

UNIVERSIDADE PAULISTA

**PROGRAMA DE DOUTORADO EM PATOLOGIA
AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**AVALIAÇÃO DE CO-CULTURAS DE MACRÓFAGOS
E *LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS* APÓS O TRATAMENTO
DE PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

FABIANA RODRIGUES DE SANTANA

**SÃO PAULO
2016**

UNIVERSIDADE PAULISTA

**PROGRAMA DE DOUTORADO EM PATOLOGIA
AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**AVALIAÇÃO DE CO-CULTURAS DE MACRÓFAGOS
E *LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS* APÓS O TRATAMENTO
DE PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Leoni Villano Bonamin

FABIANA RODRIGUES DE SANTANA

SÃO PAULO

2016

Santana, Fabiana Rodrigues de.

Avaliação de co-culturas de macrófagos e *Leishmania (L.) amazonensis* após o tratamento de preparações homeopáticas / Fabiana Rodrigues de Santana. - 2016.

87 f. : il. color.

Dissertação de Doutorado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Patologia Experimental.

Orientadora: Prof^a Dr.^a Leoni Villano Bonamin.

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Fabiana Toshie Konno.

1. *Leishmania (L.) amazonensis*. 2. *Antimonium crudum*. 3. Homeopatia. 4. Modelo experimental. I. Bonamin, Leoni Villano (orientadora). II. Konno, Fabiana Toshie (co-orientadora). III. Título.

FABIANA RODRIGUES DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DE CO-CULTURAS DE MACRÓFAGOS
E *LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS* APÓS O TRATAMENTO
DE PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

BANCA EXAMINADORA:

Aprovada em: ____/____/____

ORIENTADORA:

Prof.^a Dr.^a Leoni Villano Bonamin
Universidade Paulista-UNIP

Prof.^a Dr.^a Márcia Dalastra Laurenti
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP

Prof. Dr. Nilson Benites
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo -
FMVZ-USP

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Perez Hurtado
Universidade Paulista - UNIP

Prof.^a Dr.^a Maria Anete Lallo
Universidade Paulista- UNIP

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Maria Esperança Rodrigues de Santana e João Soares de Santana, e a minha irmã Carla Rodrigues de Santana, que sempre me apoiaram em minhas escolhas e estiveram presentes em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo 2014/00967-1) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROSUP) por todo o financiamento deste projeto.

À Prof.^a Dr.^a Márcia Dalastra Laurenti, do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50) do Departamento de Patologia da FMUSP, pela disponibilização de parasitas *Leishmania (L.) amazonensis* contribuindo com conhecimento na área das leishmanioses.

À Prof.^a Dr.^a Dorly Buchi e Msc Kátia Fialho, pela Universidade Federal do Paraná-UFPR, pelos cursos e ensinamentos em cultura celular e Microscopia de Varredura.

Aos professores Dr. Nilson Benites (FMVZ-USP) e Dr.^a Cidéli Coelho (UNISA), pelos conceitos e prática experimental em homeopatia.

Às professoras da Pós-graduação da UNIP, Dr.^a Elizabeth Perez Hurtado e Dr.^a Maria Anete Lallo, pelo aprendizado em imunologia e parasitologia, respectivamente.

À Dr.^a Fabiana Toshie de Camargo Konno, responsável técnica do laboratório de Biologia Molecular da UNIP, pela dedicação e paciência em ensinar, na prática diária, as técnicas de cultura celular.

Aos funcionários do laboratório de Biologia Molecular da UNIP, pelo apoio técnico e amizade, Suzana Bezerra e Cleide Santana.

Ao Prof. Dr. Renato Casarin, de Odontologia, e Michelle Sanchez de Aguiar, responsável técnica do laboratório de Odontologia da UNIP, pela dosagem de citocinas.

À aluna de pós-doutorado Dr.^a Anuska Marcelino Alvares Saraiva da UNIP, pelo auxílio nas dosagens de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico.

Aos meus amigos alunos da UNIP, Juan Justino de Araujo Neves e Luciane Costa Dalboni por toda a ajuda, essencial para a finalização deste projeto, e Renata Iovine por nos ajudarmos nas várias repetições do trabalho.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Leoni Villano Bonamin pela UNIP, por me ensinar a gostar de homeopatia e ver na pesquisa algo nunca estacionário, sempre inovador.

RESUMO

A leishmaniose é uma das doenças negligenciadas podendo ocorrer na forma tegumentar ou visceral. Este projeto visa esclarecer os mecanismos deflagrados por medicamentos homeopáticos em co-cultura de macrófagos e *Leishmania (L.) amazonensis in vitro*. Os tratamentos foram realizados com *Antimonium crudum* (AC) nas potências 30 cH e 200 cH em 2, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação. A metodologia utilizada para avaliar a interação macrófago, leishmania e medicamentos homeopáticos foi: área celular e fagocitose por meio da coloração por Giemsa, ensaio de liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, ensaio imune-enzimático pelo método MAGPIX®, microscopia de fluorescência, microscopia eletrônica de varredura e imuno-citoquímica. Os resultados mostraram diminuição da área de macrófagos tratados com AC 30 cH em 2h ($p<0.05$) e aumento após tratamento com AC 200 cH ($p<0.05$) em 48 horas, em conjunto com aumento da porcentagem de fagocitose ($p<0.05$). A produção de citocinas IL-6, IL-12p40, MIP-1 β e IFN- γ foi reduzida nas células infectadas e tal redução foi potencializada após o tratamento com AC 30 cH ($p<0.05$) e 200 cH ($p<0.05$) no período de 48 horas. Na fase crônica, o VEGF apresentou grande aumento após tratamento com AC 200 cH ($p<0.05$) em 72 e 96 horas. A citocina RANTES apresentou diminuição nos grupos tratados com AC 200 cH ($p<0.05$) e AC 30 cH ($p<0.05$), nos períodos de 72 e 96 horas. Na microscopia de fluorescência, houve redução de vacúolos ácidos em macrófagos tratados com AC 30 cH após 2 horas de incubação seguido de aumento no número de promastigotas livres no sobrenadante em 24 horas ($p<0.05$), indicando redução no ritmo de internalização dos parasitas. A microscopia eletrônica de varredura não mostrou diferença entre os grupos em relação à adesão parasita-macrófago. Na marcação para B7-2 (CD86) houve aumento de positividade nas células infectadas (controle) e no grupo tratado com AC 30 cH ($p<0.05$) em 72 horas, mas não nas células tratadas com AC 200 cH. Os resultados mostram os mecanismos modulatórios de macrófagos infectados e tratados com AC 30cH que poderiam justificar as mudanças observadas previamente na relação parasito-hospedeiro após o tratamento de camundongos com este medicamento. Também mostraram o efeito facilitador da polarização M1-M2 de macrófagos após o tratamento com AC 200 cH, cujo papel terapêutico poderia ser importante como modulador da fase crônica da infecção.

Palavras-chave: Leishmaniose, Homeopatia, *Antimonium crudum*, Macrófagos.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease that can occur in cutaneous or visceral forms. This project aims to clarify the mechanisms of homeopathic treatment on the co-culture of macrophages and *Leishmania (L.) amazonensis* *in vitro*. The treatments were conducted with *Antimonium crudum* (AC) 30 cH and 200cH and cells were evaluated at 2, 24, 48, 72, 96 and 120 hours after infection. The methodology used was cell area measurement and phagocytosis by Giemsa staining, hydrogen peroxide and nitric oxide release measurement, immunoenzymatic test by MAGPIX® method, fluorescence microscopy, scanning electron microscopy and immunocytochemistry. The results showed reduction of macrophages area treated with AC 30 cH ($p < 0.05$) and increase following the treatment with AC 200 cH ($p < 0.05$) within 48 hours, together with increase in the percentage of phagocytosis ($p < 0.05$). The production of IL-6, IL-12p40, MIP-1 β and IFN- γ in infected cells was reduced, being this effect potentiated after the treatment with AC 30 cH ($p < 0.05$) and 200 cH ($p < 0.05$), also within 48 hours. In the chronic phase, VEGF has greatly increased after treatment with AC 200 cH ($p < 0.05$) at 72 and 96 hours. RANTES showed a decrease in AC 200 cH ($p < 0.05$) and AC 30 cH ($p < 0.05$) treated groups, after 72 and 96 hours. In fluorescence microscopy, there was a reduction of acids vacuoles in macrophages treated with AC 30 cH after 2 hours of incubation, followed by increase in the number of free promastigotes in the supernatant, at 24 hours ($p < 0.05$), indicating reduction of the internalization rate of the parasites. The scanning electron microscopy showed no difference among groups with respect to parasite-macrophage adhesion. Immune-positivity for B7-2 (CD86) increased in infected cells (control) and in the group treated with AC 30 cH ($p < 0.05$) at 72 hours, but not in cells treated with AC 200cH. The results showed the modulatory mechanisms of macrophages infected and treated with AC 30cH that could justify the changes previously observed in the host-parasite relationship after treatment of mice with this medicine. They also showed the facilitating effect of the M1-M2 polarization of macrophages after treatment with AC 200cH, which could be important as a modulator of the chronic phase of infection.

Keywords: Leishmaniasis, Homeopathy, *Antimonium crudum*, Macrophages.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Área de macrófagos (pixels) e índice fagocítico de macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania (L.) amazonensis* tratados com AC 30 cH (#) e 200 cH (*), nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. *#p<0.05, Kruskal Wallis/Dunn, em relação ao controle24
- Figura 2 – A) Número de promastigotas livres no sobrenadante, após 24 horas de co-cultura entre macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania (L.) amazonensis*, e tratados com AC 30 cH e 200 cH. B) Porcentagem de promastigotas positivas para Anexina em 100 células, após 24 horas. Valores representam média e desvio padrão. *p<0.05; ANOVA, Tuckey- Kramer, comparado ao controle25
- Figura 3 – Dosagem de citocinas (IL-1 α e IL-1 β) em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com AC 30 cH (#) e 200 cH (*), nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. *#p<0.05 Kruskal-Wallis/Dunn, em relação ao controle25
- Figura 4 – Dosagem de citocina IL-6 em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com AC 30 cH (#) e 200 cH (*), nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. *p<0.05 e #p<0.05, Tuckey-Kramer, em relação ao controle não infectado.26
- Figura 5 – Dosagem de citocina RANTES em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com AC 30 cH (#) e 200 cH (*), nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. *p<0.05 e #p <0.05, Kruskal-Wallis / Dunn, em relação ao controle não infectado26
- Figura 6 – Dosagem de citocinas IL-12p40 e IL-12p70 em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com AC 30 cH (#) e 200 cH (*), nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. *p<0.05 e #p <0.05, Kruskal-Wallis / Dunn, em relação ao controle não infectado27

Figura 7 – Dosagem de citocinas MIP-1 β (CCL4) e IFN- γ em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> tratadas com AC 30 cH (#) e 200 cH (*), nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. *p<0.05 e #p <0.05, Kruskal-Wallis / Dunn, em relação ao controle não infectado	28
Figura 8 – Dosagem de mediadores anti-inflamatórios IL-10 e VEGF em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> tratadas com AC 30 cH (#) e 200 cH (*), nos tempos de 2, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. *p<0.05 Kruskal-Wallis / Dunn, em relação ao controle	28
Figura 9 – Dosagem de citocinas (GMSF) em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW e <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> tratadas com AC 30cH e 200 cH, nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão *#p>0.05 Kruskal-Wallis / Dunn, em relação ao controle	29
Figura 10 – Dosagem de MCP-1 (CCL2) em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> tratadas com AC 30.cH e 200 cH, nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. *#p>0.05 Kruskal-Wallis / Dunn, em relação ao controle. Não houve diferença estatística entre os grupos	30
Figura 11 – Contagem de células positivas para CD86 por campo microscópico, após 24 e 48 horas de co-cultura entre macrófagos RAW e <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , na presença de 20% de AC 30 cH e 200 cH. *p $\leq$ 0,05 em relação ao controle não infectado. ANOVA, Tuckey- Kramer	30
Figura 12 – Morfologia de células mantidas em co-cultura com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , coradas pelo alaranjado de acridina e pela coloração de Giemsa. Os tempos analisados correspondem à fase aguda, 2, 24 e 48 horas, respectivamente	32
Figura 13 – Morfologia de células mantidas em co-cultura com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> , coradas pelo alaranjado de acridina e pela coloração de Giemsa. Os tempos analisados correspondem à fase crônica, 120 horas, respectivamente. Na última linha, as figuras representam as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), no tempo de 30 minutos.....	33
Figura 14 – Número de células gigantes por campo, após 72 e 120 horas de co-cultura entre macrófagos RAW e <i>L. amazonensis</i> , na presença de 20% de AC 30 e 200 cH. **p $\leq$ 0,05 e ***p $\leq$ 0,05 em relação ao controle, ANOVA, Tuckey- Kramer	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	10
1.1 Leishmaniose: epidemiologia, clínica e aspectos imunológicos	10
1.2 O tratamento para a leishmaniose	13
2 OBJETIVO	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Preparação dos medicamentos	18
3.2 Protocolo de co-cultura de macrófagos e <i>Leishmania amazonensis</i>	18
3.3 Coloração por Giemsa	19
3.4 Análise do espraçamento, da fagocitose e do número de células multinucleadas por campo	19
3.5 Ensaio de Liberação de Peróxido de Hidrogênio	20
3.6 Ensaio de produção de Óxido Nítrico	20
3.7 Ensaio Imunoenzimático para dosagem de citocinas	21
3.8 Microscopia de Fluorescência e análise morfológica	21
3.9 Contagem de promastigotas não internalizados e análise de apoptose	21
3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura	22
3.11 Avaliação imunocitoquímica e atividade apresentadora de antígenos	22
3.12 Análise de células positivas para imuno-histoquímica	23
3.13 Análise Estatística	23
4 RESULTADOS	24
4.1 Incidência de células gigantes multinucleadas	34
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXO	50

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Leishmaniose: epidemiologia, clínica e aspectos imunológicos

Os protozoários *Leishmania* spp. localizam-se em macrófagos teciduais residentes para sua replicação intracelular. Esses protozoários causam um grupo heterogêneo de doenças negligenciadas subtropicais e tropicais conhecidas como leishmanioses, com ampla sintomatologia, desde lesões cutâneas a leishmaniose visceral fatal (MURRAY *et al.*, 2005). O parasita tem uma alternância de ciclo de vida entre um hospedeiro mamífero e insetos vetores, os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae, subfamília Phlebotominae), dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, sendo os vetores de espécies distintas de *Leishmania* (KILLICK, 1999).

Cerca de 95% dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ocorrem nas Américas, Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Mais de dois terços dos novos casos de leishmaniose cutânea ocorrem em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria. Estima-se que de 0,7 milhões a 1,3 milhões de novos casos ocorram em todo o mundo anualmente (WHO, 2015).

Ao analisar a evolução da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil, observa-se sua expansão geográfica. No início da década de 80 foram registrados casos autóctones em 19 unidades federativas e no ano de 2003, foi confirmada autoctonia em todas as unidades federativas do país. No período de 1991 a 2010, a LTA apresentou média anual de 27.374 casos registrados e coeficiente de detecção médio de 16,4 casos por 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). A Amazônia apresenta atualmente cerca de metade dos 20 mil casos anuais registrados de leishmaniose tegumentar no país. O número de casos aumentou igualmente com o processo de colonização e de exploração florestal (GUERRA *et al.*, 2006; KATSURAGAWA *et al.*, 2008). Adicionalmente, verifica-se o processo de expansão e urbanização em diferentes espécies de *Leishmania* spp (CARVALHO *et al.*, 2015; DRUZIAN *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015).

As formas clínicas de LTA caracterizam-se como leishmaniose cutânea e mucocutânea, podendo ser uma úlcera cutânea localizada, ou nódulos dérmicos indolores na forma de lesões mucocutâneas com ulceração da orofaringe (HANDLER *et al.*, 2015). Uma das espécies causadoras da LTA é a *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, sendo que há registros de felinos e cães domésticos

como portadores desta espécie de parasita (SOUZA *et al.*, 2005; TOLEZANO *et al.*, 2007). Outras espécies de leishmaniose tegumentar diagnosticadas em animais domésticos é a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (FIGUEIREDO *et al.*, 2009; MASSUNARI *et al.*, 2009; HEUSSER-JUNIOR *et al.*, 2010). Adicionalmente, há relato de co-infecção de leishmaniose tegumentar e visceral em cães, através do método de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) a partir de fragmentos de lesões cutâneas, pele, linfonodo cervical e baço (PIRES *et al.*, 2014).

No contexto da resposta imune, os fatores que predisõem à resolução ou permanência da infecção envolvem desde o sistema imune do hospedeiro (SOUZA *et al.*, 2016; GOLLOB *et al.*, 2015) até a espécie do parasita (CARVALHO *et al.*, 2016; FALCÃO *et al.*, 2016), além dos padrões possíveis de relação entre a célula hospedeira e o parasita (CARNEIRO *et al.*, 2015).

Após o reconhecimento do parasita, os macrófagos são ativados em células efectoras, podendo fagocitar e destruir o parasita através da geração do *burst* oxidativo e produção de óxido nítrico (ASSCHE *et al.*, 2011). Em estudo para avaliar o efeito do óxido nítrico em pacientes com leishmaniose cutânea acometidos com *Leishmania (V.) braziliensis*, verificou-se que houve aumento da viabilidade do parasita após tratamento com um inibidor de espécies reativas de oxigênio (CARNEIRO *et al.*, 2016).

Os receptores de superfície dos fagócitos servem de porta de entrada para estes parasitas e podem interferir no desfecho da fagocitose. HSIAO e colaboradores, em 2011, demonstraram que diferentes tipos de macrófagos, como a célula monocítica da linhagem U937, são capazes de permitir a replicação celular e a disseminação celular de *Leishmania infantum chagasi* após 72 horas de incubação, enquanto que os macrófagos derivados de cultura primária de monócito humano (MDM) não apresentaram o mesmo efeito. A expressão de CR3 foi maior nestes últimos em relação aos primeiros, o que sugere que a entrada dos parasitas via receptor de opsonina dificulta a sua sobrevivência no interior do fagócito (HSIAO *et al.*, 2011).

A infecção por *Leishmania* spp induz a produção de citocinas pelas células infectadas, induzindo o recrutamento celular local e diferenciação celular (KIMA *et al.*, 2014). O perfil de resposta compreende também a imunidade adaptativa, assim, na estimulação de linfócitos CD4⁺ do tipo Th1 há produção de IL-1, IL-2, IL-12, INF- γ e TNF- α para promover a ativação do macrófago e a eliminação do parasita. No

caso de estimulação Th2, as citocinas envolvidas são IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, inibindo a ativação do macrófago e contribuindo para a sobrevivência do parasita (AWASTHI *et al.*, 2004). Neste contexto, há a influência das citocinas na dicotomia de resposta imune e sintomas na leishmaniose (OKWOR *et al.*, 2016; SCOTT *et al.*, 2016). Como exemplo, camundongos *knockout* (KO) após infecção com *Leishmania major*, e tratamento com rIL-12, apresentaram resolução das lesões cutâneas e controle da replicação parasitária (OKWOR *et al.*, 2015). A proteína de IL-12p70, é um heterodímero que consiste de subunidades p35 e p40, sendo que a falta dessas duas subunidades de IL-12 afeta a resposta imune contra o parasita, bem como o controle e cura da infecção (MATTNER *et al.*, 2004). Esta citocina também é envolvida na sinalização intracelular por via tirosina quinase de Janus (JAK). Camundongos TyK2^{-/-} desenvolveram lesões mais severas com aumento da carga parasitária na pele, linfonodo e baço (SCHLEIDER *et al.*, 2004), evidenciando a influência do parasita em fatores de transcrição envolvidos em sinalização pró-inflamatória.

Outras citocinas induzem efeito anti-inflamatório, como a IL-10. Após o tratamento de células mononucleares *in vitro* provenientes de pacientes com leishmaniose cutânea (*Leishmania braziliensis*) com o anticorpo anti-IL-10, observou-se diminuição de TNF- α , mesmo em pacientes com lesões ativas (CASTELLANO *et al.*, 2015). Em outro estudo, a partir de células sanguíneas de cães acometidos com *Leishmania infantum*, verificou-se aumento de INF- γ em amostras obtidas de animais com sinais clínicos moderados, além de redução de parasitemia e aumento de IL-10 após tratamento com antígenos de *Leishmania* spp. (GALLEGO *et al.*, 2016).

Em estudo similar, Leal e co-autores (2014) demonstraram resultados com aumento do número de linfócitos T e seus subtipos (CD4⁺ e CD8⁺) em cães assintomáticos infectados com *Leishmania infantum* (soronegativos para ELISA e positivos para PCR), bem como aumento de INF- γ no sobrenadante de cultura, a partir de material colhido de animais assintomáticos (soropositivos para ELISA). Outras citocinas também são importantes, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Lesões em camundongos BALB/c que apresentam expressão de HIF-1 α e HIF-2 α no citoplasma dos macrófagos não promovem qualquer expressão de VEGF, ao passo que camundongos C57BL/6 obtiveram acumulação nuclear de HIF-2 α e subsequente expressão de VEGF, evidenciando efeitos diversos sobre o

VEGF em função de diferentes modelos experimentais de leishmaniose (ARAÚJO *et al.*, 2012). Em estudo realizado por Mukhopadhyay *et al.* (2015), verificou-se que monócitos de pacientes com leishmaniose visceral (*Leishmania donovani*) apresentavam diminuição na expressão de TLR-4⁺, TLR-2⁺, NO, e nos níveis de IL-1 β , IL-6 e IL-8, levando a uma polarização de resposta M2.

1.2 O tratamento para a leishmaniose

Com relação à terapêutica, os antimoniais pentavalentes são os primeiros medicamentos de escolha para o tratamento de leishmaniose cutânea (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Em estudo, pacientes portadores de leishmaniose cutânea tratados com antimônio pentavalente (Glucantime®) por 3 semanas mostraram aumento de citocinas inflamatórias (KOCYIGITK *et al.*, 2002), indicando efeito imunomodulador desse medicamento, além de efeito parasiticida. Porém, a resistência medicamentosa também tem sido relatada com o uso de antimônio, podendo ser uma resistência primária, devido a sub-doses terapêuticas ou, ainda, ao tratamento com duração mais curta do que o recomendado (SUNDAR *et al.*, 2000; TUON *et al.*, 2008). Além disso, diversos efeitos colaterais são relatados: dor muscular esquelética, náusea, vômito, diarreia, dor abdominal, cefaleia, anorexia, astenia, fadiga, febre, exantema, eritema e urticária (BAILEY *et al.*, 2007).

Medicamentos adicionais são usados para o tratamento da leishmaniose, como a anfotericina B, mas sua toxicidade e resistência também são os principais motivos para o insucesso do tratamento (MISHRA *et al.*, 2007). Outros medicamentos, como Paromomicina, Miltefosina e Pentamidina (SUNDAR *et al.*, 2015; SUNDAR *et al.*, 2016) são recomendados, sendo que o agente pró-apoptótico Miltefosina foi recentemente autorizado para uso veterinário no Brasil pelos Ministérios da Saúde (MS) e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (CRMV, 2016). Além disso, dados recentes indicam também a eficácia de drogas antimaláricas como mefloquina e cloroquina (MWOLOLO *et al.*, 2015), que induzem redução de infecção em macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis*, além da diminuição da lesão e da carga parasitária em camundongos (ROCHA *et al.*, 2013).

Face aos efeitos colaterais e à resistência terapêutica do tratamento convencional, cresce o uso de tratamentos de medicina complementar para várias

doenças, entre elas a leishmaniose. No universo da medicina complementar, os medicamentos homeopáticos são largamente usados em vários países, como Brasil, Índia, México, Cuba. São preparados por diluições sequenciais seguidas de agitação ritmada, podendo atingir concentrações tão baixas que ultrapassam a constante de Avogadro (6×10^{23}). No Brasil, o uso da homeopatia no Sistema Único de Saúde (SUS) segue as diretrizes do Plano Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Outros países, como a Índia, já adotam a homeopatia populacional de forma abrangente. Neste país, com o início da Missão Nacional de Saúde Rural (MNSR), em 2005, surgiu o conceito de "Integração da AYUSH (Aiurveda, Uoga, Unani, Siddha e Homeopatia) e Revitalização de Tradições Locais de Saúde", em que a homeopatia integraria a política de gestão dos problemas de saúde da comunidade, quando adequadamente implementada (SINGH *et al.*, 2013; SAMAL, 2015).

O uso da homeopatia foi preconizado por Samuel Hahnemann desde 1796 (ADLER *et al.*, 1996; TEIXEIRA, 2006), com base no princípio Hipocrático da similitude. Entende-se que a aplicação deste princípio pode desempenhar um papel importante na regulação neuro-imuno-endócrina (BONAMIN *et al.*, 2010; BELLAVITE *et al.*, 2012; ENDLER *et al.*, 2015). Foi proposto que os medicamentos homeopáticos carregam sinais específicos de natureza física (SCHULTE *et al.*, 2015) que agiriam como gatilho para “ligar” ou “desligar” alguns genes relevantes, iniciando uma cascata de ação gênica para alterar, balancear ou corrigir vias de sinalização celular, as quais estariam alteradas em certas condições patológicas (SAHA *et al.*, 2015; MONDAL *et al.*, 2016).

Trabalhos atuais desenvolvidos em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* mostram a atividade de diversos medicamentos homeopáticos no desenvolvimento de diversas doenças parasitárias (PEREIRA *et al.*, 2005; DE ALMEIDA *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2013; ALEIXO *et al.*, 2014), sendo fator preponderante a atividade dos mesmos sobre a modulação da resposta imune, em especial sobre macrófagos, por meio do aumento dos níveis de IFN- γ , IL-5, e do metabolismo oxidativo envolvendo o aumento da atividade oxidase (NADPH) e de óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2006; DE OLIVERA *et al.*, 2008; BURBANO *et al.*, 2009; SMIT *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2012).

O uso de bioterápicos (medicamentos homeopáticos preparados a partir do próprio agente infeccioso) na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* leva à

maior sobrevivência de camundongos, com diminuição do parasitismo tecidual e dos níveis de TGF- β circulantes, independentemente da parasitemia (SANDRI *et al.*, 2015). Alterações do hemograma também são observadas nesses casos: há aumento dos valores de hemoglobina e hematócrito após 12 dias de infecção e redução do número de linfócitos após 8 dias (FERRAZ *et al.*, 2014). O uso de bioterápico também foi estudado em infecção experimental por *Leishmania (V.) braziliensis* em camundongos, quando administrado por via oral e intraperitoneal, no período de 90 dias. Os animais tratados com o bioterápico na potência 200 cH apresentaram lesões de menor tamanho quando comparado aos demais grupos (30 cH, 30 dH e 200 dH) (PONTIN *et al.*, 2013). Um estudo clínico-epidemiológico realizado em humanos sobre Chikungunya, demonstrou melhoria dos sintomas e interrupção de analgésicos e antipiréticos após a administração de *Byronia alba* e *Rhus toxicodendron* (WADHWANI *et al.*, 2013).

Em estudos prévios realizados *in vivo* pelo nosso grupo também foi verificada a ação de medicamentos homeopáticos na modulação da diferenciação e da migração de macrófagos na lesão induzida por *L. amazonensis*. Camundongos tratados com Timulina 5 cH apresentaram maior diferenciação de células B-1 em macrófagos e organização granulomatosa da lesão primária (SANTANA *et al.*, 2014a). As células B-1 são mais aptas a internalizar parasitas do gênero *Leishmania* que os macrófagos derivados da medula óssea (GERALDO *et al.*, 2016). Por outro lado, os animais tratados com *Antimonium crudum* 30 cH apresentaram resposta imune adaptativa predominantemente humoral, com predomínio de linfócitos B2 esplênicos, menor quantidade de macrófagos no sítio da infecção e maior quantidade de parasitas na forma livre, no local ou no tecido adiposo subjacente (SANTANA *et al.*, 2014 b). A escolha do *Antimonium crudum* neste estudo está baseada no conceito de similitude, considerando as características clínicas da leishmaniose (BOERICKE, 2016). Dois estudos recentes mostram que outros medicamentos homeopáticos ou o próprio *Antimonium crudum* utilizado para o tratamento de co-cultura de macrófagos com *Leishmania (L) infantum chagasi* também mostram ação imunomoduladora *in vitro* (MARQUES DA SILVA, 2016; NASCIMENTO, 2016).

Os resultados obtidos *in vivo* com o *Antimonium crudum*, sobretudo em função da melhora clínica dos animais, incitaram o aprofundamento dos estudos acerca dos mecanismos envolvidos, utilizando modelos *in vitro* mais específicos,

levando-se em conta as características morfo-funcionais dos macrófagos infectados frente ao tratamento homeopático. Assim sendo, a ativação (*spreading*) dos macrófagos e a fagocitose, a produção de H_2O_2 , NO e citocinas e outras mudanças morfofuncionais, como o desenvolvimento de células multinucleadas e a expressão de CD86 foram analisadas no presente trabalho. Também, a potência 200 cH foi incluída nos experimentos, para fins de comparação. Tem-se que as potências de *Antimonium crudum* 30 cH e 200 cH apresentaram comportamentos celulares e parasitários distintos, abrindo espaço para a discussão sobre possíveis estratégias a serem aplicadas na prática clínica, levando-se em conta as diferentes potências e sua aplicação ao longo da evolução da doença, incluindo a possibilidade de uso profilático (MARQUES DA SILVA, 2016).

O uso do tratamento homeopático na leishmaniose poderia ser uma alternativa válida, pela facilidade de administração, relação custo-benefício e modulação da relação hospedeiro-parasita, o que seria particularmente estratégico do ponto de vista epidemiológico. Também há que se considerar a possibilidade de tratamento adicional aos medicamentos convencionais, o que supostamente possibilitaria a redução do tempo de tratamento com antimoniais pentavalentes ou com o próprio Milteforan (Virbac®) e, conseqüentemente, redução dos efeitos indesejáveis e da ocorrência de resistência parasitária. Esta hipótese encontra respaldo no estudo realizado por Vieira-Gonçalves *et al.* (2015), que demonstrou resultado benéfico com o uso de baixas doses de antimoniais no tratamento de lesões cutâneas por *Leishmania (V.) braziliensis*. Portanto, nesta perspectiva, o controle parasitário seria realizado com fármacos convencionais e o medicamento homeopático exerceria função imunomoduladora em paralelo (SANTANA *et al.*, 2014b; NASCIMENTO, 2016).

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi conhecer os efeitos dos medicamentos homeopáticos *Antimonium crudum* 30cH e *Antimonium crudum* 200cH na atividade de macrófagos *in vitro*, em co-cultura com *Leishmania (L) amazonensis*.

Especificamente, os parâmetros analisados foram:

- a) *Spreading* ou área celular;
- b) Porcentagem de fagocitose;
- c) Produção de peróxido de hidrogênio e NO;
- d) Avaliação quantitativa (por contagem automatizada) e qualitativa (por microscopia eletrônica de varredura) da internalização dos parasitas;
- e) Morfologia dos fagócitos em microscopia de fluorescência pelo método alaranjado de acridina;
- f) Expressão de CD86 e contagem de células positivas;
- g) Contagem de células multinucleadas; e
- h) Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL1- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-10, IL-6, VEGF-A, TNF- α , RANTES/CCL5, GM-CSF, IL12 -p40, IL12-p70, MIP-1 β /CCL4, MCP-1/CCL2).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação dos medicamentos

O *Antimonium crudum* 30 e *Antimonium crudum* 200 cH foram preparados a partir de matrizes 29 cH e 199 cH adquiridas de farmácia homeopática credenciada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Este medicamento é preparado a partir da solução estoque do mineral antimoniato, contendo uma porcentagem mínima de 95% de Sb_2S_3 , conforme método descrito por Stuttgart (1985).

Em ambos os casos, as últimas diluições (1:100) foram preparadas no momento do uso, em água ultra-pura autoclavada, sendo agitadas com o auxílio de braço mecânico Denise (Autic®), próprio para uso em farmácias de manipulação homeopática. Após o preparo, as etiquetas dos frascos foram trocadas por pessoal do laboratório não envolvido no experimento. As etiquetas foram substituídas pelas letras A, B, C, D e os códigos foram guardados em envelope lacrado até o final da análise estatística. Os procedimentos de preparo e estocagem dos medicamentos seguiram as normativas descritas na Farmacopeia Homeopática Brasileira (3ª edição, 2011).

3.2 Protocolo de co-cultura de macrófagos e *Leishmania amazonensis*

Foram utilizados macrófagos RAW, cedidos pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), Brasil. Inicialmente, às placas estéreis de 24 poços foram adicionadas lamínulas redondas, também estéreis, para a semeadura dos macrófagos. Os mesmos foram previamente expandidos em garrafas para cultura celular, em meio RPMI-1640. Após a confluência das células atingir 90%, realizou-se o desprendimento celular com o auxílio do *cell scraper* SARSTEDT®. As mesmas foram centrifugadas por 3 min a 1000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi homogeneizado em RPMI para contagem em câmara de Neubauer, usando azul de Tripán 0,4% para verificação da viabilidade celular. As células foram distribuídas nas placas, na quantidade de 5×10^5 por lamínula, sendo acrescentado RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino, suficiente para completar 500 μL por poço.

A incubação da placa foi feita em estufa de CO₂ a 37°C por 4 horas, para aderência dos macrófagos. Em seguida, foram inseridos 10 parasitas por macrófago em cada poço, seguido de incubação a 34°C por 4 horas, em meio RPMI-1640, para a internalização dos parasitas. A cepa de *Leishmania (L.) amazonensis* MHOM/BR/73/M2269 foi fornecida pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os parasitas foram obtidos de cultura pura e mantidos em meio RPMI-1640 (10 ml), a 25°C, suplementados com 10% de soro fetal bovino, 2% de urina humana masculina e 1% de penicilina (100U/ml) e gentamicina (0.1mg/ml). Após a internalização, os medicamentos foram filtrados em filtro Millipore® de 22 micra para evitar contaminação e adicionados em volume igual a 20% do meio de cultura. Um reforço do tratamento foi feito após 24 horas, em volume igual a 1% do meio de cultura. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa de CO₂ em diferentes tempos: 24, 48, 72, 96 e 120 horas, até a análise da morfologia celular e do sobrenadante. Para o estudo da morfologia celular e da fagocitose, as amostras foram tratadas em quadruplicata, sendo realizadas três séries de experimentos para cada tempo, o que gerou um total de 12 *datapoints* para cada tratamento estudado.

3.3 Coloração por Giemsa

As lamínulas, alocadas no fundo de cada poço, foram lavadas 2 vezes com PBS (SIGMA®) e, em seguida, foi acrescentado metanol absoluto por 15 minutos, para a fixação das células. Após a remoção do fixador, o corante Giemsa, já filtrado, foi colocado sobre as lamínulas até recobri-las por 15 minutos e as mesmas foram lavadas com água destilada e secas. No dia seguinte, as lamínulas foram passadas em Xilol e montadas com Entellan® sobre lâmina histológica.

3.4 Análise do espraio, da fagocitose e do número de células multinucleadas por campo

Dez campos microscópicos por lamínula corada por Giemsa foram registrados em fotografias digitais (Microscópio NIKON Eclipse 200, com sistema de captura Coolpix®), utilizando objetiva de 40x e analisados no software Metamorph®, para mensuração automática da área dos macrófagos (*spreading*). A porcentagem de fagocitose foi determinada pela razão da contagem visual dos protozoários

fagocitados e não fagocitados, totalizando 10 campos microscópicos por lamínula. O número de células multinucleadas por campo foi registrado por contagem manual, utilizando o mesmo software.

3.5 Ensaio de Liberação de Peróxido de Hidrogênio

Os macrófagos foram ressuspensos em meio RPMI-1640 e plaqueados em placa de cultura de 96 poços de fundo chato na concentração de 10^4 células em 100 μ L por poço, em quadruplicata. A incubação se deu por 2 horas em estufa de CO_2 a 37°C . Após esse período, foi feita a substituição do meio de cultura e a inserção de 10^5 promastigotas, por 24 horas a 37°C na estufa de CO_2 . No dia seguinte, 100 μ L da solução tampão foram inseridos em todos os poços, que inclui as seguintes soluções: solução 1 (80 ml de água destilada, 8 g NaCl, 0,2 g de KCl, 0,2 g de KH_2PO_4 , 1,15 g de Na_2HPO_4), solução 2 (30 ml de água destilada e 0,3 g de CaCl_2) e solução 3 (30 ml de água destilada com 0,64 g de MgCl_2). Todos os sais e reagentes eram provenientes da DINÂMICA®. Adicionalmente, houve o acréscimo na solução final de 0,1 ml de vermelho fenol INLAB®, 0,1ml de Peroxidase SIGMA®, 1,0ml de Glicose DINÂMICA® e 7,8 ml de água destilada. Em seguida, essa solução final foi distribuída em 100 μ L por poço, com 10 μ L de acetato de miristato de forbol-PMA-SIGMA®, para incubação por 1h a 37°C , em estufa de CO_2 . Para bloquear a reação acrescentou-se 10 μ L de NaOH (DINÂMICA®) 1N em cada poço. Finalmente, realizou-se a leitura em leitor de ELISA, com filtro de 620nm.

3.6 Ensaio de produção de Óxido Nítrico

Os sobrenadantes das células mantidas em co-cultura, em diferentes tempos de tratamento, foram transferidos para a placa de leitura, onde foi adicionado o reagente Griess [1% de sulfanilamida (SIGMA®) mais 0,1% de NEED nãfitiletenediamina dihidroclorido (SIGMA®) diluído em 2,5% de ácido fosfórico (SIGMA®) na proporção de 1:1(v/v) com o sobrenadante. Após o tempo de espera de 10 minutos, a placa foi lida em leitor de ELISA a 540 nm. Posteriormente, os valores de leitura foram comparados com curva padrão de NaNO_2 (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781 μM) e os resultados foram expressos em μM de nitrito liberado por 5×10^5 células.

3.7 Ensaio Imunoenzimático para dosagem de citocinas

Os sobrenadantes de cultura dos macrófagos infectados foram colhidos após 2, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, para posterior centrifugação e congelamento em freezer a -80°C. A dosagem de citocinas foi feita pelo método MAGPIX-Luminex (Kit e-Bioscience®), seguindo as instruções do fabricante. O Kit inclui os sistemas de detecção das seguintes citocinas: IL1- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-10, IL-6, VEGF-A, TNF- α , RANTES/CCL5, GM-CSF, IL12-p40, IL12-p70, MIP-1 β /CCL4, MCP-1/CCL2. As amostras foram analisadas em quadruplicada. Os resultados foram expressos em pg/ml. Amostras com quantidades abaixo do limite de detecção foram registradas como “zero” e amostras acima do limite determinado pela curva padrão foram registrados como o valor mais alto da curva.

3.8 Microscopia de Fluorescência e análise morfológica

As lamínulas contendo co-culturas de macrófagos RAW e *Leishmania (L.) amazonensis* por 2, 24 e 120 horas foram incubadas com o corante alaranjado de acridina (INLAB®) para verificar a atividade fagocítica em tempo real. O corante fluorescente marca o DNA celular em verde, pelo processo de metacromasia, quando observado em microscópio de fluorescência (OLYMPUS, BX60). Os lisossomas e vacúolos ácidos (fagolisossomas) são marcados em laranja, cuja intensidade reflete o grau de acidez da estrutura. Assim, é possível observar as leishmanias internalizadas e sua relação com os vacúolos fagocitários. Campos microscópicos representativos foram registrados em sistema de captura digital (Câmera ocular DINO-EYE, AM7023) com resolução de 5 MP.

3.9 Contagem de promastigotas não internalizados e análise de apoptose

A contagem de formas prosmatigotas não fagocitadas presentes no sobrenadante das culturas após 24 horas foi feita utilizando-se o método automatizado Countess® e o KIT ANEXINA-IP (Life Tech®) para avaliação do índice apoptótico das mesmas, seguindo as orientações do fabricante.

3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em parceria com a Universidade Federal do Paraná (UFPR). Após coleta e plaqueamento de macrófagos RAW em lamínulas, mantendo o cultivo celular a 37°C e 5% de CO₂, foi realizada lavagem com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (MERCK®), por duas vezes, em pH 7.2. Depois, foi feita a fixação em glutaraldeído 1% diluído em tampão cacodilato de sódio, por 15 minutos, no escuro. Após nova lavagem com o tampão, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (30%, 50% e 70%, MERCK®), por 10 minutos em cada concentração. No dia da metalização, foi realizada a desidratação prévia em álcool 70% (5 minutos), 90% (10 minutos) e 100% (10 minutos). Em seguida, o material foi submetido ao aparelho de ponto crítico em CO₂ Dryer Model CPD030 (BALZERS PFEIFFER) e metalizado com ouro no aparelho SCD (Balzers Union, Balzers, Liechtenstein), para posterior observação no microscópio eletrônico de varredura VEGA3 LMU (TESCAN), com magnitude variando entre 20 e 60 micrômetros.

3.11 Avaliação imunocitoquímica e atividade apresentadora de antígenos

A expressão de proteína B7-2 (CD86) em macrófagos RAW infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* foi avaliada por imunocitoquímica. Inicialmente, as células aderidas às lamínulas foram lavadas em PBS, pH 7.2 (SIGMA®), durante 5 minutos. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação das lamínulas com H₂O₂ 5% em metanol, durante 15 minutos. Após nova lavagem com PBS, pH 7.2 (SIGMA®), as amostras foram incubadas com soro heterólogo de equino (VECTOR®), durante 20 minutos para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com anticorpo Anti-CD86 (AbCAM®), por 1 hora, a 4°C, lavadas novamente em PBS e tratadas por 30 minutos com complexo anticorpo secundário/polímero acoplado à peroxidase (VECTOR®). Após nova lavagem em PBS, as lamínulas foram incubadas com DAB (DAKO®), lavadas em água corrente, contra-coradas com hematoxilina de Harris e montadas em lâminas em Entellan® (MERCK®).

3.12 Análise de células positivas para imuno-histoquímica

Dez campos microscópicos por lamínula, marcadas pelo anticorpo Anti-CD86 (AbCAM®) no procedimento de imunocitoquímica, foram registrados em fotografias digitais (Microscópio NIKON Eclipse 200, com sistema de captura Coolpix®), utilizando objetiva de 40x. As análises foram feitas por contagem manual de células positivas, usando o software Metamorph®.

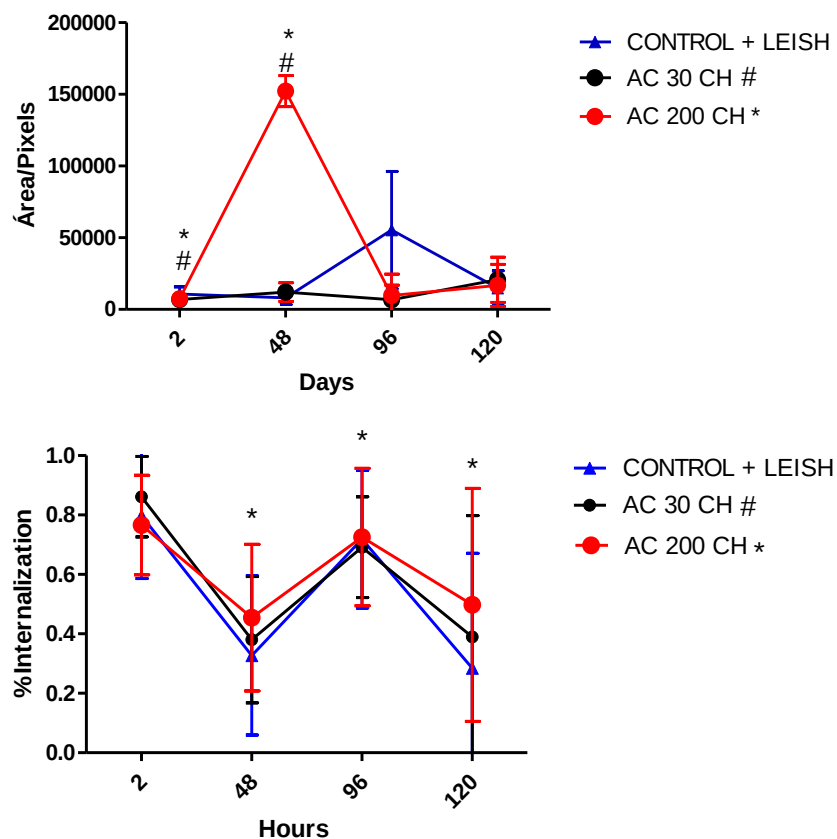
3.13 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste ANOVA/Tuckey-Kramer ou Kruskal-Wallis/Dunn, segundo o resultado do teste de Bartlett para determinação da homocedasticidade das variáveis estudadas. Para variáveis paramétricas analisadas em função do tempo, utilizou-se também a ANOVA de duas vias, para determinação da interação entre tratamento e tempo. As análises foram feitas no software PRISM 5.0. Em todos os casos, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

Os tempos de 02, 48, 96 e 120 horas foram avaliados quanto ao espraimento e fagocitose em co-culturas tratadas com diferentes diluições de AC. Em 48 horas, houve diminuição do espraimento nas células tratadas com AC 30 cH e aumento nas células tratadas com AC 200 cH (ANOVA, $p < 0.05$), como ilustrado na **Figura 1**.

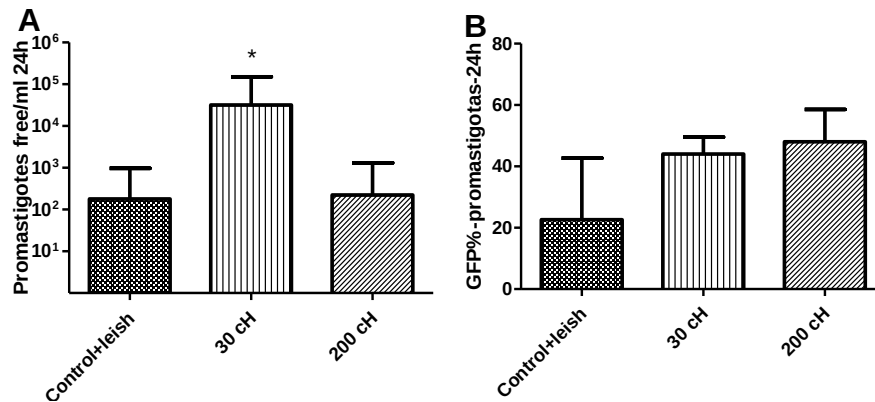
Figura 1 – Área de macrófagos (pixels) e índice fagocítico de macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania (L.) amazonensis* tratados com AC 30 cH (#) e 200 cH (*), nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. *# $p < 0.05$, Kruskal Wallis/Dunn, em relação ao controle



Ainda, conforme **Figura 1**, a internalização de formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* foi significativamente maior nas co-culturas tratadas com AC 200 cH em 48, 96 e 120 horas.

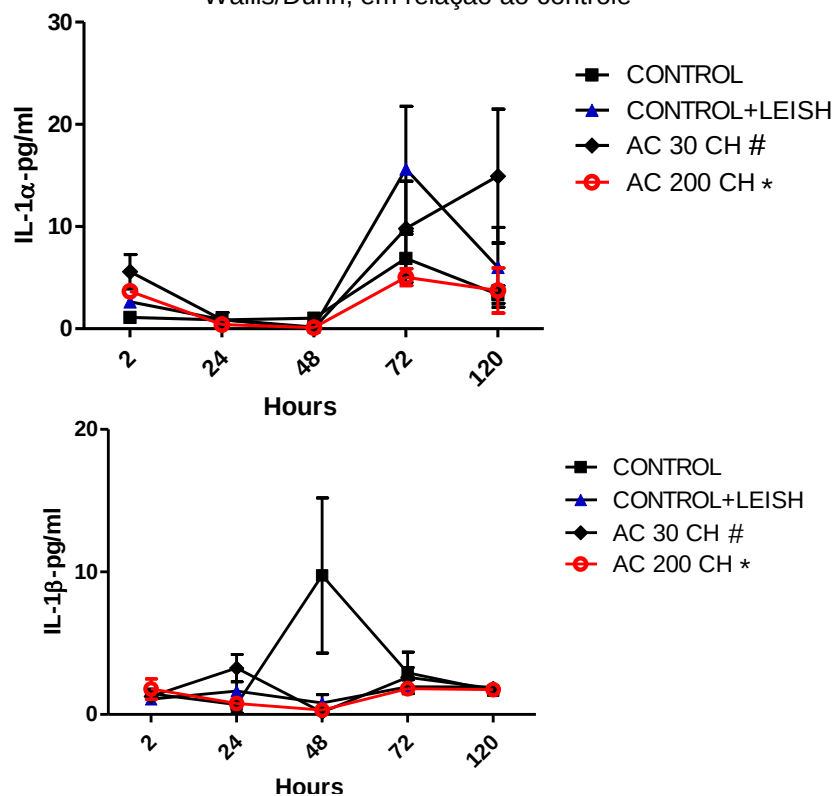
A contagem de formas promastigotas não internalizadas no sobrenadante após 24 horas de incubação mostrou aumento de parasitas na co-cultura tratada com AC 30 cH ($p < 0.05$), evidenciando a menor velocidade fagocítica neste grupo (**Figura 2a**). Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à porcentagem de apoptose dos parasitas (**Figura 2b**).

Figura 2 – A) Número de promastigotas livres no sobrenadante, após 24 horas de co-cultura entre macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania (L.) amazonensis*, e tratados com AC 30 cH e 200 cH. B) Porcentagem de promastigotas positivas para Anexina em 100 células, após 24 horas. Valores representam média e desvio padrão. * $p < 0.05$; ANOVA, Tuckey- Kramer, comparado ao controle



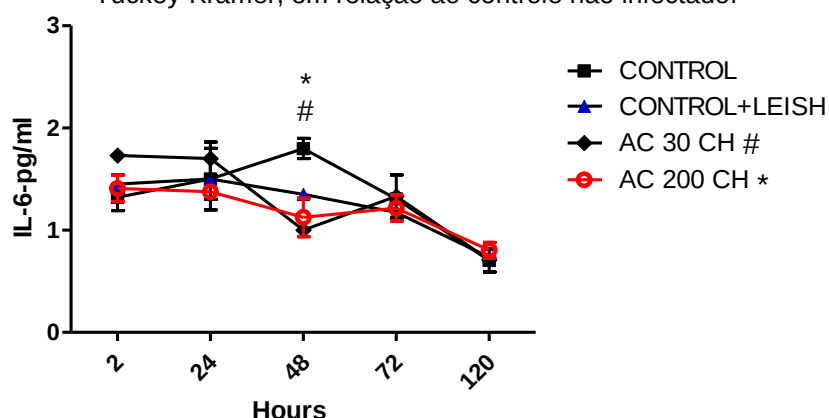
Observou-se redução na produção de todas as citocinas após 48 horas de interação entre macrófagos e parasitas em relação à cultura de macrófagos não infectados, independentemente do tratamento, revelando a atividade imunossupressora natural da *Leishmania (L.) amazonensis* (Figuras 3-9). Porém, não houve alterações significativas em relação a IL-1 α e IL-1 β (Figura 3).

Figura 3 – Dosagem de citocinas (IL-1 α e IL-1 β) em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com AC 30 cH (#) e 200 cH (*), nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. *# $p < 0.05$ Kruskal-Wallis/Dunn, em relação ao controle



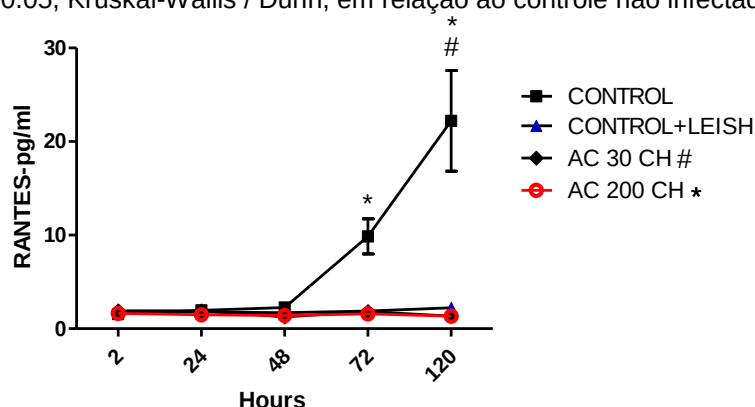
A citocina IL-6 também apresentou decréscimo no tempo de 48 horas em todas as co-culturas, em relação ao controle de macrófagos não infectados. Os tratamentos com AC 30 cH e 200 cH potencializaram esse efeito ($p<0.01$ e $p<0.05$), apresentado na **Figura 4**.

Figura 4 – Dosagem de citocina IL-6 em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com AC 30 cH (#) e 200 cH (*), nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. * $p<0.05$ e # $p<0.05$, Tuckey-Kramer, em relação ao controle não infectado.



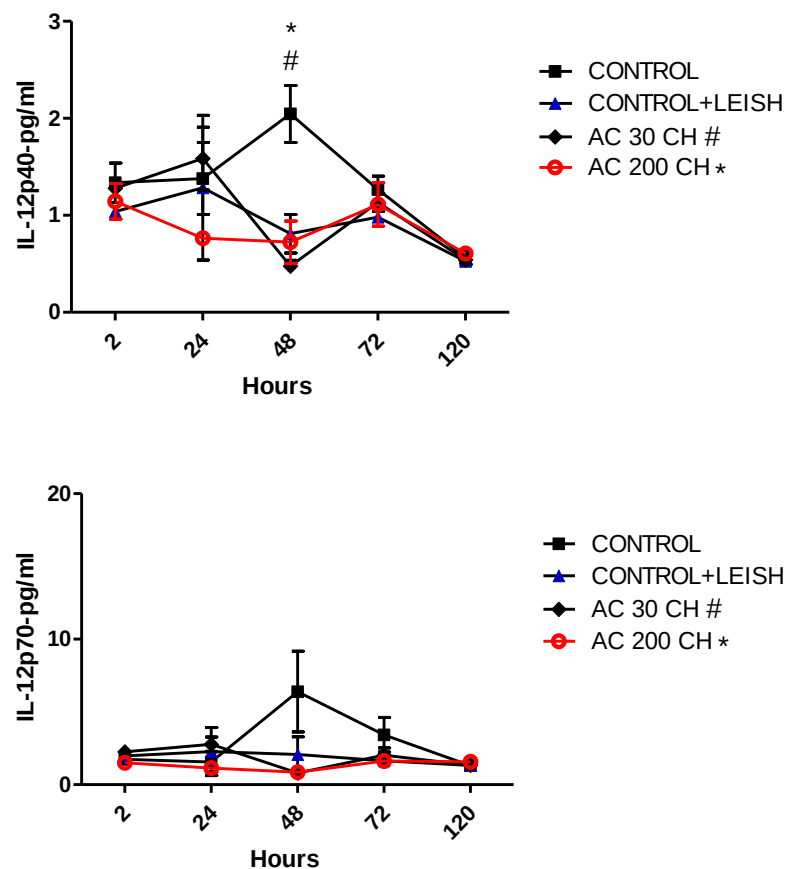
Conforme a **Figura 5**, a produção de RANTES foi mais tardia, a partir de 72 horas, sendo mais evidente na cultura simples de macrófagos não infectados. RANTES é uma importante citocina quimiotática para linfócitos, sendo relevante nos estágios mais tardios do processo inflamatório. As co-culturas de macrófagos e *Leishmania amazonensis* mostraram clara inibição deste efeito, sendo que os tratamentos com AC 30 cH e 200 cH potencializaram a ação imunossupressora do parasita ($p<0.05$).

Figura 5 – Dosagem de citocina RANTES em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com AC 30 cH (#) e 200 cH (*), nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. * $p<0.05$ e # $p<0.05$, Kruskal-Wallis / Dunn, em relação ao controle não infectado



A citocina IL-12p40 e sua forma biologicamente ativa IL-12p70, ambas pró-inflamatórias e importantes para imunidade inata e adquirida, apresentaram diminuição estatisticamente significativa no sobrenadante de células tratadas com AC 30 cH e 200 cH após 48 horas, com valores de $p < 0.01$, em ambos os grupos. Não houve diferença estatística em IL-12p70, conforme **Figura 6**.

Figura 6 – Dosagem de citocinas IL-12p40 e IL-12p70 em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com AC 30 cH (#) e 200 cH (*), nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. * $p < 0.05$ e # $p < 0.05$, Kruskal-Wallis / Dunn, em relação ao controle não infectado



A quimiocina MIP-1 β , proteína inflamatória do macrófago, ou CCL4, é um importante fator quimiotático para monócitos e células NK. Verificou-se redução dos níveis de MIP-1 β nos grupos tratados AC 200 cH ($p < 0.001$) e AC 30 cH ($p < 0.05$), quando comparado a ambos os controles, em 72 e 120 horas. Adicionalmente, o IFN- γ também apresentou diminuição após 48 horas de incubação nas co-culturas tratadas com AC 30 cH ($p < 0.05$) e AC 200 cH ($p < 0.05$), em relação ao controle, conforme demonstrado na **Figura 7**.

Figura 7 – Dosagem de citocinas MIP-1 β (CCL4) e IFN- γ em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com AC 30 cH (#) e 200 cH (*), nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. * $p < 0.05$ e # $p < 0.05$, Kruskal-Wallis / Dunn, em relação ao controle não infectado

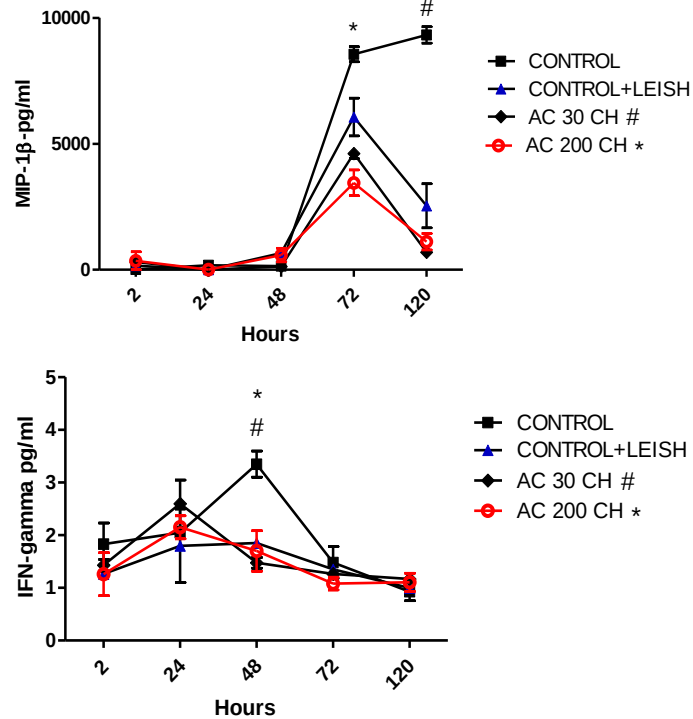
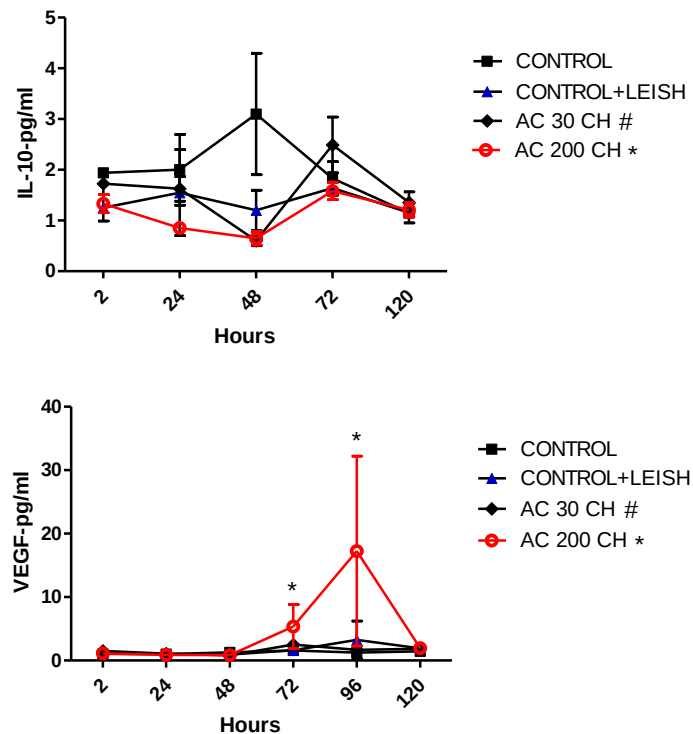
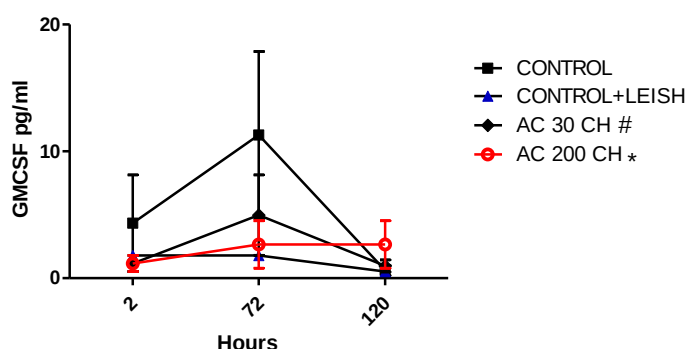


Figura 8 – Dosagem de mediadores anti-inflamatórios IL-10 e VEGF em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com AC 30 cH (#) e 200 cH (*), nos tempos de 2, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. * $p < 0.05$ Kruskal-Wallis / Dunn, em relação ao controle



Em relação aos mediadores de perfil anti-inflamatório, foram analisados a IL-10 e o VEGF. A ANOVA de uma via, por sua vez, mostrou redução dos níveis de IL-10 no sobrenadante das co-culturas tratadas com AC 30 cH e 200 cH no tempo de 48 horas, porém não houve diferença estatística. Quanto ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), verificou-se aumento tardio nos níveis deste mediador no sobrenadante dos macrófagos tratados com AC 200 cH ($p < 0.05$) após 72 e 96 horas de incubação. Os dados estão demonstrados na **Figura 8**.

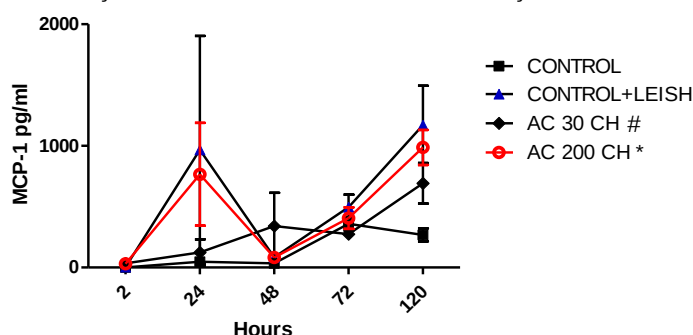
Figura 9 – Dosagem de citocinas (GMCSF) em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW e *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com AC 30cH e 200 cH, nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão *# $p > 0.05$ Kruskal-Wallis / Dunn, em relação ao controle



Além dos efeitos locais, algumas citocinas também favorecem a liberação de células em seu local de produção, na medula óssea. Um exemplo é o fator estimulante de colônias monócito granulócito (GMCSF), que não apresentou nenhuma diferença estatística, embora mostrasse a mesma tendência inibitória das demais citocinas nas co-culturas infectadas (**Figura 9**).

Outra quimiocina, a MCP-1 ou CCL2, quimiotática para monócitos, mostrou aumento em relação ao controle, mas com grande variância, após 24 horas de incubação, em relação à cultura simples de macrófagos não infectados. Este aumento é compatível com as características biológicas naturais da *Leishmania* spp, uma vez que depende do aporte de monócitos para o sítio da infecção para garantir seu ciclo na célula hospedeira. Contudo, a co-cultura tratada com AC 30 cH mostrou marcada redução, embora sem significância estatística. Tal achado é compatível com os resultados obtidos anteriormente *in vivo* (SANTANA *et al.*, 2014a). Um pico tardio de MCP-1 também foi visto após 120 horas de co-cultura, porém sem diferença estatística, ilustrado na **Figura 10**.

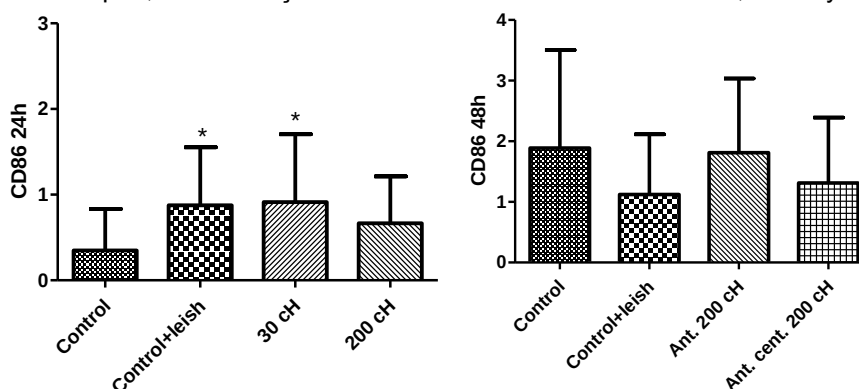
Figura 10 – Dosagem de MCP-1 (CCL2) em pg/ml, a partir de sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com AC 30.cH e 200 cH, nos tempos de 2, 24, 48, 72 e 120 horas. Valores representam média e desvio padrão. *#p>0.05 Kruskal-Wallis / Dunn, em relação ao controle. Não houve diferença estatística entre os grupos



Não houve diferença estatística entre os grupos em relação à produção de NO e H₂O₂ (dados não demonstrados).

Dentre os processos passíveis de interferência na interação *Leishmania* spp e macrófagos, incluem-se aqueles relacionados à capacidade de digestão do parasita e do processamento antigênico. Assim, o CD86 é uma molécula co-estimulatória (B7-2) envolvida na apresentação antigênica. Conforme observado na **Figura 11**, as co-culturas de macrófago e *Leishmania amazonensis* mostraram aumento na frequência de expressão de CD86 após 24 horas de incubação (p<0.05), sendo que essa diferenciação não foi observada após 48 horas. As co-culturas tratadas com AC 200 cH, por sua vez, reproduziram os parâmetros do controle não infectado. O mesmo não se observou nas co-culturas tratadas com AC 30 cH.

Figura 11 – Contagem de células positivas para CD86 por campo microscópico, após 24 e 48 horas de co-cultura entre macrófagos RAW e *Leishmania (L.) amazonensis*, na presença de 20% de AC 30 cH e 200 cH. *p≤0,05 em relação ao controle não infectado. ANOVA, Tuckey- Kramer



A análise morfológica das células em co-cultura submetidas aos diferentes tratamentos foi feita por microscopia de luz, utilizando-se a coloração de Giemsa e por microscopia de fluorescência, utilizando-se o corante alaranjado de acridina.

Neste caso, o DNA parasitário e macrofágico foi observado em verde, pelo fenômeno da metacromasia e os vacúolos fagocitários ácidos foram vistos em laranja. Este método permite avaliar os padrões de interação entre o parasita e a célula hospedeira logo após a sua internalização. Para a observação da adesão dos parasitas aos macrófagos, fez-se a microscopia de varredura.

As comparações entre os grupos tratados e controle foram feitas em diferentes tempos, como 2, 24 e 120 horas, conforme **Figuras 12 e 13**. No tempo de 2 horas, observou-se que as células controle apresentaram vacúolos ácidos de contornos bem definidos. Ao contrário, células tratadas com AC 30 cH apresentaram pequena positividade ao corante, indicando inibição na formação de vacúolos fagocitários, bem como a presença de parasitas internalizados com DNA íntegro, provavelmente não digeridos pelas enzimas ácidas lisossomais.

As co-culturas tratadas com AC 200 cH, por sua vez, demonstraram a presença de vacúolos dispersos pelo citoplasma, por vezes apresentando núcleos parasitários (marcados em verde) no seu interior, caracterizando uma possível mudança no padrão de evasão do parasita, demonstrado na **Figura 12**. Após 24 horas, as células infectadas e tratadas com AC 30 cH apresentavam a formação de “blebs” na membrana, o que pôde ser confirmado pela coloração de Giemsa. A relação entre esses achados e possível apoptose das células infectadas deverá ser confirmada em estudos futuros. O tratamento com AC 200 cH mostrou padrão totalmente diverso, em que várias células presentes apresentavam-se intensamente vacuolizadas e fortemente coradas em laranja, indicando aumento de acidez citoplasmática, inclusive de parasitas internalizados (**Figura 12**). Todos esses dados merecem estudos futuros para confirmação por meio da microscopia eletrônica de transmissão.

Na fase crônica, após 120 horas, observou-se a presença de parasitas internalizados e bem estabelecidos na co-cultura controle, sem a presença de vacúolos ácidos. Ao contrário, os mesmos são vistos nas co-culturas tratadas com AC 30 cH. A comparação deste padrão nos diferentes tempos sugere certo “atraso” na atividade fagocítica neste grupo. Já o tratamento com AC 200 cH mostrou o mesmo padrão apresentado na fase aguda da infecção, com distribuição homogênea de vacúolos ácidos pelo citoplasma e presença de parasitas não digeridos, como se vê na coloração de Giemsa (**Figura 13**).

Estes dados indicam diferentes padrões morfológicos em função do tempo e do tratamento. Na microscopia eletrônica de varredura, após 30 minutos de

incubação, observa-se que em todos os grupos há o mesmo padrão de interação entre macrófagos e parasitas (**Figura 13**).

Figura 12 – Morfologia de células mantidas em co-cultura com *Leishmania (L) amazonensis*, coradas pelo alaranjado de acridina e pela coloração de Giemsa. Os tempos analisados correspondem à fase aguda, 2, 24 e 48 horas, respectivamente

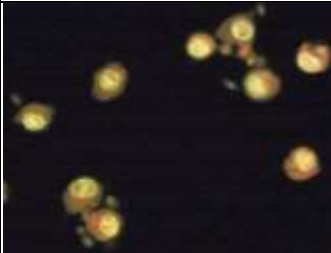
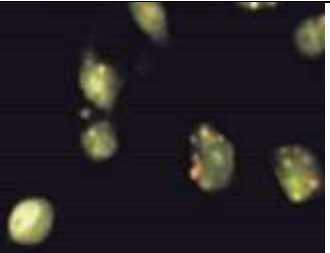
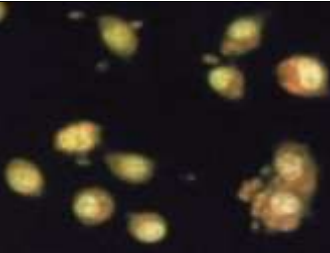
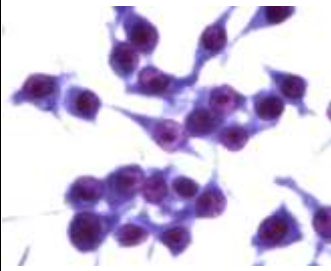
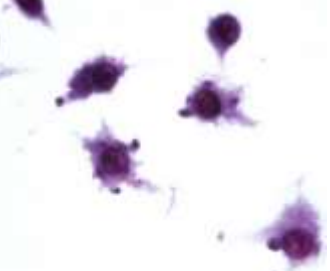
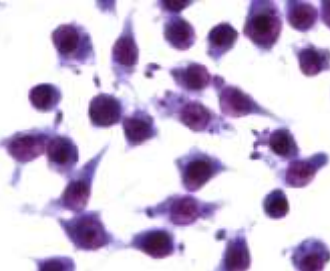
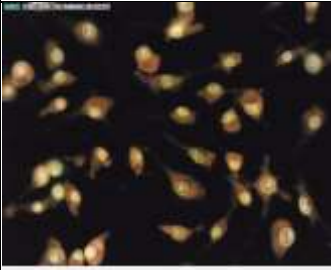
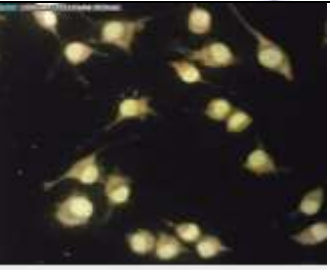
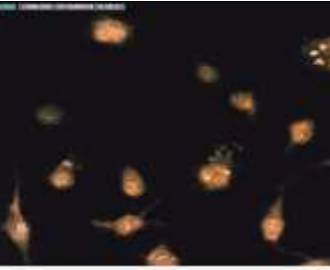
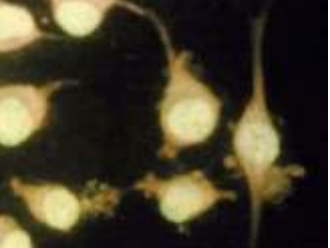
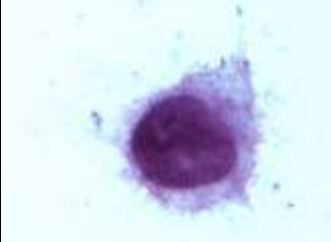
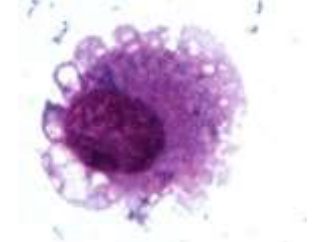
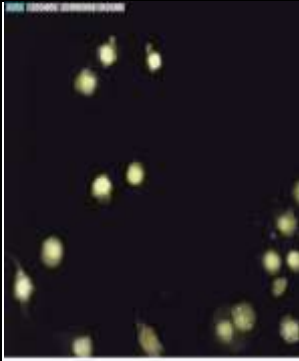
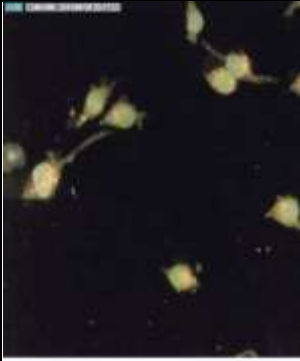
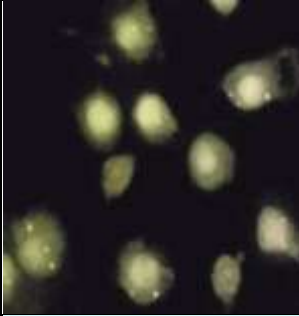
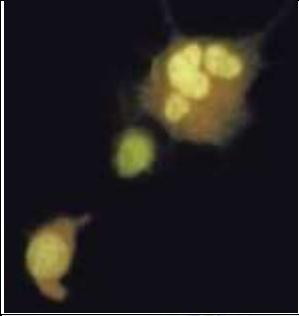
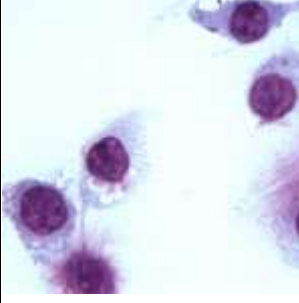
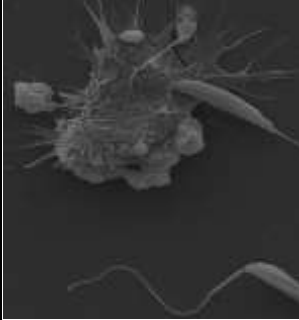
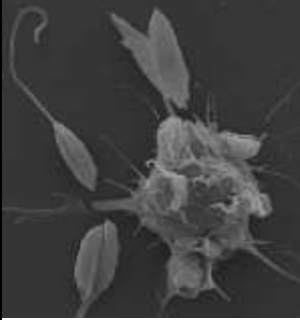
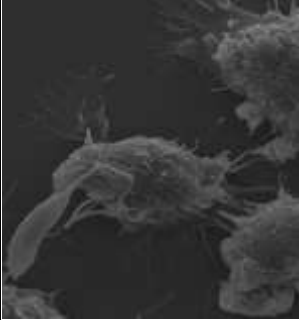
Preparação e tempo	CONTROL + LEISH	AC 30 cH	AC 200 cH
Acridina 2 horas –			
			
Giemsa 2 horas			
Acridina 24 horas			
			
Giemsa 48 horas			

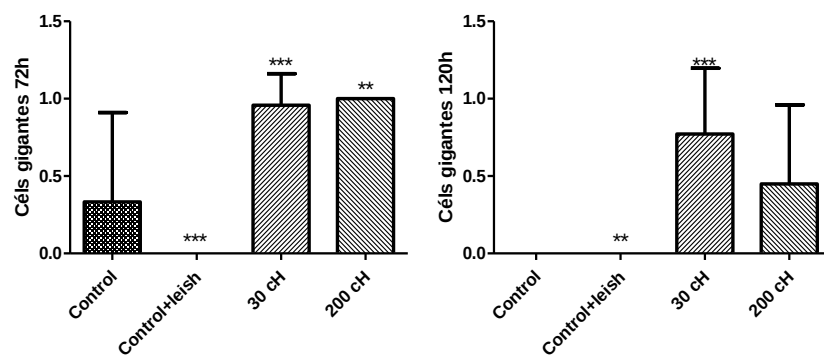
Figura 13 – Morfologia de células mantidas em co-cultura com *Leishmania (L) amazonensis*, coradas pelo alaranjado de acridina e pela coloração de Giemsa. Os tempos analisados correspondem à fase crônica, 120 horas, respectivamente. Na última linha, as figuras representam as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), no tempo de 30 minutos.

Preparação e tempo	CONTROL + LEISH	AC 30 cH	AC 200 cH
Acridina 120 horas			
			
Giemsa 120 horas			
Varredura 30 minutos			

4.1 Incidência de células gigantes multinucleadas

A incidência de células gigantes multinucleadas também foi verificada, observando-se aumento em 72 horas nas co-culturas tratadas com AC 30 e 200 cH ($p < 0.05$), conforme se vê na **Figura 14**. Em outro período, mais tardio, de 120 horas, houve diferença estatística apenas no grupo tratado com AC 30 cH.

Figura 14 – Número de células gigantes por campo, após 72 e 120 horas de co-cultura entre macrófagos RAW e *L. amazonensis*, na presença de 20% de AC 30 e 200 cH. ** $p \leq 0,05$ e *** $p \leq 0,05$ em relação ao controle, ANOVA, Tuckey- Kramer



5 DISCUSSÃO

Macrófagos são capazes de fagocitar, migrar, secretar citocinas, apresentar antígenos, produzindo uma resposta inflamatória (NELSON *et al.*, 2012). Uma vez que a célula é ativada, outros parâmetros são verificados, sendo que esta ativação exerce uma influência nos mecanismos microbicidas. Relatos indicam que medicamentos homeopáticos podem alterar a ativação macrofágica, como por exemplo, Oliveira *et al.* (2011) demonstraram que o *Mercurius solubilis*, em diferentes diluições homeopáticas aumentou a ativação macrofágica, resultando em aumento de IFN- γ e óxido nítrico. Outro trabalho também indicou, em co-cultura de macrófagos, linfócitos e células de melanoma (B16 F10), que um complexo homeopático (formado por *Aconitum napellus*, *Arsenicum album*, *Asa foetida*, *Calcarea carbonica*, *Conium maculatum*, *Ipecacuanha*, *Phosphorus*, *Rhus tox*, *Silicea*, *Sulphur*, e *Thuya occidentalis*) desencadeava maior interação e ativação celular, diminuindo a quantidade de células tumorais na cultura (GUIMARÃES *et al.*, 2009). Adicionalmente, outro complexo homeopático denominado Canova® (PEREIRA *et al.*, 2005; SMIT *et al.*, 2009) foi capaz de produzir aumento na proliferação de linfócitos em co-cultura, quando macrófagos são pré-tratados (BURBANO *et al.*, 2009).

No presente estudo, por meio da mensuração automática da área dos macrófagos em sistema de análise de imagens, também se observou aumento do espreadimento fagocitário nas co-culturas tratadas com *Antimonium crudum* 200 cH, em relação ao controle. Os efeitos da ativação celular induzido pelo *Antimonium crudum* 200 cH também foram notados na análise morfológica pela coloração do alaranjado de acridina, em que as células apresentaram distribuição difusa de vacúolos ácidos (lisossomos e fagolisossomos) pelo citoplasma, além de maior ativação celular e aumento do número de leishmanias fagocitadas entre 24 e 120 horas, sendo o espreadimento mais evidente após 48 horas.

Na leishmaniose, os parasitas entram nas células hospedeiras por receptores que medeiam a fagocitose (LASKAY, 2003). Neste trabalho, a invasão celular pelos parasitas foi bastante evidente nos achados microscópicos, sobretudo na microscopia eletrônica de varredura, bem como nas microscopias de fluorescência e de campo claro, cujas lâminas foram coradas pelo método Giemsa. O processo de fagocitose, contudo, pareceu ser dependente do tratamento aplicado e do tempo de

incubação. Conforme se vê na figura 2, as células tratadas com AC 30 cH mostraram aumento significativo da fagocitose nos tempos mais precoces de incubação, mas esta tendência não se observou nos tempos mais tardios, ao contrário, houve aumento do número de promastigotas livres no sobrenadante, indicando inibição parcial no processo de internalização dos parasitas. Os parasitas não internalizados não mostraram evidências de aumento na porcentagem de apoptose nas culturas tratadas com AC 30 cH em 24 horas de co-cultura. Análises posteriores mostram esta tendência até 72 horas (dados não mostrados). Ao contrário, no tratamento com o Tamoxifeno, observou-se 59.7% de apoptose (também avaliada pelo método da anexina V) em promastigotas de *Leishmania major* no grupo tratado com 50 µg/ml, após 48 horas de incubação (DOROODGAR *et al.*, 2016).

Por outro lado, o AC 200 cH mostrou aumento de parasitas internalizados somente no tempo de 120 horas, o que sugere possível redução na capacidade de digestão dos mesmos, permitindo sua proliferação no ambiente intracelular. Como é sabido, a *Leishmania* spp utiliza o macrófago para captação de metabólitos necessários para a sua sobrevivência e multiplicação (SERNEE *et al.*, 2006). Estudos futuros são, portanto, necessários para se averiguar se o tratamento dos macrófagos com AC em diferentes diluições homeopáticas pode interferir nos receptores de membrana responsáveis pela internalização dos parasitas, bem como seu comportamento dentro dos vacúolos fagocíticos. Paralelamente, ensaios clínicos ainda são necessários para avaliar se o uso de AC 30 cH poderia ser útil na profilaxia da leishmaniose.

Embora o processo de internalização tenha mostrado alterações em função do tratamento, o *burst* respiratório dos macrófagos que produz metabólitos reativos de oxigênio e nitrogênio (NAUSEEF, 2008) não sofreram alterações nos tempos estudados: 2, 24 e 48 horas. Tais mensurações não foram feitas nos tempos mais tardios, em função desses resultados.

Em estudo anterior (SANTANA *et al.*, 2014b) foi verificado aumento de formas amastigotas livres, quando da análise histométrica do linfonodo regional, ou seja: fora do local de inoculação, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção experimental. Esses achados sugerem a atuação do medicamento homeopático na sinalização da migração de monócitos para o sítio primário da infecção e na entrada

do parasita na célula hospedeira, o que pôde ser parcialmente demonstrado neste estudo.

A relação do parasita com o hospedeiro pode ser frequentemente modificada por mecanismos de evasão ou adaptativos do próprio parasita, em relação ao sistema imune (RITTIG *et al.*, 2000; BURCHMORE *et al.*, 2001; MORAIS *et al.*, 2015). Em estudo realizado com macrófagos infectados com *Leishmania donovani* e estimulados com LPS, verificou-se que a fosforilação e a translocação do fator de transcrição NF- κ Bp65 estavam diminuídos (TERRAZAS *et al.*, 2015), evidenciando que esta via de ativação da inflamação estaria prejudicada nas células infectadas. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram a hipótese de interferência dos medicamentos estudados na produção de citocinas, sendo estas modificadas pela infecção dos macrófagos pela *Leishmania amazonensis*. Assim sendo, observamos que a infecção dos macrófagos levou à redução da síntese de IFN- γ , IL-12, IL-6, RANTES e IL 10 após 48 horas de incubação e à redução de MIP-1 β após 72 a 120 horas. Em todos estes casos, o tratamento com AC 30 cH e 200 cH potencializou tal efeito. No caso da IL-1 α , foi observado também aumento rebote nas culturas infectadas após 72 horas de incubação, sendo que o tratamento das células com AC 200 cH reverteu esse efeito.

Dentre as quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de monócitos, a MCP-1 apresentou dois picos distintos nas concentrações detectadas no sobrenadante: um após 24 e outro após 120 horas. O tratamento com AC 30 CH bloqueou ambos os picos. Mesmo sem significância estatística, este achado tem particular importância, pois explica os achados histopatológicos observados previamente *in vivo*, em que o tratamento de camundongos BALB/c com AC 30 cH reduziu drasticamente a migração de monócitos para o local da infecção, levando à melhora clínica na fase crônica (SANTANA *et al.*, 2014b). Outro trabalho recente descreve a ação de AC 30 cH em co-cultura de *Leishmania (L.) infantum chagasi* e macrófagos de linhagem J774, resultando em aumento significativo da fagocitose (MARQUES DA SILVA, 2016), sobretudo nos tempos mais precoces de incubação. Contudo, a dosagem de citocinas não foi feita neste caso.

Talvez o resultado mais relevante desta série seja relacionado ao VEGF: as células infectadas e tratadas com AC 200 cH produziram um importante pico deste fator após 96 horas de infecção, o que não se observou nos controles. Este pico de VEGF, associado ao fato do tratamento com AC 200 cH também induzir

precocemente a redução da expressão de moléculas co-estimulatórias de apresentação de antígenos (CD 86), sugerem a polarização de M1 para M2 induzida pelo medicamento, o que justifica o maior número de parasitas internalizados nas culturas tratadas, após 120 horas.

Importante notar que as citocinas que envolvem o recrutamento de linfócitos e sua diferenciação, como RANTES e IL-12p40, diminuíram nas culturas tratadas com AC 30 cH e AC 200 cH. Estes dados também são pertinentes com os resultados obtidos *in vivo*, uma vez que camundongos tratados com AC 30 cH apresentaram redução de linfócitos CD3+ e CD45RA+ (linfócitos T e B) no local da lesão (SANTANA *et al.*, 2014b). Por outro lado, a extrapolação de tais achados para a clínica humana e veterinária requer cautela. Em pacientes infectados por *Leishmania (L.) amazonensis* observou-se hipossensibilidade de células T, levando à leishmaniose cutânea difusa anérgica. Entretanto, a *Leishmania (V.) braziliensis* mostra forte tendência a um perfil imunológico hiper-reativo pela leishmaniose mucocutânea, com exacerbação de hipersensibilidade e perfil da resposta CD4+-Th1 (SILVEIRA *et al.*, 2009). Da mesma forma, a produção de TNF- α e IL-17 estão aumentadas em pacientes com leishmaniose mucocutânea (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Trabalhos recentes também evidenciam o efeito de medicamentos homeopáticos na produção de citocinas em animais infectados experimentalmente por *Trypanosoma cruzi* tratados com bioterápicos. Assim, a dosagem de TGF- β foi 11.9% mais baixa no grupo tratado, comparado ao controle (SANDRI *et al.*, 2015). Adicionalmente, o tratamento com Canova[®] aumentou significativamente os níveis de IFN- γ e IL-5 em camundongos infectados com *T. cruzi* (MOREIRA *et al.*, 2012).

Por mais que o perfil inflamatório Th1 seja o mais adequado para a resolução da leishmaniose (JOSH *et al.*, 2016), a cronicidade, produzida por um estímulo inflamatório contínuo de células e mediadores da inflamação, leva a lesões hipertróficas e até mesmo deformantes. As citocinas pró-inflamatórias e os seus efeitos causam desordens progressivas e sistêmicas levando a doenças crônicas (ADLER *et al.*, 2011). Em estudo para avaliar a leishmaniose tegumentar crônica ocasionada por *Leishmania panamensis*, demonstrou-se que a inflamação hiper-reativa e exacerbada leva a dano tecidual e persistência do parasita, uma vez que o mesmo usa os macrófagos como “cavalos-de-Tróia”.

A partir de biópsias de pacientes cronicamente infectados, mas com infecção assintomática, Navas *et al.* (2014) observaram aumento nos níveis das citocinas

CXCL-5, CXCL-3 e CCL-8 no local da lesão. Também a terapêutica convencional com o uso de antimoniais pentavalentes aumenta os níveis plasmáticos de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , em pacientes com leishmaniose cutânea (KOCYIGITK *et al.*, 2002). Curiosamente, o antimônio preparado homeopaticamente produziu efeito oposto, como demonstrado neste estudo, reforçando a aplicação do princípio de similitude neste caso.

É comum macrófagos RAW apresentarem morfologia compatível com células gigantes, de aspecto multinucleado, sobretudo após 72 horas de incubação. Neste caso, os tratamentos com AC 30 cH e 200 cH aumentaram drasticamente o número de células multinucleadas em relação a ambos os controles. No organismo vivo, presença de células gigantes e epitelióides sugerem o fim do processo de destruição do parasita intracelular (KAPLAN *et al.*, 1986; KAYE *et al.*, 2016). Assim, lesões granulomatosas são identificadas em 61.5% dos casos de leishmaniose cutânea, sendo dividida em: 25.2% caseosa, 4.6% supurativa e 70.2% tuberculóide sem necrose, associada à infecção por micobactérias (AUON *et al.*, 2014). Infere-se, portanto, que este tratamento pode facilitar o processo de cura e remissão da infecção em função do tempo. Contudo, ensaios clínicos específicos são necessários para a confirmação desta hipótese. Se ela se confirmar, confirma-se também a observação de que o uso de medicamentos homeopáticos está relacionado ao aumento da qualidade de vida do paciente portador de doença parasitária crônica (DE ALMEIDA *et al.*, 2008), por organizar os sistemas regulatórios de forma sistêmica (BELLAVITE, 2012). Achado semelhante foi relatado com o uso de bioterápico preparado a partir do próprio parasita, *Leishmania (V.) braziliensis*, em camundongos tratados por via oral e intraperitoneal, no período de 90 dias. Neste caso, o bioterápico na diluição 200 cH levou os animais a apresentar lesões de menor tamanho, quando comparado aos demais grupos (PONTIN *et al.* 2013).

6 CONCLUSÃO

Os dados observados em conjunto permitem concluir que:

- a) O protocolo experimental proposto produziu respostas compatíveis com aquelas observadas anteriormente *in vivo* e ainda permitiu conhecer detalhes sobre os mecanismos envolvidos;
- b) O AC 30 cH produziu inibição precoce na ativação do macrófago infectado, especialmente no controle da produção de quimiocinas, potencializando os efeitos inibidores produzidos pelo próprio parasita sobre essas células;
- c) O AC 200 cH produziu efeitos mais tardios, compatíveis com a polarização dos macrófagos para M2, tendo em vista a maior liberação de VEGF após 72 horas de incubação associada à maior quantidade de parasitas internalizados e de macrófagos multinucleados; e
- d) Ensaios clínicos são necessários para que se possa definir se tais diluições homeopáticas de AC podem ser usadas em protocolos profilaxia e tratamento eficientes do ponto de vista populacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, U. C.; AMBROSIO, E. ANELLI, M.; CAPPELLO, E.; DE TOLEDO CESAR, E; GUIMARÃES, E. C. A strict definition of homeopathy according to Hahnemann. **British Homeopathic Journal**, v. 85, n.2, p. 79-82, 1996.
- ADLER, U. C. Low-grade inflammation in chronic diseases: An integrative pathophysiology anticipated by homeopathy? **Medical Hypotheses**, v. 76, n. 5, p.622-626, 2011.
- ALEIXO, D. L.; BONAMIN, L.V.; FERRAZ, F. N.; VEIGA, F. K.; DE ARAÚJO, S. M. Homeopathy in parasitic diseases. **Internacional Journal High Dilution**, v. 13, n. 46, p. 13-27, 2014.
- ASSCHE, T. V.; DESCHACHT, M.; LUZ, R. A. I.; MAES, L.; COS, PAUL. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p.337-351, 2011.
- ARAÚJO, A. P.; ARRAIS-SILVA, W. W.; GIORGIO, S. Infection by *Leishmania amazonensis* in mice: a potential model for chronic hypoxia. **Acta Histochem**, v. 114, n. 8, p.797-804, 2012.
- AUON, J.; HABIB, R.; CHARAFFEDDINE, K.; TARAIF, S.; LOYA, A.; KHALIFEH, I. Caseating granulomas in cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 10, p. 1-6, 2014.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **The Indian Journal Medical of Research**, v. 119, p. 238-258, 2004.
- BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous Leishmaniasis, **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203-211, 2007.
- BELLAVITE, P. On the plausibility of homeopathic 'similitude'. **Bioethics**, v. 26, n. 9, p. 506-517, 2012.
- BOGDAN, C. Control of *Leishmania major* in the absence of Tyk2 kinase. **Eur. J. Immunol.** V.34, p.519-529, 2004.
- BOERICKE, W. **Homeopathic Materia Medica**. Disponível em: <<http://homeoint.org/books/boericmm/a/ant-c.htm>>. Acesso em: 25 Fev. 2016.
- BONAMIN, L. V.; ENDLER, P. C. Animal models for studying homeopathy and high dilutions: conceptual critical review. **Homeopathy**, v.99, n. 1, p.37-50, 2010
- BURBANO, R. R.; LEAL, M. F.; DA COSTA, J. B.; BAHIA, M. O.; DE LIMA, P. D.; KHAYAT, A. S.; SELIGMAN, I. C.; DE ASSUMPÇÃO, P. P.; BUCHI, D. F.; SMITH, M. A. Lymphocyte proliferation stimulated by activated human macrophages treated with Canova. **Homeopathy**, v. 98, n. 1, p.45-8, 2009.

BURCHMORE, R. J. S.; BARRET, M. P. Life in vacuoles-nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1311-1320, 2001.

CARVALHO, A. K.; CARVALHO, K.; PASSERO, L. F.; SOUSA, M. G.; DA MATTA, V. L.; GOMES, C. M.; CORBETT, C. E.; KALLAS, G. E.; SILVEIRA, F. T.; LAURENTI, M. D. 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, p.1-12, 2016.

CARVALHO, F. S.; WENCESLAU, A. A.; ALBUQUERQUE, G. R.; MUNHOZ, A. D.; GROSS, E.; CARNEIRO, P. L. S.; OLIVEIRA, H. C.; ROCHA, J. M.; SANTOS, I. A.; REZENDE, R. P. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in dogs in Brazil: epidemiology, co-infection, and clinical aspects. **Genetics And Molecular Research**, v. 14, n. 4, p.12062-12073, 2015.

CASTELLANO, L. R.; ARGIRO, L.; DESSEIN, H.; DESSEIN, A.; DA SILVA, M. V.; CORREIA, D.; RODRIGUES, V. Use of Interleukin-10 Blockade as a Therapeutic Strategy in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 2015, 152741, p. 1-5. 2015

CARNEIRO, P. P.; CONCEIÇÃO, J.; MACEDO, M.; MAGALHÃES, V.; CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from patients with Cutaneous Leishmaniasis. **Plos One**, DOI:10.1371, p.1-16, 2016.

CARNEIRO, M. B. H.; LOPES, M.; MOURA, E.; GOMES, V. L.; SOUZA, L. M. A.; DOS SANTOS, L. M.; DE SOUZA, C. C.; CAMPOS, A. C. A.; GOMES, D. A.; GONÇALVES, R.; TAFURI, W. L.; VIEIRA, L. Q. IFN- γ -Dependent Recruitment of CD4⁺ T Cells and Macrophages Contributes to Pathogenesis During *Leishmania amazonensis* Infection. **J Interferon & Cytokine Research**, v. 35, n. 12, p.935-947, 2015.

CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Disponível em: <<http://www.crmvmg.org.br/novoportal/Conteudo/detalheConteudo.aspx?id=2506>>. Acesso em: 15 set. 2016.

DE ALMEIDA, L. R. ; CAMPOS, M. C. O.; HERRERA, H. M.; BONAMIN, L. V.; FONSECA, A. H. Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanossoma cruzi*. **Homeopathy**. v.97, p. 65-69, 2008.

DE OLIVEIRA, S. M.; DE OLIVEIRA, C. C. ABUD, A. P.; GUIMARÃES, F. S.; DI BERNARDI, R. P.; COLETTI, E. L.; BUCHI, D. F. Mercurius solubilis: actions on macrophages. **Homeopathy**, v. 100, n. 4, 2011.

DE OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA, S. M.; GOES, V.M.; PROBST, C. M.; KRIEGER, M. A.; BUCHI, D. F. Gene expression profiling of macrophages following mice treatment with immunomodulator medication. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, p. 1364-1377, 2008.

DE OLIVEIRA, C. C.; OLIVEIRA, S. M.; GODOY, L. M. F.; GABARDO, J.; BUCHI, D. F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **Journal of Infection**, v. 52, n. 6, p. 420-432, 2006.

DOROODGAR, M.; DELAVARI, M.; DOROODGAR, M.; ABBASI, A.; TAHERIAN, A. A.; DOROODGAR, A. Tamoxifen Induces Apoptosis of *Leishmania major* Promastigotes in Vitro. **Korean J Parasitol**, v. 54, n. 1, p. 9-14, 2016.

DRUZIAN, A.F.; DE SOUZA, A. S.; DE CAMPOS, D. N.; CRODA, J.; HIGA, M. G.; DORVAL, M. E.; POMPILIO, M. A.; DE OLIVEIRA, P. A.; PANIAGO, A. M. Risk Factors for Death from Visceral Leishmaniasis in an Urban Area of Brazil. **Plos Negl Trop Dis**, v.9, n.8, 2015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003982>.

FALCÃO, S. A. JARAMILLO, T. M.; FERREIRA, T. M.; FERREIRA, L. G.; BERNARDES, D. M.; SANTANA, J. M.; FAVALI, C. B. *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*: Differences and Similarities to Evade the Innate Immune System. **Front Immunol**. v. 3, n. 7, 2016.

FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 3 ed. 2011. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf >. Acesso em: 22 abril 2016.

FERRAZ, F. N.; BILOTTI, C. C.; ALEIXO, D. L.; HERRERO, J. C. M.; NASCIMENTO JUNIOR, A. D.; DE ARAÚJO, S. M. Hematological and parasitological changes in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* and treated with biotherapy 7dH. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 20, n 4, p. 1-8, 2014.

FIGUEIREDO, F. B. BONNA, I. C.; NASCIMENTO, L. D.; COSTA, T. D.; BAPTISTA, C.; PACHECO, T. M et al. Serological evaluation for detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia, municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.42, p;141-145, 2009.

GALLEGO, S. L.; SANGRÀ, S. M.; ORDEIX, L.; ORELLANA, M. P. *Leishmania infantum*-specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. **Parasit Vector**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2016

GERALDO, M. M.; COSTA, C. R.; BARBOSA, F. M.; VIVANCO, B. C.; GONZAGA, W. F.; BRITO, R. R.; POPI, A. F.; LOPES, J. D.; XANDER, P. *In vivo* and *in vitro* phagocytosis of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes by B-1 cells. **Parasite Immunol**. 2016 Apr 16. DOI: 10.1111/pim.12324.

GOLLOB, K. J.; VIANA, A. G.; DUTRA, W. O. Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. **Parasite Immunol**, v.36, n. 8, p.367-376, 2014.

GUERRA, J. A. O.; RIBEIRO, J. A. S.; COELHO, L. I. A. R. C.; BARBOSA, M. G. V.; PAES, M. G. Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2319-2327, 2006.

GUIMARÃES, F. S. F.; ABUD, A. P. R.; OLIVEIRA, S. M.; OLIVEIRA, C. C.; CÉSAR, B.; ANDRADE, L. F.; DONATTI, L.; DONATTI, L.; GABARDO, J.; TRINDADE, E.; BUCHI, D. Stimulation of lymphocyte anti-melanoma activity by co-cultured macrophages activated by complex homeopathic medication. **BioMed Central Cancer**, v. 293, 2009.

HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCHWARTZ, R. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **J Am Acad Dermatol**. v. 73, n. 6; p. 897-908, 2015.

HEUSSER JÚNIOR, A.; BELLATO, V.; SOUZA, A. P.; MOURA, A. B.; SARTOR, A. A.; SANTOS, E. G. et al. Canine tegumentar leishmaniasis in the town of Balneário Camboriú in the State of Santa Catarina. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 111, p.713-718, 2010.

HSIAO, C. H. C.; UENO, N.; SHAO, J. Q.; SCHROEDER, K. R.; MOORE, K. C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The effect of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of *Leishmania*. **Microbes and Infection**. v. 13, p. 1033-1044, 2011.

JOSHI, S.; YADAV, N.; RAWAT, K.; TRIPATHI, C. D. P.; JAISWAL, A. K.; KHARE, P.; TANDON, R.; BAHARIA, R. K.; DAS, S.; GUPTA, R.; KUSHAWAHA, P. K.; SUNDAR, S.; SAHASRABUDDHE, A. A.; DUBE, A. Comparative Analysis of Cellular Immune Responses in Treated *Leishmania* Patients and Hamsters against Recombinant Th1 Stimulatory Proteins of *Leishmania donovani*, **Front Microbiol**, V. 7. p. 312, 2016.

KAPLAN G, WITMER M. D., NATH, I.; STEINAMAN, R. M.; LAAL S., PRASAD H. K. Effect of long term immunological reactions on human epidermal keratinocytes. **Proc Natl Acad Sci**, v.83, p. 3469-73, 1986.

KATSURAGAWA, T. H.; GIL, L. H. S.; TADA, M. S.; SILVA, L. H. P. Endemias e epidemias na Amazônia. Malária e doenças emergentes em áreas ribeirinhas do Rio Madeira. Um caso de escola. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 111-141, 2008.

KAYE, P. M.; BEATTIE, L. Lessons from other diseases: granulomatous inflammation in Leishmaniasis. **Semin Immunopathol**, v. 38, p. 249–260, 2016.

KILLICK, K. R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin Dermatol**, v. 17, P.279-289, 1999.

KIMA, P. E. Leishmania molecules that mediate intracellular pathogenesis. **Microbes Infect**. v. 16, n. 9, 2014.

KOCYIGIT, A.; GUR, S.; GUREL, M. S.; BULUT, V.; ULUKANLIGIL, M. Antimonial therapy induces circulating proinflammatory cytokines in patients with cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6589-6591, 2002.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends Microbiol**, v. 11, p. 210–4, 2003.

LEAL, G. G. A.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; FRANCISCO, A. T.; CARDOSO, J. M.; MATHIAS, F. A. S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; COURA-VITAL, W. REIS, A. B. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p.472-482, 2014.

LOPES, L.; GODOY, L. M. F.; DE OLIVEIRA, C.C.; GABARDO, J.; SCHADECK, R. J. G.; BUCHI, D. F. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron**, v. 37, p. 277-287, 2006.

MARQUES DA SILVA, K. **Avaliação do efeito da medicação homeopática Antimonium crudum em culturas de Leishmania (*Leishmania*) infantum chagasi**. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP, São Paulo, 2016.

MASSUNARI, G.K.; VOLTARELLI E. M.; SANTOS, D. R.; POIANI, L.P.; DE OLIVEIRA, O. A serological and molecular investigation of American cutaneous leishmaniasis in dogs, three years after na outbreak in the Northwest of Paraná State, Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 25, p.97-104, 2009.

MATTNER, J.; WANDERSEE-STEINHAUSER, A.; PAHL, A.; ROLLINGHOFF, M.; MAJEAU, G. R.; HOCHMAN, P. S.; BOGDAN, C. Protection against progressive leishmaniasis by IFN- β . **J. Immunol**, v.172, p.7574-7582, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560>. Acesso em: 9 dez. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Atitude de Ampliação de Acesso**. 1. Ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. p. 16.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 10, p. 1153-1169, 2007.

MONDAL, J.; DAS, J.; SHAH, R.; KHUDA-BUKHSH, A. R. A homeopathic nosode, Hepatitis C 30 demonstrates anticancer effect against liver cancer cells in vitro by modulating telomerase and topoisomerase II activities as also by promoting apoptosis via intrinsic mitochondrial pathway. **J Integr Med**. v.14, n.3, p. 209-18. 2016.

MORAIS, C. G. V.; LIMA, A. K. C.; TERRA, R.; DOS SANTOS, R. F.; DA-SILVA, S. A. G.; DUTRA, M. L. The dialogue of the host-parasite relationship *Leishmania* spp. And *Trypanosoma cruzi* infection. **BioMed Research**, v. 2015, ID 324915, p. 1-19.

MOREIRA, C. O. C.; COSTA, J. F. F. B.; LEAL, M. F.; ANDRADE, E. F.; REZENDE, A. P.; IMBELONI, A. A.; MUNIZ, J. A. P. C.; SMITH, M. A. C., BURBANO, R. R.; ASSUMPÇÃO, P. P. Lymphocyte proliferation stimulated by activated *Cebus apella* macrophages treated with a complex homeopathic immune response modifiers. **Homeopathy**, v. 101, p. 74-79, 2012.

MUKHOPADHYAY, D.; MUKHERJEE, S.; ROYS, S.; DALTON, J. E.; KUNDU, S.; SARKAR, A.; DAS, N. K.; KAYE, P. M.; CHATTERJEE, M. M2 Polarization of Monocytes-Macrophages is a Hallmark of Indian Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n.10, 2015.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.

MWOLOLO, S. W.; MUTISO, J. M.; MACHARIA, J. C.; BOURDICHON, A. J.; GICHERU, M. M. In vitro activity and in vivo efficacy of a combination therapy of diminazene and chloroquine against murine visceral leishmaniasis. **J Biomed Res**, v. 29, n. 3, p. 214-223, 2015.

NASCIMENTO, K.F. **Alterações na interação *Leishmania amazonensis* - hospedeiro após tratamentos homeopáticos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba, Brazil, 2016.

NAUSEEF, W. M. Nox enzymes in immune cells. **Semin Immunopathol**, v. 30. n. 3, p.195-208, 2008

NAVAS, A.; VARGAS, D. A.; FREUDZON, M.; MCMAHON-PRATT, D. SARAIVA, N. G.; GÓMEZ, M. A. Chronicity of dermal leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis* is associated with parasite-mediated induction of chemokine gene expression. **Infect Immunol**, v. 82, n. 7, p. 2872-80, 2014.

NELSON, P. J.; REES, A. J.; GRIFFIN, M. D.; HUGHES, J.; KURTS, C.; DUFFIELD, J. The renal mononuclear phagocytic system. **J. Am. Soc. Nephrol**, v. 23, p. 194-203, 2012.

OKWOR, I.; UZONNA, J. E.; Pathways leading to interleukin-12 production and protective immunity in cutaneous leishmaniasis. **Cell Immunol**, 2016. DOI: 10.1016/j.cellimm.2016.06.004.

OKWOR, I.; JIA, P.; UZONNA, J. E. Interaction of macrophage antigen 1 and CD40 ligand leads to IL-12 production and resistance in CD40-deficient mice infected with *Leishmania major*. **J Immunol**, v.195, n. 7, 3218-3226, 2015.

OLIVEIRA, W. N.; RIBEIRO, L. E.; SCHRIEFFER, A.; MACHADO, P.; CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p.127-32, 2014

OLIVEIRA, L. F.; SCHUBACH, A. O.; MARTINS, M. M.; PASSOS, S. L.; OLIVEIRA, R. V.; MARZOCHI, M. C.; ANDRADE, C. A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87-96, 2011.

PEREIRA, W. K.; LONARDONI, M. V.; GRESPAN, R.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; CUMAN, R. K.; BERSANI-ARMADO, C. A. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. **The Journal of Infection**, v. 51, n. 2, p. 157-164, 2005.

PIRES, M. Q.; MADEIRA, M. F.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; PACHECO, R. S. Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. **Rev Bras Med Trop**. v. 27, n. 2, p.243-246, 2014.

PONTIN, K.; BURGOS, V. O.; LARA, E. H. G.; A, S. **Avaliação da atividade biológica do bioterápico in vivo sob as formas amastigotas na infecção experimental determinada por *Leishmania (Viannia) braziliensis***. Disponível em: <<http://lamasson.com.br/biblioteca/biblioteca/pesquisahomeopatica/artigo02n2leishmania.html>> Acesso em: 30 abril 2016.

RITTG, M. G.; BOGDAN. Leishmania-host-cell interaction: Complexities and Alternative Views. **Parasitology Today**, v. 16, n.7, p. 292-297, 2000.

ROCHA, V. P.; NONATO, F. R.; GUIMARÃES, E. T.; RODRIGUES DE FREITAS, L. A.; SOARES, M. B. Activity of antimalarial drugs in vitro and in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **J Med Microbiol**, v. 62, p.1001-1010, 2013.

SAHA, S. K.; ROYS, S.; KHUDA-BUKHSH, A. R.; Ultra-highly diluted plant extracts of *Hydrastis canadensis* and *Marsdenia condurango* induce epigenetic modifications and alter gene expression profiles in HeLa cells in vitro. **J Integr Med**, v. 13, n. 6, p.400-411, 2015.

SAMAL, J. Role of AYUSH workforce, therapeutics, and principles in health care delivery with special reference to National Rural Health Mission. **Avu**, v. 36, n. 1.; 2105, p. 5-8.

SANDRI, P.; ALEIXO, D. L.; SANCHEZ FALKOWSKI G. J.; NASCIMENTO JÚNIOR, A. D.; GOMES, M. L.; HERNANDES, L.; MACHADO DE OLIVEIRA DALALIO, M.; MOREIRA, N. M.; TOLEDO, M. J.; GABRIEL, M. DE ARAÚJO, S. M. Trypanosoma cruzi: biotherapy made from trypomastigote modulates the inflammatory response. **Homeopathy**, v. 104, n. 1, p.48-56, 2015.

SANTANA, F. R.; COELHO, C. P.; CARDOSO, T. N.; LAURENTI, M. D.; HURTADO, E. C. P.; BONAMIN, L. V. Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: Thymulin 5cH. **Homeopathy**, v. 103, p. 1-10, 2014. (a)

SANTANA, F. R.; COELHO, C. P.; CARDOSO, T. N.; BENITES, N. R.; HURTADO, E. C. P.; LAURENTI, M. D.; BONAMIN, L. V. Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: Antimonium crudum 30 cH. **Homeopathy**, v. 103, p. 1-11, 2014. (b)

SCHLEIDER, U.; MATTNER, J.; BLOSS, M.; SCHINDLER, H. RÖLLINGH, G.; KARAGHIOSOFF, M.; MÜLLER, M.; WERNER-FELMAYER G.; SCHULTE, J.; ENDLER, P. C. Update on preliminary elements of a theory of ultra high dilutions. **Homeopathy**, v.104, n. 4, p.337-342, 2015.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O.; Cutaneous Leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 9, 581-92, 2016.

SERNEE, M. F.; RALTON, J. E.; DINEV, Z.; KHAIRALLAH, G. N.; O'HAIR, R. A.; WILLIAMS, S. J. MCCONVILLE, M. J. *Leishmania* β -1,2-mannan is assembled on a mannose-cyclic phosphate primer. **Proceedings the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 103, n. 25, p. 9458-9463, 2006.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B. Geographical expansion of canine visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil.. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**,[s.l.], v. 57, n. 5, p.435-438, out. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652015000500012>.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; DE CASTRO GOMES, C. M.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 423-431, 2009.

SINGH, B.; KUMAR, M.; SINGH, A. Evaluation of implementation status of national policy on Indian systems of medicine and homeopathy 2002: Stakeholders' perspective. **Anc Sci Life**. V. 33, n. 2, p. 103-108, 2013.

SOUZA, M. A.; ALMEIDA, T. M.; CASTRO, M. C. A. B.; OLIVEIRA-MENDES, A. P.; ALMEIDA, A.; OLIVEIRA, B. C.; ROCHA, L. F.; MEDEIROS, A. C. R.; BRITO, M. E. F.; DESSEIN, A. J. J. 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.

SOUZA, A. I.; BARROS, E. M. S.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I. M. N.; MARIN, G. R. B.; NUNES, V. L. B. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (L.) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 41-45, 2005.

SUNDAR, S.; SINGH, A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral Leishmaniasis. **Ther. Adv. Infect. Dis.** v. 3, n. 3-4, p.98-109, 2016.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for Leishmaniasis. **Expert. Opin. Pharmacother.** v. 16, n.2, p.237-252, 2015.

SUNDAR, S.; MORE, D. K.; SINGH, M. K.; SINGH, V. P.; SHARMA, S.; MAKHARIA, A.; KUMAR, P. C.; MURRAY, H. W. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clinical Infectious Diseases**, v.31, n. 4, p. 1104-1107, 2000.

SMIT, E.; OBERHOLZER, H. M., PRETORIUS, E. A review of immunomodulators with reference to Canova. **Homeopathy**, v. 98, n. 3, p. 169-176, 2009.

STUTTGART, D. **German Homoeopathic Pharmacopeia**. 3 rd, British Homeopathic Association, 1985.

TEIXEIRA, M. Z. Homeopatia: ciência, filosofia e arte de curar. Rev. Med. São Paulo. p. 30-43, 2006.

TERRAZAS, C.; OGHUMU, S.; VARIKUTI, S.; MARTINEZ-SAUCEDO, D.; BEVERLEY, S. M.; SATOSKAR, A. R. Uncovering Leishmania-macrophage interplay using imaging flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 423, p. 93-98, 2015.

TOLEZANO, J. E.; ULIANA, S. R. B.; TANIGUCHI, H. H.; ARAÚJO, M. F. L.; BARBOSA, J. A. R.; BARBOSA, J. E. R.; FLOETER-WINTER, L.M.; SHAW, J. J. The first records of *Leishmania (L.) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 280-284, 2007.

TUON, F. F.; AMATO, V. S.; GRAF, M. E.; SIQUEIRA, A. M.; NICODEMO, A. C.; AMATO NETO, V. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis –a systematic review with a meta-analysis. **International Journal of Dermatology**, v. 47, n. 2, p. 109-124, 2008

VIEIRA-GONÇALVES, R.; NOGUEIRA, R. S.; HERINGER, J. F.; MENDES-AGUIAR, C. O.; GOMES-SILVA, A.; SANTOS-OLIVEIRA, J. R.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; DA CRUZ, A. M. Clinical and immunological evidence that low doses of pentavalent antimonials are effective in maintaining long-term cure of *Leishmania (Viannia) braziliensis* cutaneous lesions. **Br J Dermatol**. v. 173, n. 2, p. 571-3, 2015.

WADHWANI G. G. Homeopathic drug therapy. Homeopathy in Chikungunya Fever and Post-Chikungunya Chronic Arthritis: an observational study. **Homeopathy**. v. 102, n. 3, p.193-8, 2013.

WHO, World Healthy Organization. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em 22 de Fevereiro de 2016.

ANEXO

Artigo submetido à publicação

High dilutions of antimony modulate cytokines production and macrophage – *Leishmania (L) amazonensis* interaction *in vitro*

Fabiana Rodrigues Santana¹, Luciane C Dalboni¹, Kátia F Nascimento², Fabiana Toshie Konno¹, Anuska M A Saraiva¹, Michelle S F Correia¹, Maristela Dutra Correa¹, Renato C V Casarin³, Elizabeth C P Hurtado¹, Maria Anete Lallo¹, Marcia Dalastra Laurenti⁴, Nilson R Benites⁵, Dorly F Buchi², Leoni Villano Bonamin¹

1. Graduating Program of Environmental and Experimental Pathology. Universidade Paulista, São Paulo, Brazil.
2. Laboratory of Cell Biology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.
3. Faculty of Odontology - Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, Brazil.
4. Faculty of Medicine, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
5. Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Corresponding author:

Leoni Villano Bonamin, DVM, MSc, PhD

Graduating Program of Environmental and Experimental Pathology. Universidade Paulista. Rua Dr Bacelar, 1212 – 4th floor. CEP 04026-002. São Paulo, SP, Brazil.
leonibonamin@unip.br; leonibonamin@gmail.com

Key-words: *Leishmania (L.) amazonensis*, macrophage, cytokine, *Antimonium crudum*

Abstract

Background: In previous results mice treated with high dilutions of antimony presented reduction of monocyte migration to the site of infection with increase in B lymphocytes population in the local lymph node. **Aims:** To know the mechanisms involved, a series of *in vitro* studies was done, using co-cultures of macrophages (RAW 264.7) and *Leishmania* (L.) *amazonensis* treated with different dilutions of antimony, in different times. **Methodology:** Spreading, phagocytosis, the oxidative activity of macrophages, the viability of free promastigotes and the cytokines concentration in the supernatant were evaluated. The assays were performed in quadruplicate. The high dilutions of antimony were evaluated under a physico-chemical approach, using an EDS system. **Results:** Cells treated with AC 30 cH (10^{-58} M) and AC 200 cH (10^{-398} M) presented a temporary reduction of the spreading after 02 hours of incubation, followed by increase after 48 hours, being the most significant increase observed after the AC 200 cH treatment. However, the percentage of internalized parasites at 48, 96 and 120 hours of incubation was also higher in cells treated with AC 200 cH. It is suggested that the AC 200 cH improves the ability of phagocytes to internalize the parasites, but not to digest them. The cytokines panel corroborated these results. Both dilutions potentiated the parasite-induced reduction of cytokines production, especially IL-6, IL 12 p40 and IFN gamma, after 48 hours of incubation. In addition, the production of MIP-1 beta (CCL4) and RANTES, two cytokines involved in chronic inflammation, were also reduced after 120 hours. A specific effect of AC 30 cH was seen by the inhibition of two peaks of CCL2 (MCP-1) observed in infected macrophages, at 24 and 120 hours. Since this cytokine is an important chemokine for monocytes, it explains the results obtained formerly *in vivo*. The morphology of macrophages after acridine orange staining revealed that the treatment with AC 30 cH reduced substantially the acid vacuoles in the cytoplasm, indicating a certain inability of these cells to digest the parasites. On the other hand, a large peak of VEGF-A, associated with increase of internalized parasites was observed after 120 hours of treatment with AC 200 cH, which could be associated to the regulation of the chronic inflammation events by M1-M2 polarization. There was no statistical difference among groups regarding the production of TNF, NO and H_2O_2 , showing that the drugs do not alter macrophage cytotoxic activity. The results seem not to be related to the nature of microparticles found in both antimony dilutions, although a clear variation of the modulatory effects of AC 30 cH and 200 cH was seen, in function of time. **Conclusions:** Both dilutions were able to potentiate the decrease of most of cytokines and chemokines induced by the parasite infection *in vitro*, which explains the clinical improvement seen previously *in vivo*, however, the mechanisms involved and the epidemiological significance of these findings are still under discussion.

Highlights

High dilutions of antimony (prepared according to homeopathic methods) are able to modulate macrophage – *Leishmania amazonensis* interaction *in vitro*, regarding to spreading, phagocytosis and cytokines production in function of time.

IL 6, IL 12 p40 and alpha INF were reduced after 48 hours of incubation and MIP-1 beta (CCL4) and RANTES were reduced after 120 hours for both dilutions (AC 30cH or 10-58M and AC 200cH or 10-398M).

Two peaks of CCL2 (MCP-1) were seen in infected macrophages, at 24 and 120 hours, but they disappeared after AC 30cH treatment.

A peak of VEGF associated to increase in the number of internalized parasites was observed after 120 hours following the treatment with AC 200cH.

The physico-chemical nature of microparticles found in both dilutions was characterized in a EDS (Energy-dispersion X-ray Spectrophotometry) system, but without direct correlation with the results.

The observed outcomes are in accordance with anti-inflammatory effect of high diluted antimony obtained previously *in vivo* and give a mechanistic explanation to them.

The clinical usefulness and epidemiological implications of this discovery are still under discussion.

INTRODUCTION

The protozoans *Leishmania* spp. infect resident tissue macrophages to their intracellular replication. These protozoans cause a heterogeneous group of subtropical and tropical neglected diseases, known as leishmaniasis, which have a variety of symptoms, from skin lesions to fatal visceral leishmaniasis [1,2]. The parasite has a life cycle, alternating between a mammal host and insect vectors; sand flies (Diptera: Psychodidae, subfamily Phlebotominae) of *Phlebotomus* and *Lutzomyia* genre are vectors of different species of *Leishmania* [3].

About 95% of cases of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) occur in the Americas, the Mediterranean Basin, the Middle East and Central Asia. More than two thirds of new cases of cutaneous leishmaniasis occur in six countries: Afghanistan, Algeria, Brazil, Colombia, Iran and Syria. It is estimated that 0.7 million to 1.3 million new cases occur worldwide each year. Almost 90% of cases of mucocutaneous leishmaniasis occur in Bolivia, Brazil and Peru [4,5].

The clinical forms of ATL are characterized as cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, which may be presented as a single skin ulcer or as painless multiple dermal nodules, in the form of mucocutaneous lesions [6]. The species that cause ATL in humans and animals are *Leishmania (Leishmania) amazonensis* [7,8] and *Leishmania (Viannia) braziliensis* [9-11].

In the context of the immune response, the factors that predispose to resolution or persistence of infection involve since the healthiness of the host immune system [12,13] to the parasite species [14], besides the possible patterns of relationship between parasite and host cell [15,16]. After recognition of the parasite, macrophages are activated and can phagocytose and destroy the parasites through the generation of oxidative burst and nitric oxide production [17,18] although the escape mechanisms of the parasites are difficult to overcome. The phagocyte surface receptors serve as an entryway for these parasites and can interfere with the outcome of phagocytosis [19]. Hsiao and colleagues [20] demonstrated that U937 macrophages lineage are able to allow replication and cell spreading of *Leishmania infantum chagasi* after 72 hours of incubation, while cells derived from primary cultures of human monocyte did not show the same behavior. The CR3 expression was higher in this latter than in the former, suggesting that the entry of the parasites via opsonin receptor hinders their survival within phagocyte.

Infection by *Leishmania spp* induces the production of certain cytokines by infected cells and inhibit others to modulate the local cell recruitment and cell differentiation in order to facilitate the parasite reproduction [21,22]. The response profile also comprises adaptive immunity, thus, in the stimulation the M1 macrophage [23] and of CD4⁺ Th1 lymphocytes there is IL-1, IL-2, IL-12, IFN- γ and TNF- α production to promote macrophage activation. In the case of Th2 stimulation, the involved cytokines are IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13, which inhibit macrophage activation and contribute to the survival of the protozoans [24,25]. The polarization of infected macrophages to the M2 pattern also seems to be an important event in the evolution of leishmaniasis. The VEGF production associated with inhibition of NO, TLR-4⁺, TLR-2⁺, IL-1 β , IL-6 and IL-8 shows such a polarization [26,27]. Also, the balance between IL27 and IL17 cytokine is also a critical factor in the evolution of chronic lesions of visceral leishmaniasis [28]. Thus, the panel of cytokines involved and their signaling pathways determine the dichotomy of the immune response and the evolution of the lesions.

The pentavalent antimonial drugs are the first choice for the treatment of cutaneous lesions in the ACL [29] and induce the increase of various pro-inflammatory cytokines in plasma of treated patients, such as IL-1 β , IL- 6, IL-8 and TNF-alpha, contributing to a more effective immune response [30]. However, the high probability of drug resistance has been a limiting factor for the use of pentavalent antimony [31] and increased the TGF- β [32]. In addition, various side effects are reported as skeletal muscle pain, nausea, vomiting, diarrhea, abdominal pain, headache, anorexia, asthenia, fatigue, fever, rash, erythema and urticaria [33]. Other drugs are also used for the treatment of leishmaniasis, as amphotericin B, mefloquine and chloroquine, but the toxicity and resistance are also prevalent in these cases [34,35]. In a previous study it was shown that the antimony sulfide prepared at high dilution, according to the homeopathic pharmaceutical techniques, was able to inhibit chronic inflammatory response and possible clinical improvement with increased quality of life of mice infected experimentally with *Leishmania (L) amazonensis* [36]. Thus, in this study we seek for more refined data to explain the macrophage behavior towards treatment with high dilutions antimony *in vitro*, using the model of co-culture with *Leishmania (L) amazonensis*. Important to mention that homeopathy is officially recognized in several countries, some of them endemic for leishmaniasis, such as Brazil, India, Mexico and Cuba. In Brazil, the use of homeopathy in the Unified Health

System (SUS) follows the guidelines of the National Plan on Integrative and Complementary Practices (PNPIC) of the Brazilian Ministry of Health [37]. In India, with the creation of Ayush Ministry (*Ayurveda, Uoga, Unani, Siddha* and *Homeopathy*) in 2005, homeopathy has joined the management policy of community health problems [38,39].

Basic research in homeopathy has developed a lot in recent years, especially in the elucidation of its immuno-regulatory role under different experimental conditions [40-43] including those involving parasitic diseases [44-51]. Also, new data on the epigenetic mechanisms involved in their biological effects, involving the regulation of gene expression [52-57] and the characterization of physical and chemical aspects specific to the highly diluted preparations has also emerged in recent studies, in particular the finding about the presence of nanoparticles of different natures, even in the very high dilutions, above the Avogadro's number [58-64]. Thus, homeopathy insertion within the nanopharmacology context has contributed to clarify fundamental questions about its effectiveness, so far poorly studied.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design

Antimony was prepared in high dilutions in accordance with the methods described in Brazilian Homeopathic Pharmacopoeia - 3rd Edition, 2011. Two dilutions were studied: 10^{-58} M (AC 30cH) and 10^{-398} M (AC 200cH). The activity of RAW 264.7 macrophages infected with *Leishmania (L.) amazonensis* was evaluated at 02, 24, 48, 72, 96 and 120 hours of treatment. Uninfected cells and infected but untreated cells were used as controls. The spreading, the percentage of phagocytosis, the production of ROS, NO and cytokines, as well as the viability not phagocytosed parasites and cell morphology were assessed at different times.

Morphological analysis of the cells kept in co-culture and subjected to different treatments was made by light microscopy using Giemsa staining method and fluorescence microscopy using vital acridine orange dye. In this case, the DNA (parasitic and macrophagic) is observed in green by metachromasia and the phagocytic acid vacuoles are seen in orange. This method enables the evaluations of patterns of interaction between the parasite and the host cell after phagocytosis. To observe the adherence of parasites to macrophages at the time of interaction the scanning electron microscopy was made after 30 minutes of incubation.

Preparation of drugs

The highly diluted antimony was prepared according to the regulations of the Brazilian Homeopathic Pharmacopoeia - 3rd Edition, 2011, being named *Antimonium crudum* (AC). According to international regulations, this preparation is made from the mineral antimony sulfide (Sb_2S_3) with purity of at least 95% [65], (STUTTGART, 1985), which is triturated 1:10 in lactose, in three successive passages. The product of this grinding is diluted into 20% ethanol in proportion 1:100 w/v, so called *Antimonium crudum* 4 cH (fourth centesimal Hahnemannian dilution). The following dilutions are made serially in 70% alcohol, always in the ratio 1:100, until reach the desired dilution. For each dilution a 100 times vertical shaking (named succussion) is made.

In this work, the stock dilutions were purchased from homeopathic pharmacy HN Cristiano®, São Paulo, Brazil, accredited by the National Health Surveillance Agency - Brazil (ANVISA). All dilutions were prepared according to the method described above, up to 29 cH and 199cH. In both cases, the work dilutions, also at a 1: 100 ratios, were prepared in our own laboratory, at the time of use, using pure autoclaved water obtained by reverse osmosis. Then, they were succussed in a mechanical arm (Denise - Autic®) suitable for use in homeopathic pharmacies. The calculated concentration of antimony was $1.21 \times 10^{-58} \text{M}$ (for AC 30cH) and $1.21 \times 10^{-398} \text{M}$ (for AC 200cH).

After preparation, the labels of the bottles were exchanged for staff not involved in the experiment laboratory. The labels were replaced by codes and they were stored in a sealed envelope by the end of the statistical analysis. Thus, the experimental procedure was carried out **in blind**.

The physical-chemical profile of AC 30cH medicines and AC 200cH was determined by the technique of EDS (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) to identify the elements present in the suspended micro-particulate observed in scanning electron microscopy. Thus, 500 μl of the AC 30 cH and AC 200 cH dilutions were centrifuged, respectively, in a spin micro-centrifuge at 5000 rpm during 30 minutes. The superficial water column that was present in the microtube was carefully withdrawn, using a micropipette, and the last 10 microliters located in the bottom of the flask was homogenized again using a vortex device, transferred to the surface of a stub and dried at 25°C in a closed compartment to avoid dust deposition, before to be analyzed at SEM/EDS vacuum microscope JEOL JSM 6510, field emission operated at 10kV. The stub was previously cleaned with pure acetone and dried at room temperature in the same compartment before use. Since only solid inorganic micro-structures were observed, there was no need of sample metallization. The microparticles were observed in a range of 10 to 25 μm field and selected one-by-one for EDS analysis, to make its nature known. The analysis of the micro-particles was made selecting a central field of the stub and 25 micro-crystals were randomly selected on the stub surface for chemical elements quantification. For the samples that presented less than 25 particles, all of them were considered to the analysis. The morphology of the particles was not evaluated, since they are composed of a random aggregate of different elements. Thus, only the nature of the chemical elements found in each particle was observed. Copper, lead, carbon and

oxygen were considered as background, since they are part of the stub or of the solvent (alcohol 70%) constitution.

Twenty-four particles were randomly selected for the evaluation of AC 30cH. Due to the highly dilution procedure, no antimony atom was identified. Beryllium, Sodium, Aluminum, Sulfur and Chlorine were identified, being Chlorine and Sodium the most common contaminant elements found in 7 and 4 of the particles, respectively. Fifteen particles were found in the AC 200cH preparation. Sodium, Calcium, Zinc, Niobium, Bismuth and Mercury were identified in this sample, with sodium, calcium and Niobium the most frequently found in 6 of the 15 analyzed particles. The distribution of elements in the particles showed fully random character. The mean percentage of each element atoms per particle ranged from 0.01 to 8.66%. The values are shown in **Box 1**.

Box 1. Average percentage of atoms of different chemical elements per particle, identified in the sediment of the drugs studied, after ultra-centrifugation and analysis in EDS system coupled to scanning electron microscopy (SEM / EDS vacuum microscope JEOL JSM 6510, field emission operated at 10kV).

Element	AC 30cH	AC 200cH
Beryllium	0.77 ± 2.609	-
Sodium	$4.97 \pm 12,690$	$8.66 \pm 11,980$
Aluminum	$00:06 \pm 0.194$	-
Sulfur	$0:01 \pm 0.065$	-
Chlorine	0.66 ± 1.093	-
Calcium	-	$2:43 \pm 4,022$
Zinc	-	0.72 ± 2.773
Niobium	-	$5:00 \pm 12,716$
Mercury	-	$1.96 \pm 7,593$
Bismuth	-	$0:19 \pm 0.738$

Protocol of co-culture of macrophages and *Leishmania amazonensis*

The Federal University of Paraná (UFPR), Brazil, provided RAW 264.7 macrophages used. Initially, sterile round coverslips were added to sterile 24-well plates, for sowing macrophages. They were previously expanded in bottles for cell culture in RPMI-1640 medium (CUTILAB). After confluence of the cells reached 90%, cell detachment was held with the help of the Cell Scraper (SARSTEDT) and centrifuged for 3 min at 1000 rpm. The supernatant was discarded and the pellet was

homogenized in RPMI-1640 for cell counting in a Neubauer chamber, using 0.4% Trypan blue (MERCK) to check cell viability. The cells were distributed in plates with the amount of 5×10^5 per coverslip, added with RPMI-1640 (CULTILAB) enriched with 10% fetal bovine serum (GIBCO), in sufficient amount to complete 500 μ L per well.

The incubation of the plate was performed in a CO₂ incubator at 37°C for 4 hours, for adhesion of macrophages. Then, 10 parasites by macrophage were inserted in each well, followed by incubation at 34°C for 4 hours in RPMI-1640 to the internalization of parasites. *Leishmania (L) amazonensis* strain MHOM/ BR/ 73/ M2269 was provided by the Faculty of Medicine, University of São Paulo - FMUSP. The parasites were obtained in pure culture and maintained in RPMI-1640 medium (10 ml), 25°C, supplemented with 10% fetal bovine serum, 2% male human urine and 1% penicillin (100U/ml) and gentamycin (0.1 mg/ml). After internalization, the drugs were filtered through Millipore® 22-micron filter to prevent contamination and added in equal volume to 20% of the culture medium. A strengthening treatment was done after 24 hours, by volume equal to 1% of the culture medium. Cultures were maintained at 37°C in a CO₂ incubator at different times: 2, 24, 48, 72, 96 or 120 hours, depending on the analysis performed. Samples were treated in quadruplicate. For the analysis of spreading and phagocytosis, three series of experiments were performed for each time, which generated a total of 12 *datapoints* for each treatment studied.

Giemsa staining

Coverslips, allocated at the bottom of each well, were washed two times with PBS (SIGMA), and then, absolute methanol was added for 15 minutes to fix the cells. The Giemsa stain, already filtrated, was placed on coverslips to overlay them for 15 minutes. Then, the cover slips were washed with distilled water, dried and the next day were quickly passed in Xylene and assembled with Entellan® (MERCK) on histological slide.

Analysis of spreading and phagocytosis

Ten microscopic fields per coverslip stained with Giemsa were recorded in digital photos (NIKON Eclipse 200 Microscope with Coolpix® capture system) using

a 40x objective. The images were analyzed in Metamorph® software for automatic measurement of the area of each macrophage (*spreading*). The percentage of phagocytosis was determined by the ratio of visual count of phagocytosed and not phagocytosed protozoans, totaling 10 fields per coverslip. The percentage was used as a parameter instead of phagocytic index because in all tests 100% of the cells have phagocytosed at least one parasite.

Viability of not internalized promastigotes

The observation of the number of parasites not internalized and possible occurrence of apoptosis by secretion of pro-apoptotic substances by the infected and treated macrophages were checked in this step. The count of free promastigote forms in the supernatant was taken at 24, 48 and 72 hours, using the automated method Countess® (LIFETECH) and ANNEXIN-PI KIT® (LIFETECH) to evaluate the apoptotic index, following the guidelines of manufacturer.

Hydrogen Peroxide Release Assay

Macrophages were suspended in RPMI-1640 medium and plated in quadruplicate in 96 flat bottom well culture plate, at a concentration of 10^4 cells in 100 μ l per well. Incubation took place for 2 hours in CO₂ incubator at 37°C. After this time, the culture medium was replaced and 10^5 promastigotes were inserted; the culture plates were incubated for 24 hours at 37°C in a CO₂ incubator. Then, 100 μ l of buffer were added to each well, which was a mixture of three solutions: solution 1 (80 ml distilled water, 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH₂PO₄, 1.15 g Na₂HPO₄), solution 2 (30 ml of distilled water and 0.3 g CaCl₂) and the solution 3 (30 mL distilled water and 0.64 g MgCl₂). In addition, 0.1 ml of phenol red (INLAB) was added to the solution, with 0.1 ml of Peroxidase (SIGMA), 1 ml of Glucose (DINÂMICA) and 7.8 ml of distilled water. This final solution was distributed in 100 μ l per well, together with 10 μ l of phorbol myristate acetate, PMA (SIGMA). The incubation was carried out for 1h at 37°C in a CO₂ incubator. To block the reaction, 10 μ l of NaOH (DINÂMICA) 1N was added into each well. Finally, the reading was performed on ELISA reader, with a 620nm filter.

Nitric Oxide Production Assay

Supernatants from cells kept in co-culture at different times of treatment were transferred to the plate reader, where the Griess reagent [1% sulfanilamide (SIGMA), added to 0.1% of NEED (SIGMA) and 2.5 % of phosphoric acid (SIGMA)] was added at a ratio of 1:1 (v/v) in the supernatant and incubated for 10 minutes. Then, the plate was read in ELISA reader, at 540nm. Subsequently, reading values were compared to a standard curve of NaNO₂ (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781 μ M) and results were expressed in μ M of nitrite released by 5×10^5 cells.

Cytokines Dosage

Culture supernatants of infected macrophages were harvested after 02, 24, 48, 72, 96 and 120 hours, for subsequent centrifuging and freezing at -80°C. The dosage of cytokines was made by Luminex MAGPIX® method (EMD Millipore®), using the MILLIPLEX MAG PIX for 13 cytokines, according to the manufacturers' instructions: IL-1 alpha, IL-1 beta, IL 6, IL 10, IL-12 p40, IL 12 p70, MIP-1 beta / CCL4, IFN gamma, MCP-1 / CCL2, RANTES / CCL 5, GM-CSF and VEGF-A. The results were expressed as pg/ml. Samples with amounts below the detection limit were recorded as "zero" and samples above the limit determined by standard curve were recorded as the highest value of the curve.

Fluorescence Microscopy and morphological analysis

Coverslips containing co-cultures RAW macrophages and *Leishmania (L.) amazonensis* of 2, 24 and 120 hours were incubated with acridine orange dye (INLAB) to verify the phagocytic activity in real time. The fluorescent dye marks the cellular DNA in green, by metachromasy process, when observed in a fluorescence microscope (OLYMPUS BX60). The lysosomes and acidic vacuoles (phagolysosomes) are marked in orange, whose intensity reflects the degree of acidity of the structure. Thus, it is possible to observe internalized leishmanial parasites and its relationship with the phagocytic vacuoles. Representative microscopic fields were recorded in digital capture system (Eye Camera DINO-EYE®, AM7023) with a resolution of 5 MP.

Scanning Electron Microscopy

The scanning electron microscopy (SEM) was carried out in partnership with the Federal University of Paraná-UFPR. After 02 hours of plating RAW 264.7 macrophages on glass coverslips, co-cultured with the parasites at 37°C in 5% CO₂, the cells were washed twice with 0.1M sodium cacodylate buffer (MERCK), pH 7.2. Then, the cells were fixed for 1 hour with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer and post fixed in 1% osmium tetroxide, in the same buffer for 1 hour in the dark. The samples were dehydrated in alcohol battery (MERCK) 30, 50, 70, 90 and 100%. After, they were submitted to the critical point apparatus CO₂ Dryer Model CPD030 (BALZERS PFEIFFER) and metalized with gold in SCD 030 apparatus (Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) for further observation in Scanning Electron Microscope VEGA3 LMU (TESCAN), with magnitude ranging from 20 to 60 micrometers.

Statistical analysis

Data were analyzed by ANOVA / Tukey-Kramer or Kruskal-Wallis / Dunn methods, according to the result of the Bartlett test for each variable and time of observation. The Bartlett test allows the determination of homoscedasticity of the variables for the choice of parametric or non-parametric tests. The two way ANOVA was used to verify the presence of interaction between treatment and time. Analyses were performed in PRISM 7.0 software. In all cases, the values $p \leq 0.05$ were considered significant.

RESULTS

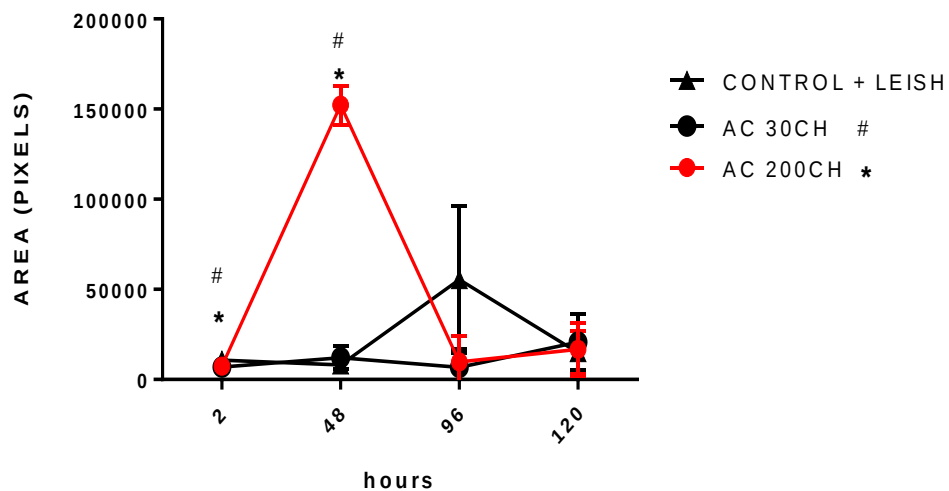
Spreading and phagocytosis

The times of 02, 48, 96 and 120 hours were evaluated for spreading and phagocytosis. Cells treated with AC 30cH and 200cH showed transitory reduction of spreading compared to the control after 2 hours of incubation, followed by increase after 48 hours, being this increase even more significant after treatment with AC 200cH (Kruskal-Wallis / Dunn, $p < 0.05$). The peak of spreading in infected untreated cells (control + *leishmania*) occurred after 96 hours (**Figure 1**). The additional analysis with two-way ANOVA showed interaction between time and treatment in

relation to spreading ($p < 0.0001$), it means the time factor affects the outcome of treatment.

The percentage of phagocytosis ranged from 40 to 80% as function of time, showing the ability of parasites and phagocyte alternate digestion and proliferation. Despite this variation, the cells treated with AC 200cH showed increase in the percentage of parasites internalized at 48, 96 and 120 hours of incubation compared to control (Kruskal-Wallis / Dunn, $p < 0.05$) (**Figure 1**).

A



B

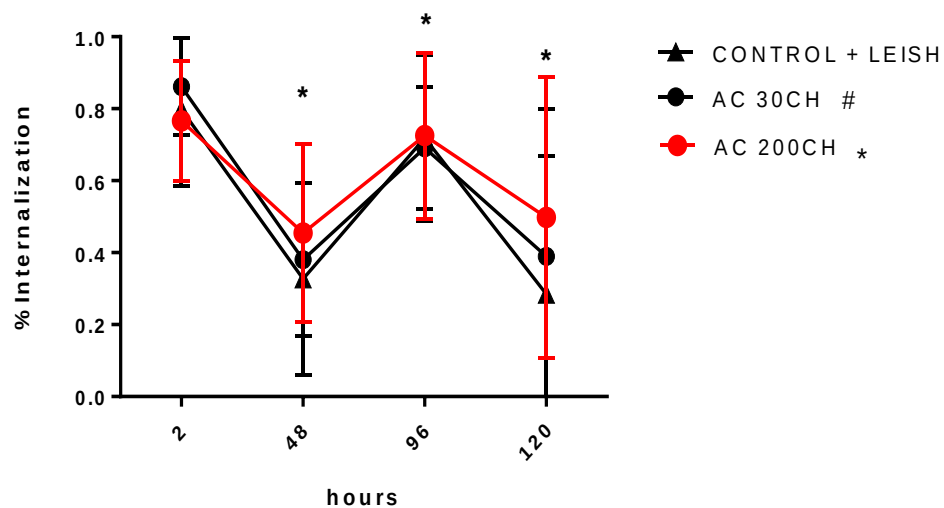


Figure 1: (A) Area (spreading) of macrophages (pixels) and (B) percentage of phagocytosis (%) of *Leishmania (L.) amazonensis* co-cultured with RAW 264.7 macrophages and treated with AC 30cH (#) and AC 200cH (*) in function of time (hours). Values represent mean and standard deviation. *# $p < 0.05$, Kruskal-Wallis / Dunn, compared to control.

Presence of free amastigotes in the supernatant and its viability

The free promastigotes counting in the supernatant after 24 hours of incubation showed increase of the parasites number in co-culture treated with AC 30cH (ANOVA, Tukey Kramer, $p < 0.05$) compared to control. The percentage of positive parasites to annexin did not differ among groups, showing that the treatment did not interfere with the parasites ability to develop apoptosis (**Figure 2**).

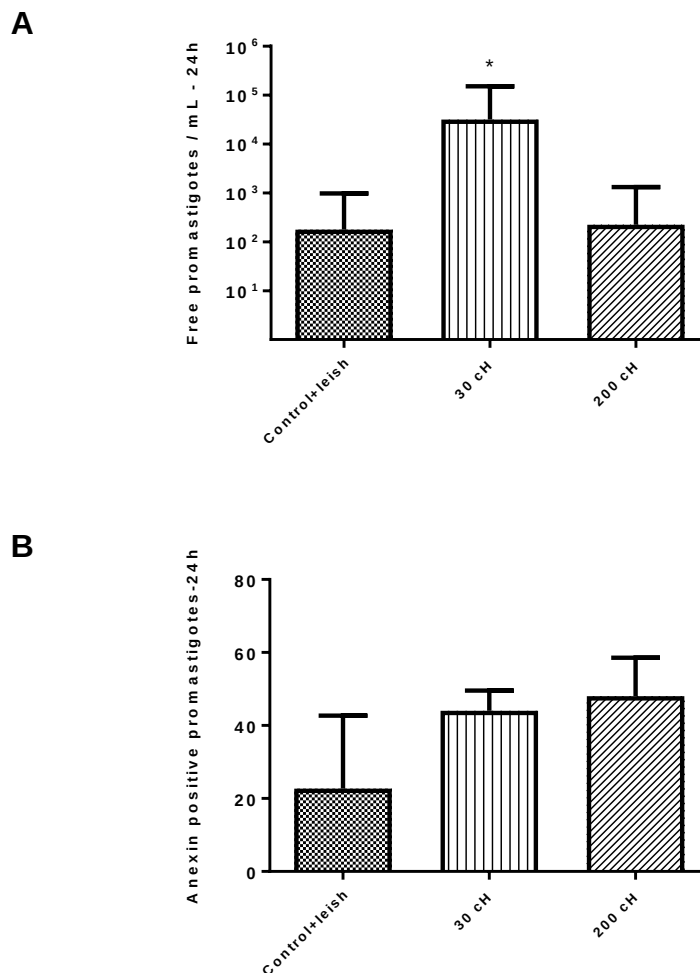


Figure 2. (A) Number of free promastigotes in the supernatant and (B) number of annexin-positive promastigotes per hundred cells after 24 hours co-culture of RAW 264.7 macrophages and *Leishmania (L.) amazonensis* treated with AC and AC 30cH 200cH. Values represent mean and standard deviation. * $p < 0.05$; ANOVA, Tuckey Krammer, compared to control.

NO and hydrogen peroxide (H₂O₂) metabolites production

There was no statistical difference among the groups in relation to the production of NO and H₂O₂ in any of the studied times (data not shown).

Cytokine and VEGF-A production kinetics

IL6, INF gamma and IL12 p40 were defined as parametric variables according to Bartlett test. A significant reduction of these cytokines was seen after 48 hours in all infected cultures, being even more reduced after AC 30cH and AC 200cH treatments, with statistical significance in relation to untreated infected cells. Interaction between time and treatment was also significant, according to Two-way ANOVA ($p < 0.05$), indicating that time is an interference factor in the observation of AC 30cH and AC 200cH effects (**Figure 3**). GM-CSF, IL12 p70 and IL10 presented the same profile, but with high variance index, being non-parametric variables. No statistical significance was seen in this case (Kruskal-Wallis/Dunn) (**Figure 3**).

IL-1 alpha and IL-1 beta have been identified as non-parametric variables and showed no statistically significant differences between groups (Kruskal-Wallis). There is, however, a clear tendency IL1 beta have the same profile of other cytokines regarding the inhibition of the peak in 48 hours, as seen in the infected cultures. IL 1 alpha showed a peak in 72 hours only in infected and untreated cultures. This peak was delayed for 120 hours in the infected and treated with AC 30cH cultures (**Figure 4**).

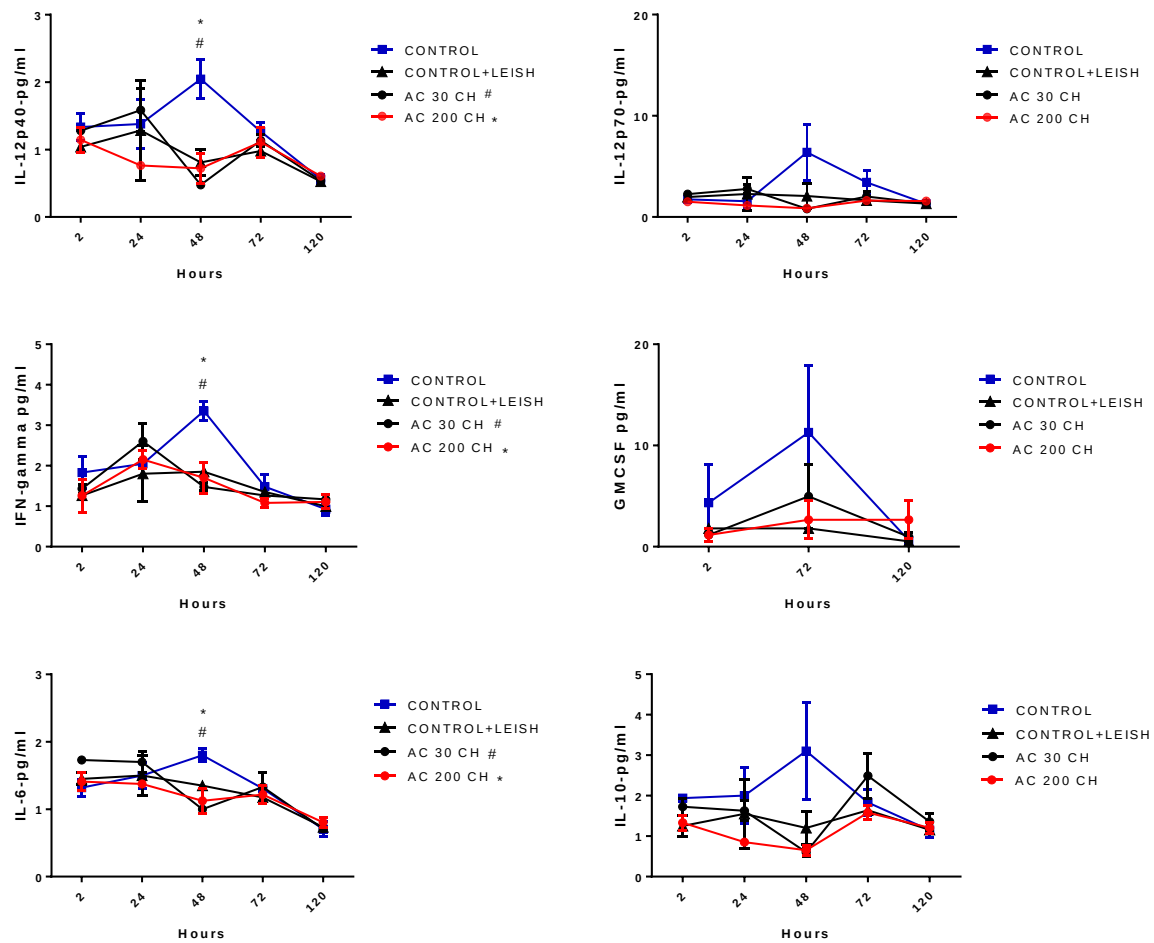


Figure 3: Cytokines IL12 p40, p70, IL12, IFN gamma, GM-CSF, IL6 and IL10 concentration (pg/ml) measured from the supernatant of macrophages and *Leishmania (L.) amazonensis* co-cultures treated with AC 30CH(#) and AC 200CH(*). Values represent mean and standard deviation. *# $p < 0.05$, Two-way ANOVA compared to uninfected control after 48 hours of incubation.

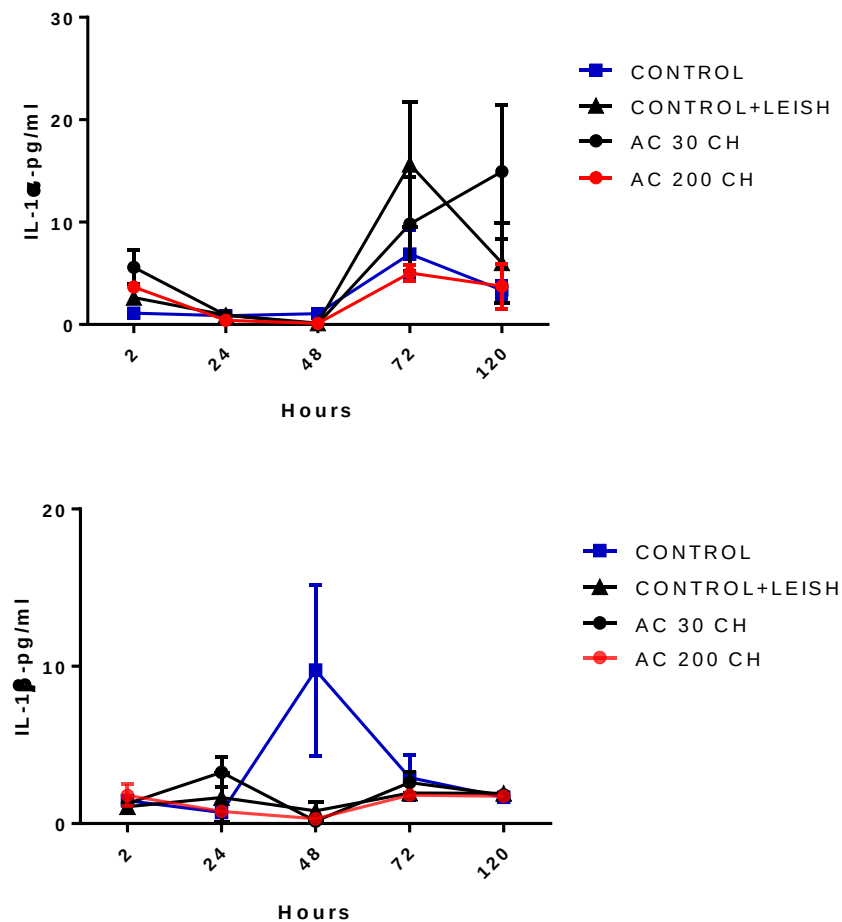


Figure 4: Concentration of pro-inflammatory cytokines IL-1 α and IL-1 β (pg/ml) measured from the supernatant of macrophages and *Leishmania (L.) amazonensis* co-cultures treated with AC 30cH and AC 200cH. Values represent mean and standard deviation. Kruskal-Wallis / Dunn.

MIP-1 beta (CCL4) and RANTES (CCL5) presented their peaks lately, which were reduced after 72 hours in all infected cultures. This decrease was even more intense after both treatments (Kruskal-Wallis/Dunn, $p < 0.05$). These results are shown in **Figure 5**.

Two peaks of MCP-1 (CCL2) were seen in infected macrophages, at 24 and 120 hours, but only AC 30cH inhibited them (**Figure 6**), however, due to the high variability of this cytokine, no statistical significance was observed. The trend of AC 30cH to block this peak is compatible to the effects observed *in vivo* (Santana *et al.*, 2014 a), since CCL2 is an important chemokine involved in monocyte recruitment to the inflammation site.

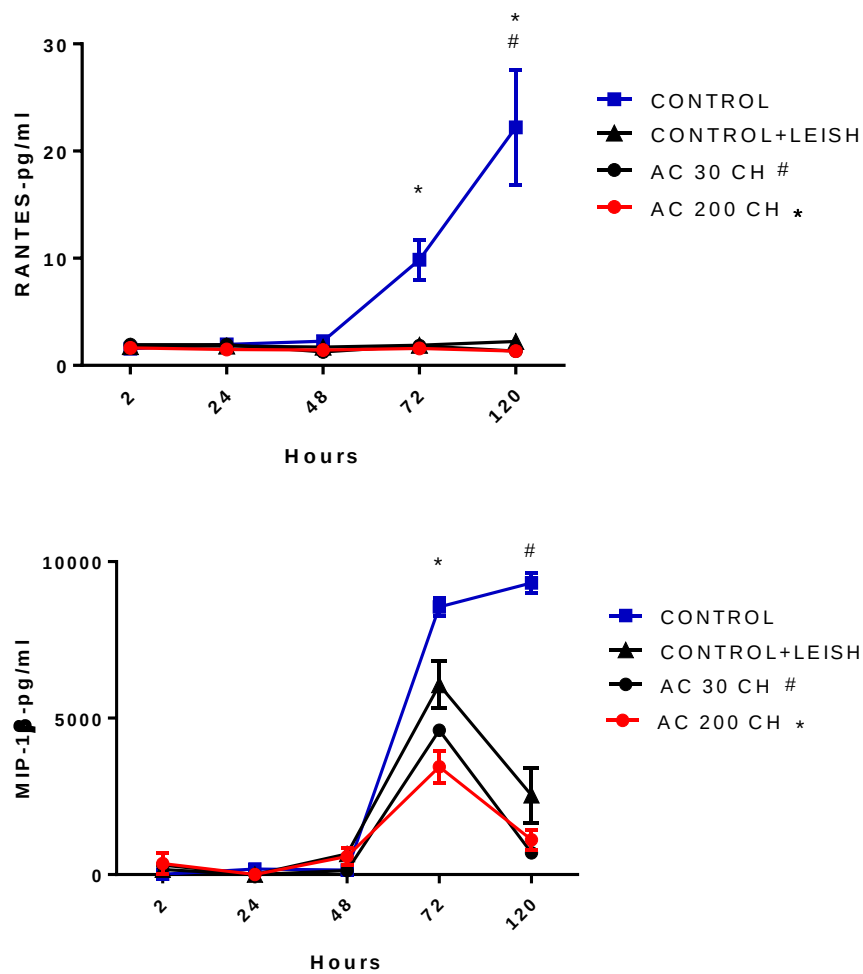


Figure 5: Concentration of RANTES and MIP-1 beta (CCL4) (pg/ml) measured from the supernatant of macrophages and *Leishmania (L.) amazonensis* co-cultures treated with AC 30 CH (#) and AC 200 cH (*). Values represent mean and standard deviation. *p<0.05 and #p <0.05, Kruskal-Wallis / Dunn, in relation to the uninfected control.

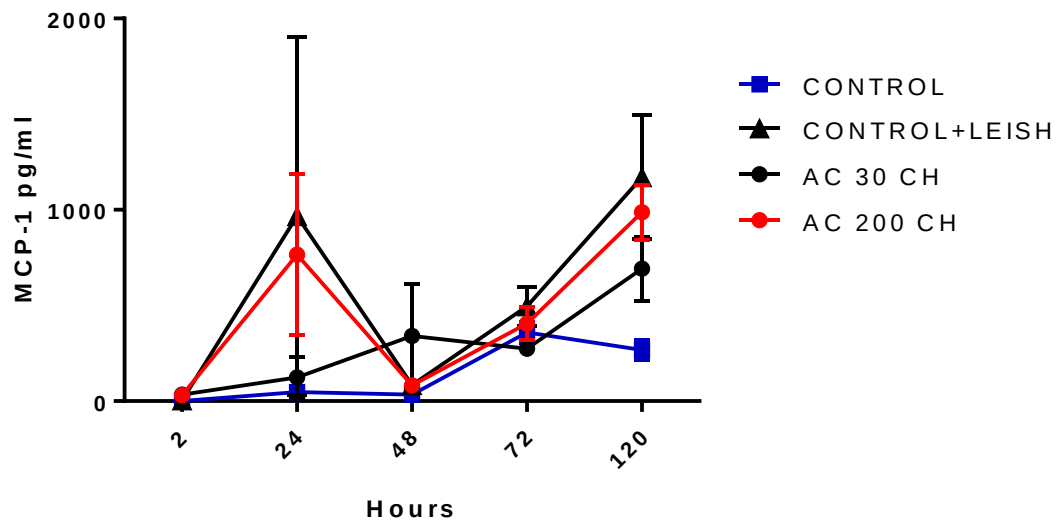


Figure 6: Concentration of MCP-1 (CCL2) (pg / ml) measured from the supernatant of co-cultures of macrophages and *Leishmania (L.) amazonensis* treated with AC 30 cH and AC 200 cH. Values represent mean and standard deviation. Kruskal-Wallis / Dunn.

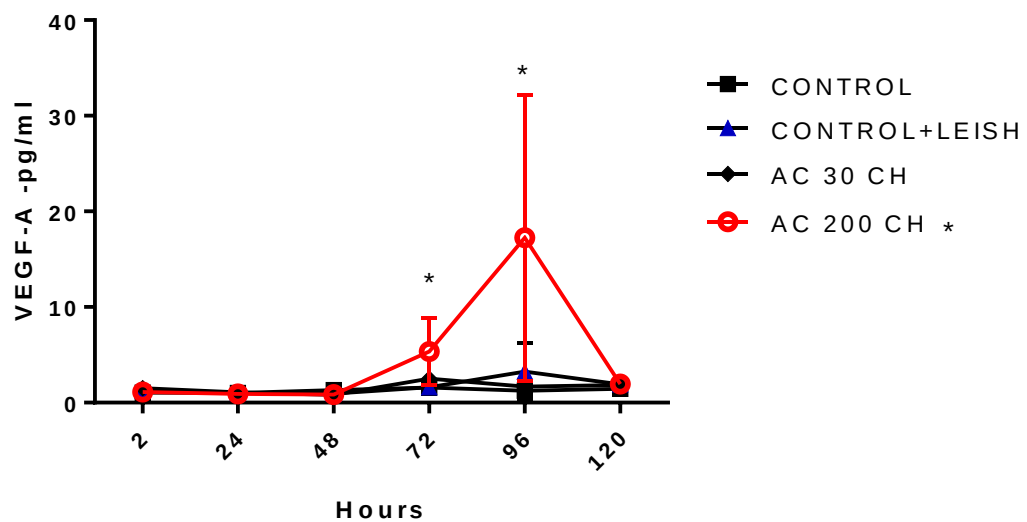


Figure 7: VEGF-A concentration (pg / ml) measured from the supernatant of macrophages and *Leishmania (L.) amazonensis* co-cultures treated with AC 30cH and AC 200cH. Values represent mean and standard deviation. *p<0.05 Kruskal-Wallis / Dunn, in the uninfected control.

A late increase (72 to 96 hours) with a clear peak of VEGF-A after 96 hours was observed in samples submitted to the treatment with AC 200cH, regarding to untreated control (Kruskal-Wallis/Dunn, $p < 0.05$) (**Figure 7**). This late increase in VEGF-A levels in supernatant of macrophages treated with AC 200cH is compatible with the highest percentage of internalized parasites in the later stages of co-culture, as shown in **Figure 1**.

Morphology

The observation of cell morphology by fluorescence microscopy using the acridine orange method was taken at different times, representing both the start of phagocytosis (2 hours of incubation) and chronic phase (120 hours). The observation of the Giemsa stained cells was performed in the same times (**Figures 8 and 9**).

After 2 hours of incubation, cells of control and AC 200cH groups showed acid vacuoles with well-defined contours, scattered throughout the cytoplasm. In contrast, the AC 30cH treated group exhibited macrophages practically free from acid vacuoles, denoting smaller capacity of parasites digestion (**Figure 8**).

The cells stained with Giemsa after 2 hours of incubation and the scanning electron microscopy accomplished in fixed material after 30 minutes of incubation showed that there is no qualitative difference between treatments in the process of internalization of parasites *per se* (**Figures 8 and 10**).

In the chronic phase, after 120 hours, the presence of internalized amastigote forms was well established in control cells, without the presence of vacuoles acids, which were still seen in co-cultures treated with AC 30cH. The comparison of this pattern in different times suggests certain "delay" in phagocytic activity induced by AC 30cH, which could be associated with the delay in the peak of IL-1 alpha (**Figure 4**). Some tiny parasitic forms are seen between macrophages, not possible to determine if they were not phagocytosed or eliminated *a posteriori* from the host cell. The treatment with AC 200cH, shown in 120 hours, displayed the same pattern seen in the acute phase, with homogeneous distribution of acid vacuoles in the cytoplasm and the presence of undigested parasites, easily seen in Giemsa staining. Note that the presence of multinucleate cells become apparent in this group (**Figure 9**).

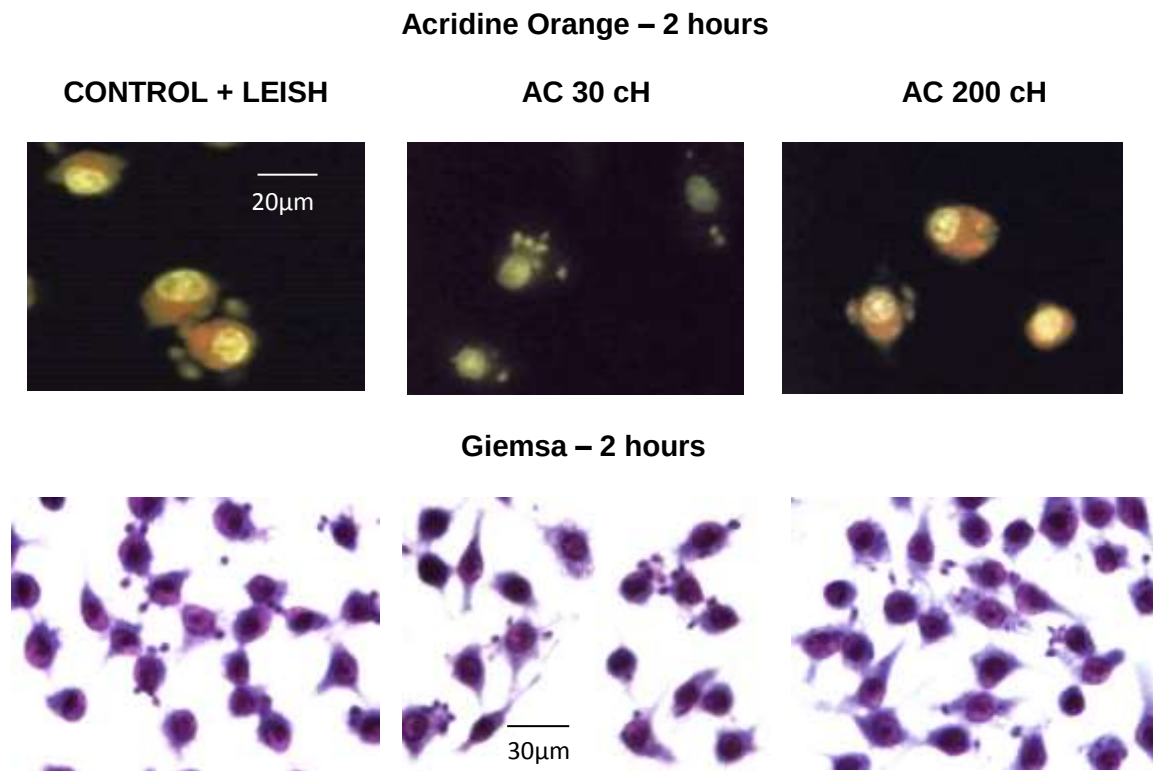


Figure 8: Morphology of RAW 264.7 macrophages maintained in co-culture with *Leishmania (L) amazonensis* and stained by acridine orange (without fixation) and Giemsa (with fixation in methanol). The time of analysis was 2 hours of incubation. Images obtained from 40x objective.

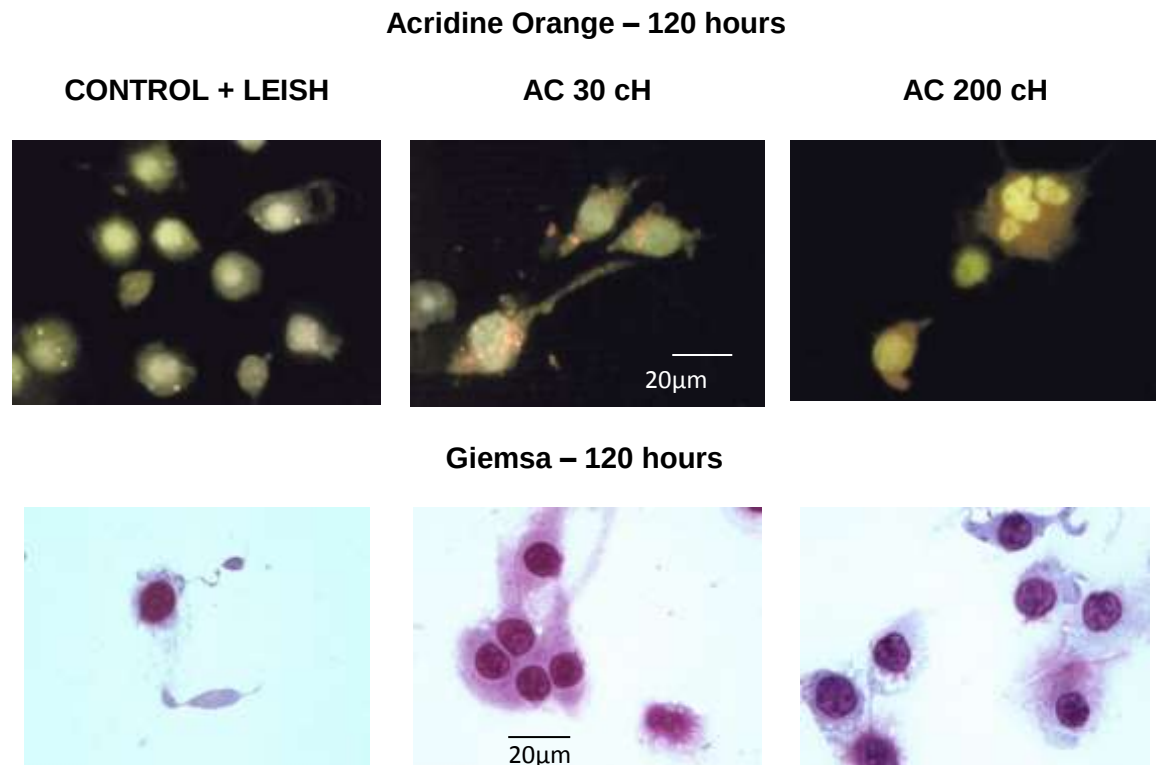


Figure 9: Morphology of RAW 264.7 macrophages maintained in co-culture with *Leishmania (L) amazonensis* stained by acridine orange (without fixation) and Giemsa (with fixation in methanol). The time of analysis corresponds to 120 hours of incubation. Images obtained from 40x.

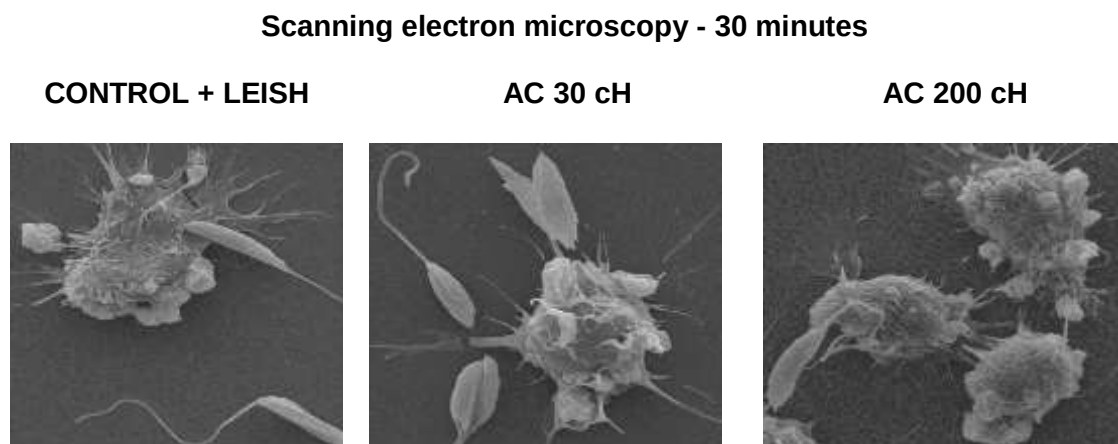


Figure 10: Ultrastructure of RAW 264.7 macrophages incubated with *Leishmania (L) amazonensis* for 30 minutes and exposed to different treatments. Images obtained from scanning electron microscopy. *Control + leish* (infected macrophages) and AC 30cH - HV: 10.0 KV; MAG: 5.00 KX. View field: 55.4 micrometers. AC 200cH - HV: 10.0 KV; MAG: 10 KX. View field: 27.7 micrometers.

DISCUSSION

Macrophages are able to migrate, phagocyte, secrete cytokines and present antigens to orchestrate the inflammatory response in conjunction with the immune response [66]. Recent studies have shown that homeopathic medicinal products prepared in high dilutions of known substances can change the macrophage activation *in vitro* and *in vivo*. In Oliveira [67], *Mercurius solubilis* added to the culture medium at different dilutions increased the production of IFN- γ and nitric oxide. The mixture of drugs in different dilutions prepared in the same commercial formulation, referred to as "homeopathic complex" is also able to modulate the macrophage activity *in vitro* in co-culture with lymphocytes [68] and with lymphocytes associated to melanoma cells (B16 F10) [69].

In this study, the automatically measuring of the macrophage area in an image analysis system has shown increased cell spreading and percentage of internalized parasites in co-cultures treated with *Antimonium crudum* 200 cH in different incubation times, especially 48 and 120 hours. These changes were concomitant with the inhibitory action of *Leishmania (L) amazonensis* on macrophages in respect to the production of various cytokines. In 48 hours, the concentration of the cytokines IL-1 beta, GM-CSF, IL 12, INF gamma, IL 6 and IL-10 in the supernatant were reduced in infected cultures, and treating with AC 200 cH enhanced the suppression of IL12 p40, INF gamma and IL6 in a statistically significant way. Between 72 and 120 hours of incubation, this medicine also potentiated the inhibitory action of the parasites on the production of chronic phase-related cytokines, such as RANTES and MIP 1 beta. In addition, the treatment with AC 200 cH induced a peak of VEGF between 72 and 96 hours.

These changes, followed by the significant increase in the percentage of internalized parasites, suggest that treatment favored the proliferation of parasites in the intracellular environment but, at the same time, limited the orchestration of the triggering factors of chronic inflammation, that is the main clinical trouble of this kind of infection. As is known, the genus *Leishmania* parasites uses the macrophage to capture metabolites necessary for their survival, multiplication [70] and migration of monocytes to an infection site allows reproduction and evolution of lesions [71]. The late peak of VEGF suggests the polarization M1 - M2 only in the chronic phase (120 hours), which would be associated with probable fibroblastic activity and

angiogenesis [72]. Although the production of IL10 (other M2 marker), already greatly reduced by the action of parasite, has not been modified by treatment with AC 200cH, it is understood that both cytokines have independent dynamics in the control of inflammation and the simultaneous production of both cytokines is not necessary to trigger M1-M2 polarization [73]. The morphology of treated phagocytes with AC 200cH showed no significant change, but the occurrence of multinucleated cells with persistent acids vacuoles was evident even after 120 hours, which represents the adaptation of phagocytes to chronic inflammatory processes, which would be seen in granulomatous lesions *in vivo*. The mechanisms that might explain these effects remain unknown.

Recently, the discovery of different kinds of nanoparticles in highly diluted preparations seems to be a promising way for the elucidation of such mechanisms [58,64], but the actual role of these particles in the biological effects of high dilutions is not known yet. There is evidence that such particles can propagate subtle electromagnetic signals capable of modifying biological functions [59,74,75], but these mechanisms still require confirmation. In this work, the physical and chemical characterization of the studied drugs by EDS technique revealed the presence of particles on a microscopic scale, composed of a cluster of different substances. After ultracentrifugation of the AC 200 cH, the particles identified were composed of a combination of Sodium, Calcium, Zinc, Niobium, Mercury and Bismuth, being Sodium, Calcium and Niobium the most abundant. Although Niobium is capable of accumulating in the macrophages lysosomes [76], binding to DNA [77] and generating genotoxic effects [78], its biological role in the form of nano and micro-particles is not fully understood. Therefore, to understand in what extent the Niobium found in this drug is actually responsible for the effects, additional studies are needed.

Moreover, treatment of co-cultures with AC 30 cH showed a different dynamic, although having some common mechanisms to the AC 200cH. Infected macrophages treated with AC 30 cH showed early inhibition of the spreading (2 hours) and increase of free promastigotes in the supernatant after 24 hours of incubation. Similar to that seen in AC 200 cH treatment, the parasite inhibitory effects on cytokine production was also enhanced by treating the cells with AC 30 cH, particularly for IL-12 p40, IFN gamma, IL-6, RANTES and MIP-1 beta, whose effects were statistically significant. In addition, the peak of IL-1 alpha, observed after 72

hours in control cultures, was delayed for 120 hours in cultures treated with AC 30cH. The MCP-1 peaks at 24 and 120 hours shown in the infected cultures were also inhibited in the presence of AC 30cH, although not statistically significant. These findings, particularly with respect to inhibition of chemokines to monocytes and lymphocytes, such as RANTES, IL 12 p40, MIP-1 beta and MCP-1, can explain the clinical improvement associated with anti-inflammatory effects related to the reduction of CD3⁺ and CD45RA⁺ (T and B lymphocytes) in the infected footpad of mice treated with AC 30 cH, as previously observed *in vivo* [36].

Among the observed effects for AC 30cH, perhaps the most interesting aspect would have been the morphological changes, especially in the early stages of phagocytosis. Cells staining by the acridine orange and its visualization by fluorescence microscopy showed complete absence of acid vacuoles in the cytoplasm, even with the clear presence of internalized parasites, suggesting changes in the capacity of cells to digest them. However, few acid vacuoles were seen in cells treated with AC 30cH after 120 hours of incubation, unlike the infected untreated cells, which no longer presented morphology compatible with such activity. Briefly, the treatment of infected macrophages with AC 30cH produced clear inhibition of its activity and delay of some functions, such as the production of IL-1 alpha and digestion of phagocytosed material.

The parasitic relationship with the host may be often modified by avoidance of the parasite to the immune system [16,79-82]. Indeed, the T cell hyposensitivity is commonly observed in *Leishmania (L.) amazonensis* infection, taking the lesions to anergic diffused cutaneous leishmaniasis, which is not often seen in other situations [33,83]. Under a certain perspective, the treatment of infected cells with AC 30cH would facilitate the escape mechanisms of the parasite inside the phagocytes but, at the same time, it would also prevent the arrival of young cells to perpetuate the infection.

The factors involved in the relationship between parasite and host are complex. Although the Th1 inflammatory profile is the most beneficial to the resolution of leishmaniasis [84], chronicity, produced by continuous stimulation of inflammatory cells and mediators of inflammation lead to hypertrophic and even deforming injuries [85]. The pro-inflammatory cytokines and their effects, therefore, cause progressive and systemic disorders leading to chronic diseases [86]. There is an "immune conflict" because the same immune response that reduces infection

worsens the clinical course. Finding new forms of therapy for leishmaniasis able to minimize the deleterious effects of chronic inflammation and, at the same time, stop the parasite cycle without toxicity to the host is the major challenge to be faced.

Recently, Nascimento [87] showed that the homeopathic complex M1 composed of a mixture of drugs in different dilutions (*Aconitum napellus* 20DH, *Arsenicum album* 18DH, *Asa foetida* 20DH, *Calcarea carbonica* 16CH, *Chelidonium majus* 20DH, *Cinnamon* 20DH, *Conium maculatum* 17DH, *Ipecacuanha* 13DH, *Phosphorus* 20DH, *Rhus toxicodendron* 17DH, *Silicia* 20DH, *Sulphur* 24DH, *Thuja occidentalis* 19DH, *Echinacea purpurea* 20 DH and *Gelsemium sempervirens* 20DH) decreased endocytic rate, the percentage of infected macrophages and increased production of cytokines involved in Th1 response *in vitro*, preventing the development of lesion caused by *L. amazonensis* in mice.

This is a very different mechanism from those known for the treatment of leishmaniasis, focused mainly on killing parasites [88,89], although conventional therapy with pentavalent antimonials increases plasma levels of IL1 beta and IL6 in patients with cutaneous Leishmaniasis [30]. In this case, the highly diluted antimony produced an opposite effect, by reducing the production of these mediators, suggesting a completely different mechanism of action, whose clinical and epidemiological implications remain under discussion. Indeed, free parasites found in the supernatant showed no evidence of apoptosis after the treatment with AC 30 cH. This finding supports the hypothesis that AC 30cH does not have anti-parasitical effect, not even inductive on the release of pro-apoptotic mediators by the infected macrophages. This evidence is still supported by the negative results on the respiratory burst, since the production of peroxide and NO was not changed in the acute phase. The production of these metabolites is crucial for the digestion of parasites inside the phagocytes [90].

In a recent study, Marques da Silva [91] showed that pre-treatment of co-cultures of J774 macrophages and *Leishmania (L) infantum chagasi* with AC 30 cH produced significant increase in the percentage of parasite internalization after 72 hours of incubation, also suggesting a difficulty in digesting parasites even in the chronic phase of infection. In this case, early treatment (pre-treatment) was a key factor in achieving this effect, corroborating the data obtained in this work with *Leishmania (L) amazonensis*, where the cells were treated at the same time of infection. The comparison of the results shows that both effects of AC 30 cH focus on

the regulation of macrophage function and not on functional aspects of the parasite itself, regardless of species of leishmania involved.

Similar to that observed in AC 200 cH, the particles found in the sediment obtained from AC 30 cH ultra-centrifugation, namely: Beryllium, Sodium, Aluminum, Sulfur and Chlorine, seem not be directly related to the observed effects, because the only element that presented significant quantities was Sodium, which is naturally present in biological fluids. Since it was particulate, no electrolytic effect could be attributed to it and the other elements showed less than 1% of incidence in the particles. This finding reinforces even more the need for studies on the secondary properties of nanoparticles in biological systems, as described above [59,73,74].

CONCLUSION

High dilution of antimony has specific effects on host-parasite relation, mainly by regulating the production of specific cytokines in function of time. Different levels of dilution can produce different patterns of modulation, leading to a certain anergic condition of macrophages, able reduce chronic lesions *in vivo*, as shown previously. Finally, further confirmation of these results in controlled clinical trials, as well as the elucidation of the mechanisms of action involved in these actions may open a new and interesting way to the control cutaneous leishmaniasis and other parasitic diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank FAPESP (process 2014/00967-1) for financing the project and CAPES-PROSUP for the Doctoral scholarship offered to Fabiana R Santana student. We thank Dr. Amarylis Toledo Caesar by manipulation of the drugs. We thank Prof. Cideli de Paula Coelho by suggestions and laboratory support.

CONFLICT OF INTEREST

There is no conflict of interest related to this work.

REFERENCES

1. Murray, H. W. et al. (2005) Advances in leishmaniasis. The Lancet. 366, 1561-1577
2. Pires, M. Q. et al. (2014) Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. Ver. Bras. Med. Trop. 27, 243-246
3. Killick, K. R. (1999) The biology and control of phlebotomine sand flies. Clin Dermatol. 17, 279-289
4. WHO, World Healthy Organization. Leishmaniasis (2015) Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
5. Ministério Da Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana (2012) Available at: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560
6. Handler, M. Z. et al. (2015) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. J. Am. Acad. Dermatol. 73, 897-908
7. Souza, A. I. et al. (2005) Feline leishmaniasis due to *Leishmania (L.) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. Veterinary Parasitology. 128, 41-45
8. Tolezano, J. E. et al. (2007) The first records of *Leishmania (L.) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. Veterinary Parasitology. 149, 280-284
9. Figueiredo, F. B. et al. (2009) Serological evaluation for detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia, municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 42, 141-145

10. Massunari, G.K. et al. (2009) A serological and molecular investigation of American cutaneous leishmaniasis in dogs, three years after an outbreak in the Northwest of Paraná State, Brazil. *Cad. Saude Publica* 25, 97-104
11. Heusser Júnior, A. et al. (2010) Canine tegumentar leishmaniasis in the town of Balneário Camboriú in the State of Santa Catarina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 111, 713-718
12. Souza, M. A. et al. (2016) American tegumentary leishmaniasis: mRNA expression for Th1 and Treg mediators are predominant in patients with recent active disease. *Immunobiology*. 221, 253-256
13. Gollob, K. J. et al. (2014) Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. *Parasite Immunol.* 36, 367-376
14. Falcão, S. D. et al. (2016) *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*: Differences and similarities to evade the innate immune system. *Front. Immunol.* DOI: 10.3389/fimmu.2016.00287
15. Carneiro, M. B. H. et al. (2015) IFN- γ -Dependent Recruitment of CD4⁺ T Cells and Macrophages Contributes to Pathogenesis During *Leishmania amazonensis* Infection. *J Interferon & Cytokine Research*. 35, 935-947
16. Rittg, M. G. et al. (2000) Leishmania-host-cell interaction: Complexities and Alternative Views. *Parasitology Today*. 16, 292-297
17. Assche, T. V. et al. (2011) *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Biology & Medicine*. 51, 337-351
18. Carneiro, P. P. et al. (2016) The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Plos One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0148084
19. Laskay et al. (2003) Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?. *Trends Microbiol.* 11, 210–4
20. Hsiao, C. H. C. et al. (2011) The effect of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of *Leishmania*. *Microbes and Infection*. 13, 1033-1044
21. Leal, G. G. A. et al. (2014) Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*. 205, 472-482
22. Castellano, L. R. et al. (2015) Use of Interleukin-10 Blockade as a Therapeutic Strategy in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Immunology*. 152741, 1-5

23. Venturin, G. L. et al. (2016) M1 polarization and the effect of PGE2 on TNF- α production by lymph node cells from dogs with visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* DOI: 10.1111/pim.12353
24. Okwor, I. et al. (2015) Interaction of macrophage antigen 1 and CD40 ligand leads to IL-12 production and resistance in CD40-deficient mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol.* 195, 3218-3226
25. Gallego, S. L. et al. (2016) *Leishmania infantum*-specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniasis. *Parasit. Vector.* 9, 1-10
26. Araújo, A. P. et al. (2012) Infection by *Leishmania amazonensis* in mice: a potential model for chronic hypoxia. *Acta Histochem.* 114, 797-804
27. Mukhopadhyay, D. et al. (2015). M2 Polarization of Monocytes-Macrophages is a Hallmark of Indian Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* DOI: 10.1371/journal.pntd.0004145
28. Quirino, G.F. et al. (2016) Interleukin-27 (IL-27) Mediates Susceptibility to Visceral Leishmaniasis by Suppressing the IL-17-Neutrophil Response. *Infect. Immun.* DOI: 10.1128/IAI.00283-16
29. Oliveira, L. F. et al. (2011) Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica* 118, 87-96
30. Kocyigit, A. et al. (2002) Antimonial therapy induces circulating proinflammatory cytokines in patients with cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity.* 70, 6589-6591
31. Tuon, F. F. et al. (2008) Treatment of New World cutaneous leishmaniasis – a systematic review with a meta-analysis. *International Journal of Dermatology.* 47, 109-124
32. Elmekki, M. A. et al. (2016) Elevated TGF-beta levels in drug-resistant visceral leishmaniasis. *Ann. Saudi. Med.* 36, 73-7
33. Oliveira, W. N. et al. (2014) The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine.* 66, 127-32
34. Rocha, V. P. et al. (2013) Activity of antimalarial drugs *in vitro* and in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J. Med. Microbiol.* 62, 1001-1010
35. Mwololo, S. W. et al. (2015) *In vitro* activity and in vivo efficacy of a combination therapy of diminazene and chloroquine against murine visceral leishmaniasis. *J. Biomed. Res.* 29, 214-223

36. Santana, F. R. et al. (2014) (a) Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: *Antimonium crudum* 30 cH. Homeopathy. 103, 1-11
37. Ministério Da Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Atitude de Ampliação de Acesso. 1ª Ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. p. 16
38. Singh, B. et al. (2013) Evaluation of implementation status of national policy on Indian systems of medicine and homeopathy 2002: Stakeholders' perspective. Anc. Sci. Life. 33, 103-108
39. Samal, J. (2015) Role of AYUSH workforce, therapeutics, and principles in health care delivery with special reference to National Rural Health Mission. Avu. 36, 5-8
40. Endler, P. C. et al. (2010) Repetitions of fundamental research models for homeopathically prepared dilutions beyond 10^{-23} : a bibliometric study. Homeopathy. 99, 25-36
41. Moreira, C. O. C. et al. (2012) Lymphocyte proliferation stimulated by activated *Cebus apella* macrophages treated with a complex homeopathic immune response modifiers. Homeopathy. 101, 74-79
42. Bonamin, L.V. et al. (2015) Immunological models in high dilution research following M Bastide. Homeopathy. **104, 263-268**
43. Bonamin, L.V. et al. (2015) The use of animal models in homeopathic research - a review of 2010-2014 PubMed indexed papers. Homeopathy. 104, 283-91
44. Pontin, K. et al. (2002) Avaliação da atividade biológica do bioterápico *in vivo* sob as formas amastigotas na infecção experimental determinada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Pesqui. homeopática 17, 29-32
45. Ferraz, F. N. et al. (2014) Hematological and parasitological changes in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* and treated with biotherapy 7dH. European Journal of Integrative Medicine. 20, 1-8
46. Aleixo, D. L. et al. (2014) Homeopathy in parasitic diseases. Internacional Journal High Dilution. 13, 13-27
47. Santana, F. R. et al. (2014) (b) Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: *Thymulin* 5cH. Homeopathy. 103, 1-10
48. Sandri, P. et al. (2015) *Trypanosoma cruzi*: biotherapy made from trypomastigote modulates the inflammatory response. Homeopathy. 104, 48-56

49. Ferraz, F.N. et al. (2016) Different treatment schemes and dynamizations of *Trypanosoma cruzi* biotherapies: what information do they transfer to the organism in infected mice?. Homeopathy. DOI: [dx.doi.org/10.1016/j.homp.2016.02.002](https://doi.org/10.1016/j.homp.2016.02.002)
50. Geraldo, M. M. et al. (2016) *In vivo* and *in vitro* phagocytosis of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes by B-1 cells. Parasite Immunol. DOI: 10.1111/pim.12324
51. Falkolski-Temporini, G.J. et al. (2016) Predominance of Th1 response, increase of megakaryocytes and Kupffer cells are related to survival in *Trypanosoma cruzi* infected mice treated with *Lycopodium clavatum*. Cytokine. 88, 57-61
52. Marotti, I. et al. (2014) Transcriptome Profiling of Wheat Seedlings following Treatment with Ultrahigh Diluted Arsenic Trioxide. Evid. Based Complement. Alternat. Med. DOI: 10.1155/2014/851263
53. Marzotto, M. et al. (2014) Extreme sensitivity of gene expression in human SH-SY5Y neurocytes to ultra-low doses of *Gelsemium sempervirens*. BMC Complement. Altern. Med. 14, 104
54. Oliosio, D. et al. (2014) Effects of *Gelsemium sempervirens* L. on pathway-focused gene expression profiling in neuronal cells. J. Ethnopharmacol. DOI: 10.1016/j.jep.2014.02.048
55. Saha, S. K. et al. (2015) Ultra-highly diluted plant extracts of *Hydrastis canadensis* and *Marsdenia condurango* induce epigenetic modifications and alter gene expression profiles in HeLa cells *in vitro*. J. Integr. Med. 13, 400-411
56. Kay, P.H. et al. (2016) The contribution of homeogenomic and homeogenetic studies in the support of the practice of Homoeopathy. Indian Journal of Research in Homeopathy. DOI: 10.4103/0974-7168.183858.
57. Bigagli, E. et al. (2016) Effects of Extreme Dilutions of *Apis mellifica* Preparations on Gene Expression Profiles of Human Cells. Dose Response. DOI: 10.1177/1559325815626685
58. Chikramane, P.S. et al. (2010) Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: a nanoparticulate perspective. Homeopathy 99, 231-242
59. Bell, I.R. et al. (2013) Nonlinear effects of nanoparticles: biological variability from hormetic doses, small particle sizes, and dynamic adaptive interactions. Dose Response. 12, 202-32
60. Bell, I.R. et al. (2013) Testing the nanoparticle-allostatic cross-adaptation-sensitization model for homeopathic remedy effects. Homeopathy. 102, 66-81

61. Bell, I.R. et al. (2015) Enhancement of adaptive biological effects by nanotechnology preparation methods in homeopathic medicines. *Homeopathy*. 104,123-38
62. Schulte, J. et al. (2015) Update on preliminary elements of a theory of ultra high dilutions. *Homeopathy*. 104, 337-342
63. Endler, P. C. et al. (2015) Replications of fundamental research models in ultra-high dilutions 1994 and 2015 - update on a bibliometric study. *Homeopathy*. 104, 234-245
64. Temgire, M.K. et al. (2016) Establishing the interfacial nano-structure and elemental composition of homeopathic medicines based on inorganic salts: a scientific approach. *Homeopathy*. DOI: 10.1016/j.homp.2015.09.006
65. Stuttgart, D. (1985) *German Homoeopathic Pharmacopeia*. Frankfurt, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart Govi-Verlaf GmbH. (3rd) pp. 163
66. Nelson, P. J. et al. (2012) The renal mononuclear phagocytic system. *J. Am. Soc. Nephrol*. 23, 194-203
67. De Oliveira, S. M. et al. (2011) *Mercurius solubilis*: actions on macrophages. *Homeopathy*. 100, 228-236
68. Burbano, R. R. et al. (2009) Lymphocyte proliferation stimulated by activated human macrophages treated with Canova. *Homeopathy*. 98, 45-8
69. Guimarães, F. S. F. et al. (2009) Stimulation of lymphocyte anti-melanoma activity by co-cultured macrophages activated by complex homeopathic medication. *BioMed Central Cancer*. DOI: 10.1186/1471-2407-9-293
70. Sernee, M. F. et al. (2006) *Leishmania* β -1,2-mannan is assembled on a mannose-cyclic phosphate primer. *Proceedings the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103, 9458-9463
71. Vijayamahantesh, et al. (2016) Up regulation of A2B adenosine receptor on monocytes are crucially required for immune pathogenicity in Indian patients exposed to *Leishmania donovani*. DOI: 10.1016/j.cyto.2015.12.016.
72. Freytes, D.O. et al. (2013) Macrophages modulate the viability growth of human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem*. 114, 220-9
73. Wu, W.K. et al. (2010) IL-10 regulation of macrophage VEGF production is dependent on macrophage polarisation and hypoxia. *Immunobiology*. 215, 796-803

74. Montagnier, L. et al. (2015) Transduction of DNA information through water and electromagnetic waves. *Electromagn. Biol. Med.* DOI: 10.3109/15368378.2015.1036072
75. Cartwright, S.J. (2016) Solvatochromic dyes detect the presence of homeopathic potencies. *Homeopathy*. DOI: 10.1016/j.homp.2015.08.002
76. Berry, J.P. et al. (1993) Selective intra-lysosomal concentration of niobium in kidney and bone marrow cells: a microanalytical study. *Biometals* 6, 17-23
77. Choi, J. et al. (2007) Nanoporous niobium oxide for label-free detection of DNA hybridization events. *Talanta*. 74, 1056-9
78. Caicedo, M. et al. (2008) Analysis of metal ion-induced DNA damage, apoptosis, and necrosis in human (Jurkat) T-cells demonstrates Ni²⁺ and V³⁺ are more toxic than other metals: Al³⁺, Be²⁺, Co²⁺, Cr³⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Mo⁵⁺, Nb⁵⁺, Zr²⁺. *J Biomed Mater. Res. A*. 86, 905-13
79. Burchmore, R. J. S. et al. (2001) Life in vacuoles-nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *International Journal for Parasitology*. 31, 1311-1320
80. Chang, K. P. et al. (2003) *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta tropica*. 85, 375-390
81. Morais, C. G. V., Lima, A. K. C., Terra, R., Dos Santos, R. F., Da-Silva, S. A. G., Dutra, M. L., 2015. The dialogue of the host-parasite relationship *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* infection. *Biomed. Res. Int.* DOI: 10.1155/2015/324915
82. Terrazas, C. et al. (2015) Uncovering *Leishmania*-macrophage interplay using imaging flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 423, 93-98
83. Silveira, F. T. et al. (2009) Immunopathogenic competences of *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* and *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 31, 423-431
84. Joshi, S., et al. (2016) Comparative Analysis of Cellular Immune Responses in Treated *Leishmania* Patients and Hamsters against Recombinant Th1 Stimulatory Proteins of *Leishmania donovani*. *Front Microbiol.* 7, 312
85. Navas, A. et al. (2014) Chronicity of dermal leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis* is associated with parasite-mediated induction of chemokine gene expression. *Infect Immunol.* 82, 2872-80
86. Adler, U. C. (2011) Low-grade inflammation in chronic diseases: An integrative pathophysiology anticipated by homeopathy?. *Medical Hypotheses*. 76, 622-626

87. Nascimento, K.F. (Alterações na interação *Leishmania amazonensis* - hospedeiro após tratamentos homeopáticos. PhD thesis. University Federal of Paraná – UFPR. Curitiba, Brazil, 2016)
88. Mishra et al. (2007) Chemotherapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future. *Current Medicinal Chemistry*. 14,1153-1169
89. Doroodgar, M. et al. (2016) Tamoxifen Induces Apoptosis of *Leishmania major* Promastigotes *in Vitro*. *Korean J Parasitol*. 54, 9-14
90. Nauseef, W. M. (2008) Nox enzymes in immune cells. *Semin Immunopathol*. 30, 195-208
91. Marques da Silva, K. (Avaliação do efeito da medicação homeopática *Antimonium crudum* em culturas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Master of Science dissertation. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP. São Paulo, Brazil, 2016)