.

COSTA, Elisabete C. et al. Spheroids formation on non-adhesive surfaces by liquid overlay technique: Considerations and practical approaches. **Biotechnology journal**, v. 13, n. 1, p. 1700417, 2018.

COUTO, Daíne Vargas et al. American tegumentary leishmaniasis-a case of therapeutic challenge. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, p. 974-976, 2014.

CRUZ FILHO, Iranildo José DA et al. Synthesis of 4-(4-chlorophenyl) thiazole compounds: in silico and in vitro evaluations as leishmanicidal and trypanocidal agents. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 95, n. 1, p. e20220538, 2023.

CUNHA, Clarissa F. et al. Contribution of Leishmania braziliensis antigen-specific CD4+ T, CD8+ T, NK and CD3+ CD56+ NKT cells in the immunopathogenesis of cutaneous leishmaniasis patients: Cytotoxic, activation and exhaustion profiles. **PLoS One**, v. 15, n. 3, p. e0229400, 2020.

DA CRUZ PADRÃO, Juliana et al. Toxoplasma gondii infection of activated J774-A1 macrophages causes inducible nitric oxide synthase degradation by the proteasome pathway. **Parasitology international**, v. 63, n. 5, p. 659-663, 2014.

DAUTZENBERG, Iris JC et al. Baculovirus-assisted reovirus infection in monolayer and spheroid cultures of glioma cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17654, 2017.

DAVISON-KOTLER, Evan et al. A universal classification system of skin substitutes inspired by factorial design. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 24, n. 4, p. 279-288, 2018.

DE DIOS-FIGUEROA, Guadalupe Tonantzin et al. 3d cell culture models in covid-19 times: A review of 3D technologies to understand and accelerate therapeutic drug discovery. **Biomedicines**, v. 9, n. 6, p. 602, 2021.

DE FREITAS E SILVA, Rafael; VON STEBUT, Esther. Unraveling the role of immune checkpoints in leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 620144, 2021.

DE MENEZES, Juliana Perrone; SARAIVA, Elvira M.; DA ROCHA-AZEVEDO, Bruno. The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & vectors**, v. 9, p. 1-8, 2016.

de Oliveira, V. V. G., de Souza, M. A. A., Cavalcanti, R. R. M., de Oliveira Cardoso, M. V., Leite, A. C. L., da Silva Junior, V. A., & de Figueiredo, R. C. B. Q. Study of in vitro biological activity of thiazoles on Leishmania (Leishmania) infantum. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, 414-421, 2020.

DE OLIVEIRA, Vinícius Vasconcelos Gomes et al. Study of in vitro biological activity of thiazoles on *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 414-421, 2020.

DE SOUZA, Natalie. Organoids. **Nature Methods**, v. 15, n. 1, p. 23-23, 2018.
DE VRIES, Henry JC; SCHALLIG, Henk D. Cutaneous leishmaniasis: a 2022 updated narrative review into diagnosis and management developments. **American journal of clinical dermatology**, v. 23, n. 6, p. 823-840, 2022.

DECARLI, Monize Caiado et al. Cell spheroids as a versatile research platform: Formation mechanisms, high throughput production, characterization and applications. **Biofabrication**, v. 13, n. 3, p. 032002, 2021.

DI CAPRIO, Nikolas; BURDICK, Jason A. Engineered biomaterials to guide spheroid formation, function, and fabrication into 3D tissue constructs. **Acta biomaterialia**, v. 165, p. 4-18, 2023.

DIAS, L. R. S. et al. Synthesis, in vitro evaluation, and SAR studies of a potential antichagasic 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine series. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 1, p. 211–219, 2007.

DINC, Rasit. New developments in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 15, n. 5, p. 196-205, 2022.

DIXIT, Keerti Kaumudee; SINGH, Ruchi; SALOTRA, Poonam. Advancement in molecular diagnosis of post kala-azar dermal leishmaniasis. **Indian journal of dermatology**, v. 65, n. 6, p. 465-472, 2020.

DOS SANTOS ALIANÇA, Amanda Silva et al. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 1-10, 2017.

DOS SANTOS SILVA, Vanessa Nunes et al. Considerations about leishmaniasis and the current scenario for the development of new treatments. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 50, n. 4, p. 255-264, 2021.

DUBIE, Teshager et al. Review on the role of host immune response in protection and immunopathogenesis during cutaneous leishmaniasis infection. **Journal of immunology research**, v. 2020, 2020.

DUVAL, Kayla et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 266-277, 2017.

EL FEKY, Shaymaa Essam et al. Cytotoxic, chemosensitizing and radiosensitizing effects of curcumin based on thioredoxin system inhibition in breast cancer cells: 2D vs. 3D cell culture system. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 21, n. 5, p. 506, 2021.

- EL HARANE, Sanae et al. Cancer spheroids and organoids as novel tools for research and therapy: state of the art and challenges to guide precision medicine. **Cells**, v. 12, n. 7, p. 1001, 2023.
- ESHETU, B.; MAMO, H. Cutaneous leishmaniasis in north-central Ethiopia: trend, clinical forms, geographic distribution, and determinants. *Trop Med Health*. 2020; 48 (1): 39 [em linha].
- FABRINO, Henrique JF et al. Multivariate Optimization Applied to the Synthesis of Meglumine Antimoniate with Low Levels of Trivalent Antimony. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 8, p. 1568-1574, 2021.
- FANG, Ye; EGLIN, Richard M. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. **Slas discovery: Advancing Life Sciences R&D**, v. 22, n. 5, p. 456-472, 2017.
- FEDER-MENGUS, Chantal et al. New dimensions in tumor immunology: what does 3D culture reveal?. **Trends in molecular medicine**, v. 14, n. 8, p. 333-340, 2008.
- FOGLIETTA, Federica et al. Methodological aspects and pharmacological applications of three-dimensional cancer cell cultures and organoids. **Life sciences**, v. 254, p. 117784, 2020.
- FONTOURA, Julia C. et al. Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. **Materials Science and Engineering: C**, v. 107, p. 110264, 2020.
- FRÉZARD, Frédéric et al. Liposomal amphotericin B for treatment of leishmaniasis: from the identification of critical physicochemical attributes to the design of effective topical and oral formulations. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 99, 2022.
- FRIEDRICH, Juergen et al. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature protocols**, v. 4, n. 3, p. 309-324, 2009.
- GABRIEL, Áurea et al. Cutaneous leishmaniasis: the complexity of host's effective immune response against a polymorphic parasitic disease. **Journal of immunology research**, v. 2019, n. 1, p. 2603730, 2019.
- GAITÁN-SALVATELLA, Iñigo et al. Case report: formation of 3D osteoblast spheroid under magnetic levitation for bone tissue engineering. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, p. 672518, 2021.
- GARZA-TOVAR, Talissa F. et al. An overview of the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Faculty Reviews**, v. 9, 2020.
- GERBER, Peter Arne et al. The top skin-associated genes: a comparative analysis of human and mouse skin transcriptomes. **Biological chemistry**, v. 395, n. 6, p. 577-591, 2014.
- GONG, Xue et al. Generation of multicellular tumor spheroids with microwell-based agarose scaffolds for drug testing. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0130348, 2015.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, Suênia da C. et al. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 292165, 2017.

GONZÁLEZ, Myriam et al. New diarylsulfonamide inhibitors of *Leishmania infantum* amastigotes. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 16, p. 45-64, 2021.

GRIFFIN, Katherine H.; FOK, Shierly W.; KENT LEACH, J. Strategies to capitalize on cell spheroid therapeutic potential for tissue repair and disease modeling. **NPJ Regenerative Medicine**, v. 7, n. 1, p. 70, 2022.

GUIMARAES, Ana Paula Pereira et al. SpheroMold: modernizing the hanging drop method for spheroid culture. **Frontiers in Drug Delivery**, v. 4, p. 1397153, 2024.

GUREL, Mehmet Salih; TEKIN, Burak; UZUN, Soner. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. *Clinics in dermatology*, v. 38, n. 2, p. 140-151, 2020.

HABANJAR, Ola et al. 3D cell culture systems: tumor application, advantages, and disadvantages. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 22, p. 12200, 2021.

HAGOS, Binega; ZERIHUN, Zenawi. Retraction Note: 'Self-stigma' of people with cutaneous leishmaniasis the unrecognized one: what do we think; what do we know; what can we prove?. **International Journal for Equity in Health**, v. 23, 2024.

HAMILTON, Gerhard; RATH, Barbara. Role of circulating tumor cell spheroids in drug resistance. **Cancer Drug Resistance**, v. 2, n. 3, p. 762, 2019.

HAVLIKOVA, Jana et al. Direct identification of bacterial and human proteins from infected wounds in living 3D skin models. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 11900, 2020.

HENRIQUE, Rafaella BL et al. Advances in the study of spheroids as versatile models to evaluate biological interactions of inorganic nanoparticles. **Life Sciences**, v. 302, p. 120657, 2022.

HONG, Ahyun et al. One health approach to leishmaniasis: understanding the disease dynamics through diagnostic tools. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 809, 2020.

HUSAIN, Asif et al. A review on alternative methods to experimental animals in biological testing: recent advancement and current strategies. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 15, n. 4, p. 165-171, 2023.

JARA, Marlene et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1826-1833, 2013.

JENSEN, Caleb; TENG, Yong. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture?. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 7, p. 33, 2020.

JIAN, Honglei et al. 3D bioprinting for cell culture and tissue fabrication. **Bio-Design and Manufacturing**, v. 1, p. 45-61, 2018.

JIAO, Qian et al. Skin homeostasis: Mechanism and influencing factors. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 23, n. 5, p. 1518-1526, 2024.

JOSHI, Mahika et al. Modulatory role of vitamins A, B3, C, D, and E on skin health, immunity, microbiome, and diseases. **Pharmacological Reports**, v. 75, n. 5, p. 1096-1114, 2023.

JUAREZ-MORENO, Karla et al. Monolayer (2D) or spheroids (3D) cell cultures for nanotoxicological studies? Comparison of cytotoxicity and cell internalization of nanoparticles. **Toxicology in Vitro**, v. 85, p. 105461, 2022.

JÚNIOR, L. F. E. F.; COSTA, G. N. J.; DONATO, E. L. et. al. Leishmaniose Tegumentar. In.: **Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde**. v. 50, 2019.

KAPALCZYŃSKA, Marta et al. 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. **Archives of Medical Science**, v. 14, n. 4, p. 910-919, 2018.

KAPPES, Mona et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted cell seeding: magnetic patterning and magnetic 3D cell culture. **Advanced Functional Materials**, v. 32, n. 50, p. 2203672, 2022.

KAYE, Paul M. et al. Leishmaniasis immunopathology—impact on design and use of vaccines, diagnostics and drugs. In: **Seminars in immunopathology**. Springer Berlin Heidelberg, 2020. p. 247-264.

KEVRIC, Ines; CAPPEL, Mark A.; KEELING, James H. New world and old world Leishmania infections: a practical review. **Dermatologic clinics**, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015.

KHIDRE, Rizk E.; RADINI, Ibrahim Ali M. Design, synthesis and docking studies of novel thiazole derivatives incorporating pyridine moiety and assessment as antimicrobial agents. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 7846, 2021.

KITISIN, T. et al. Utilization of an in vitro biofabricated 3D skin as a pathological model of cutaneous candidiasis. **New Microbiologica**, v. 43, n. 4, p. 171–179, 2020.

KNIGHT, Chinyere A. et al. Leishmaniasis: Recent epidemiological studies in the Middle East. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1052478, 2023.

LACY, Paige; STOW, Jennifer L. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 118, n. 1, p. 9-18, 2011.

LAMOTTE, Suzanne et al. Discovery of novel hit compounds with broad activity against visceral and cutaneous Leishmania species by comparative phenotypic screening. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 438, 2019.

LANGHANS, Sigrid A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 334617, 2018.

LEE, Jia Min; YEONG, Wai Yee. Design and printing strategies in 3D bioprinting of cell-hydrogels: A review. *Advanced healthcare materials*, v. 5, n. 22, p. 2856-2865, 2016.

LEITE, Paulo Emilio Correa et al. Morphological and biochemical repercussions of Toxoplasma gondii infection in a 3D human brain neurospheres model. **Brain, Behavior, & Immunity-Health**, v. 11, p. 100190, 2021.

LESSA, J. A. et al. Antimony(III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones: Structural studies and investigation on the antitrypanosomal activity. *Polyhedron*, v. 30, n. 2, p. 372–380, 2011.

LINQUEST, Lauren A. et al. Successful Treatment of Cutaneous Leishmaniasis With Cryotherapy. **Cureus**, v. 15, n. 7, 2023.

LIU, Dan; CHEN, Sixun; WIN NAING, May. A review of manufacturing capabilities of cell spheroid generation technologies and future development. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 118, n. 2, p. 542-554, 2021.

LÓPEZ, Liliana et al. A phase II study to evaluate the safety and efficacy of topical 3% amphotericin B cream (Anfoleish) for the treatment of uncomplicated cutaneous leishmaniasis in Colombia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006653, 2018.

LORÍA-CERVERA, Elsy Nalleli; ANDRADE-NARVAEZ, Fernando. The role of monocytes/macrophages in Leishmania infection: A glance at the human response. **Acta tropica**, v. 207, p. 105456, 2020.

MA, Xiao; WANG, Feifei; WANG, Bo. Application of an in vitro reconstructed human skin on cosmetics in skin irritation tests. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 20, n. 6, p. 1933-1941, 2021.

MABONI, Grazieli et al. A novel 3D skin explant model to study anaerobic bacterial infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 404, 2017.

MACHADO, Paulo RL et al. Disseminated Leishmaniasis, a Severe Form of Leishmania braziliensis Infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 30, n. 3, p. 510, 2024.

MADUSANKA, Rajamanthrilage Kasun; SILVA, Hermali; KARUNAWEEERA, Nadira D. Treatment of cutaneous leishmaniasis and insights into species-specific responses: a narrative review. **Infectious diseases and therapy**, v. 11, n. 2, p. 695-711, 2022.

- MANN, Sarah et al. A review of leishmaniasis: current knowledge and future directions. **Current tropical medicine reports**, v. 8, p. 121-132, 2021.
- MARTIN-MONTES, Alvaro et al. Synthesis and in vitro leishmanicidal activity of novel [1, 2, 3] triazolo [1, 5-a] pyridine salts. **RSC advances**, v. 7, n. 26, p. 15715-15726, 2017.
- MASPI, Nahid; ABDOLI, Amir; GHAFFARIFAR, Fathemeh. Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and global health**, v. 110, n. 6, p. 247-260, 2016.
- MARQUES, Inês Alexandra et al. Magnetic-based human tissue 3D cell culture: a systematic review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 12681, 2022.
- MATHES, Stephanie H.; RUFFNER, Heinz; GRAF-HAUSNER, Ursula. The use of skin models in drug development. **Advanced drug delivery reviews**, v. 69, p. 81-102, 2014.
- MATTIX, Brandon et al. Biological magnetic cellular spheroids as building blocks for tissue engineering. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 623-629, 2014.
- MELO, Maria Gabriella Nunes de et al. Clinical and epidemiological profiles of patients with American cutaneous leishmaniasis from the states of Pernambuco and Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. e20200083, 2020.
- MESA, Luz Estella et al. Test accuracy of polymerase chain reaction methods against conventional diagnostic techniques for Cutaneous Leishmaniasis (CL) in patients with clinical or epidemiological suspicion of CL: Systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected Tropical diseases**, v. 14, n. 1, p. e0007981, 2020.
- MIRZAEI, Asad et al. A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. **Cytokine**, v. 145, p. 155297, 2021.
- MOKNI, M. Leishmanioses cutanées. In: **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**. Elsevier Masson. p. 232-246, 2019.
- MORALES-PRIMO, Abraham U. et al. Th17 Cell and Inflammatory Infiltrate Interactions in Cutaneous Leishmaniasis: Unraveling Immunopathogenic Mechanisms. **Immune Network**, v. 24, n. 2, 2024.
- MOREIRA, Vanessa Ribeiro et al. Meglumine antimoniate (Glucantime) causes oxidative stress-derived DNA damage in BALB/c mice infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 10.1128/aac. 02360-16, 2017.
- MORGAN, M. S.; ARLIAN, L. G. Response of human skin equivalents to *Sarcoptes scabiei*. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 5, p. 877–883, 2010.

MOUTTAKI, Tarik et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative *Leishmania* species in Morocco by using three PCR-based assays. **Parasites & vectors**, v. 7, p. 1-9, 2014.

MOYSIDOU, Chrysanthi-Maria; BARBERIO, Chiara; OWENS, Róisín Meabh. Advances in engineering human tissue models. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 620962, 2021.

NEVES, Leandro Ourives et al. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, p. 1092-1101, 2011.

NIEHUES, Hanna et al. 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. **Experimental dermatology**, v. 27, n. 5, p. 501-511, 2018.

NIEVA, CA Briones et al. An appraisal of the scientific current situation and new perspectives in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 221, p. 105988, 2021.

NUWANGI, Hasara et al. Stigma associated with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 12, p. e0011818, 2023.

OLIVEIRA, B. C. et al. American tegumentary leishmaniasis and flow cytometry: a review. **J Med Microb Diagn**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2016.

ORYAN, Ahmad; BEMANI, Effat; BAHRAMI, Somayeh. Atividade antileishmania, imunomoduladora e antioxidante da quercetina contra leishmaniose cutânea causada por *Leishmania major*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 13, n. 1, p. 26-34, 2023.

OUALLA-BACHIRI, Wasima et al. From grafts to human bioengineered vascularized skin substitutes. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 21, p. 8197, 2020.

PAIVA, Milla B. et al. A cytokine network balance influences the fate of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in a cutaneous leishmaniasis hamster model. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 656919, 2021.

PACAKOVA, Lenka et al. Three types of *Leishmania mexicana* amastigotes: Proteome comparison by quantitative proteomic analysis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1022448, 2022.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Manual of procedures for surveillance and control of leishmaniasis in the Americas. [s.l.: s.n.].

PARK, Chan Hum; PARK, Jung Ho; SUH, Yong Joon. Perspective of 3D culture in medicine: transforming disease research and therapeutic applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, p. 1491669, 2024.

Pearson, R. D., & de Queiroz Sousa, A. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical infectious diseases*, 1-11, 1996.

PEARSON, R. D.; QUEIROZ SOUSA, A. de. Leishmania species: visceral (kala-azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. 1990.

PELLEVOISIN, Christian; BOUEZ, Charbel; COTOVIO, José. Cosmetic industry requirements regarding skin models for cosmetic testing. In: **Skin Tissue Models**. Academic Press, 2018. p. 3-37.

PETROPOLIS, Debora B. et al. Leishmania amazonensis promastigotes in 3D Collagen I culture: an in vitro physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions. **PeerJ**, v. 2, p. e317, 2014.

PIYASIRI, Satchee Bhanu et al. Diagnostic Tools for Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania donovani: A Narrative Review. **Diagnostics**, v. 13, n. 18, p. 2989, 2023.

PLANZ, Viktoria; LEHR, Claus-Michael; WINDBERGS, Maike. In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 89-104, 2016.

POPOV, L. et al. Three-dimensional human skin models to understand Staphylococcus aureus skin colonization and infection. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. FEB, p. 1–7, 2014.

PRADHAN, Swetalina et al. Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and experimental dermatology**, v. 47, n. 3, p. 516-521, 2022.

PUPOVAC, A. et al. Toward Immunocompetent 3D Skin Models. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 12, p. 1–11, 2018.

PUPOVAC, Aleta et al. Toward immunocompetent 3D skin models. **Advanced healthcare materials**, v. 7, n. 12, p. 1701405, 2018.

REDDY, M. Sai Bhargava et al. A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds. **Polymers**, v. 13, n. 7, p. 1105, 2021.

REIMÃO, Juliana Quero et al. Laboratory diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis: current and future methods. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1632, 2020.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 31, p. 143-148, 1998.

RIBEIRO, Luiz Carlos; SANTOS, Carlos; BENCHIMOL, Marlene. Is Trichomonas tenax a parasite or a commensal?. **Protist**, v. 166, n. 2, p. 196-210, 2015.

ROCK, Kenneth L.; KONO, Hajime. The inflammatory response to cell death. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 3, n. 1, p. 99-126, 2008.

RODRIGUES, Armanda V. et al. 3D-hepatocyte culture applied to parasitology: Immune activation of canine hepatic spheroids exposed to *Leishmania infantum*. **Biomedicines**, v. 8, n. 12, p. 628, 2020.

RODRÍGUEZ, Matías Exequiel et al. Transmigration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes through 3D cultures resembling a physiological environment. **Cellular microbiology**, v. 22, n. 8, p. e13207, 2020.

RUEDINGER, Ferdinand et al. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, p. 623-636, 2015.

RUIZ, J. H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 29, n. 12, p. 671-678, 2007.

SACHET, Monika; LIANG, Ying Yu; OEHLER, Rudolf. The immune response to secondary necrotic cells. **Apoptosis**, v. 22, n. 10, p. 1189-1204, 2017.

SAIDI, Nasreddine et al. Clinical and immunological spectra of human cutaneous leishmaniasis in North Africa and French Guiana. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1134020, 2023.

SALARI, Samira et al. A novel rapid LAMP test for identification of cutaneous leishmaniasis: an evaluation and comparative analysis of three molecular methods. **Microbial Pathogenesis**, v. 169, p. 105612, 2022.

SALDANHA, Maíra G. et al. Characterization of the histopathologic features in patients in the early and late phases of cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 96, n. 3, p. 645, 2017.

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

SALINAS-VERA, Yarely M. et al. Three-dimensional 3D culture models in gynecological and breast cancer research. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 826113, 2022.

SALOMÃO, Kelly et al. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogues. **BMC microbiology**, v. 13, p. 1-13, 2013.

SAMPAIO, Raimunda Nonata Ribeiro et al. Successful treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n. 05, p. 602-604, 2021.

SANDLE, T.; CHESCA, A.; ABDULINA, G. Fundamentals of cell culture. **Медицина и экология**, n. 1 (98), p. 60-69, 2021.

- SANTIAGO, Alexandre Silva et al. Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: A narrative review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, 2021.
- SARKARI, Bahador et al. Performance of an ELISA and indirect immunofluorescence assay in serological diagnosis of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2014, 2014.
- SCOTT, Phillip; NOVAIS, Fernanda O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016.
- SEMLIN, Lydia et al. In vitro models for human skin disease. **Drug discovery today**, v. 16, n. 3-4, p. 132-139, 2011.
- SEVERINO, Patrícia et al. Cutaneous/mucocutaneous leishmaniasis treatment for wound healing: classical versus new treatment approaches. **Microbiology Research**, v. 13, n. 4, p. 836-852, 2022.
- SHAO, Changmin et al. Development of cell spheroids by advanced technologies. **Advanced Materials Technologies**, v. 5, n. 9, p. 2000183, 2020.
- SHIRZADI, Mohammad Reza. Liposomal amphotericin B: a review of its properties, function, and use for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Research and reports in tropical medicine**, p. 11-18, 2019.
- SILVA, Vanessa Nunes dos Santos. Avaliação in vitro da atividade leishmanicida, citotoxicidade e capacidade imunomoduladora de novas piridinas tiazóis. 2021. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.
- SILVA, Rosiana Estéfane da et al. Intralesional meglumine antimoniate for the treatment of localised cutaneous leishmaniasis: a retrospective review of a Brazilian referral centre. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, p. 512-516, 2016.
- SOUZA, Marina A. et al. American tegumentary leishmaniasis: mRNA expression for Th1 and Treg mediators are predominant in patients with recent active disease. **Immunobiology**, v. 221, n. 2, p. 253-259, 2016.
- STANTON, Diana Nicole et al. Bioengineered efficacy models of skin disease: advances in the last 10 years. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 2, p. 319, 2022.
- SUN, Hui; ZHANG, Yi-Xuan; LI, Yu-Mei. Generation of skin organoids: Potential opportunities and challenges. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 3176, 2021.
- SUN, Miao et al. 3D cell culture—can it Be as popular as 2D cell culture?. **Advanced NanoBiomed Research**, v. 1, n. 5, p. 2000066, 2021.

TEIXEIRA, Vanessa Cristina et al. Miltefosina no tratamento da Leishmaniose Tegumentar: eficácia e limitações da primeira terapia oral autorizada no Brasil. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 4, p. 17261-17272, 2023.

TEPE, Ugur; ASLANBAY GULER, Bahar; IMAMOGLU, Esra. Applications and sensory utilizations of magnetic levitation in 3D cell culture for tissue Engineering. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 8, p. 7017-7025, 2023.

TIWARI, Neeraj et al. Leishmaniasis control: Limitations of current drugs and prospects of natural products. In: **Discovery and development of therapeutics from natural products against neglected tropical diseases**. Elsevier, 2019. p. 293-350.

TOSCA, Elena M. et al. Replacement, reduction, and refinement of animal experiments in anticancer drug development: the contribution of 3D in vitro cancer models in the drug efficacy assessment. **Biomedicines**, v. 11, n. 4, p. 1058, 2023.

UENO, Norikiyo; WILSON, Mary E. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. *Trends in parasitology*, v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012.

URZÌ, Ornella et al. Three-dimensional cell cultures: the bridge between in vitro and in vivo models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, p. 12046, 2023.

V. PINTO, Rosana et al. A comparison of different approaches to quantify nitric oxide release from NO-releasing materials in relevant biological media. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2580, 2020.

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

VASELEK, Slavica et al. Comparative study of promastigote-and amastigote-initiated infection of Leishmania infantum (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Phlebotomus perniciosus (Diptera: Psychodidae) conducted in different biosafety level laboratories. **Journal of medical entomology**, v. 57, n. 2, p. 601-607, 2020.

VÉLEZ, Iván D. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in Colombia: report of 27 cases. **Case reports in dermatology**, v. 7, n. 3, p. 275-286, 2015.

VERJANS, Eddy-Tim et al. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort?. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 4, p. 2993-3003, 2018.

VERMEERSCH, Marieke et al. In vitro susceptibilities of Leishmania donovani promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3855-3859, 2009.

VIDAL, S. E. L. et al. 3D biomaterial matrix to support long term, full thickness, immuno-competent human skin equivalents with nervous system components. *Biomaterials*, v. 198, p. 194–203, 2019.

VIG, Komal et al. Advances in skin regeneration using tissue engineering. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 4, p. 789, 2017.

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

WALOCHNIK, J. et al. Anti-Acanthamoeba efficacy and toxicity of miltefosine in an organotypic skin equivalent. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 64, n. 3, p. 539–545, 2009. WAMAI, Richard G. et al. Visceral leishmaniasis: a global overview. *Journal of Global Health Science*, v. 2, n. 1, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> . Acesso em: 24 fev. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epidemiological situation. Disponível em: https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniasis_cl_2022.png?sfvrsn=c86f628a_3 . Acesso em: 24 mar. 2024.

WORTMANN, Glenn et al. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 83, n. 5, p. 1028, 2010. XIE, Renjian et al. A comprehensive review on 3D tissue models: Biofabrication technologies and preclinical applications. *Biomaterials*, p. 122408, 2023.

XU, Fiona Xi et al. Assessing drug uptake and response differences in 2D and 3D cellular environments using stimulated Raman scattering microscopy. *Analytical Chemistry*, v. 96, n. 36, p. 14480-14489, 2024.

YASMIN, Hadida et al. Host–pathogen interaction in leishmaniasis: immune response and vaccination strategies. *Immuno*, v. 2, n. 1, p. 218-254, 2022.

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

ZHANG, Jun-Ming; AN, Jianxiong. Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHANG, Zheng; MICHNIAK-KOHN, Bozena B. Tissue engineered human skin equivalents. *Pharmaceutics*, v. 4, n. 1, p. 26-41, 2012.

ZHAO, Chongbei. Cell culture: in vitro model system and a promising path to in vivo applications. *Journal of Histotechnology*, v. 46, n. 1, p. 1-4, 2023.

ZHAO, Zixuan et al. Organoids. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 2, n. 1, p. 94, 2022.

APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR DOS CONTROLES QUE DELIMITARAM OS GATES DA CITOMETRIA DE FLUXO

Figura 28- Controles sem tratamento e sem marcação

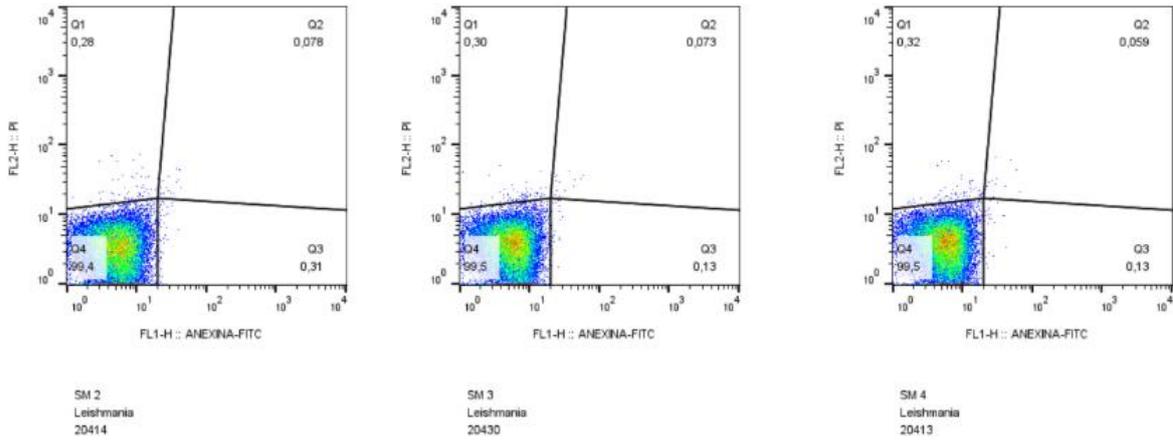


Figura 29- Controles sem tratamento e marcados apenas com Anexina V

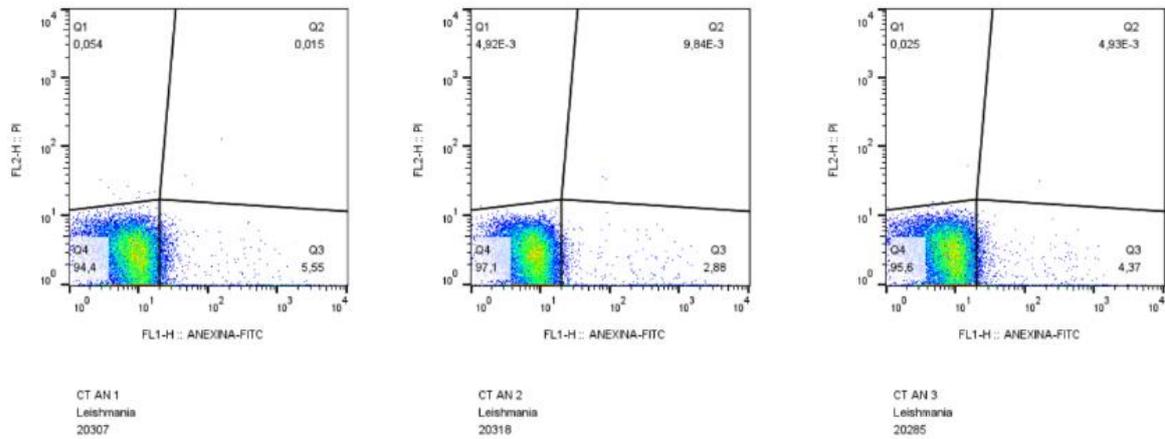


Figura 30- Controles sem tratamento e marcados apenas com Iodeto de Propídeo

