

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Sarah Cristina Pereira do Nascimento

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PROTETIVA DE CAMUNDONGOS BALB/c
À INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) guyanensis*: papel de espécies
reativas do oxigênio e de linfócitos T helper**

Belo Horizonte
2024

Sarah Cristina Pereira do Nascimento

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PROTETIVA DE CAMUNDONGOS BALB/c
À INFECÇÃO POR *Leishmania (Viannia) guyanensis*: papel de espécies
reativas do oxigênio e de linfócitos T helper**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dra. Maria de Fátima Martins Horta

Co-orientador: Dr. Leonardo Gomes Vaz

Belo Horizonte
2024

043

Nascimento, Sarah Cristina Pereira do.

Avaliação da resposta imune protetiva de camundongos BALB/c à infecção por *Leishmania (Viannia) guyanensis*: papel de espécies reativas do oxigênio e de linfócitos T helper [manuscrito] / Sarah Cristina Pereira do Nascimento. – 2024.

65 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Maria de Fátima Martins Horta. Co-orientador: Dr. Leonardo Gomes Vaz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. *Leishmania guyanensis*. 3. Leishmaniose. 4. Imunidade. 5. Espécies Reativas de Oxigênio. I. Horta, Maria de Fátima Martins. II. Vaz, Leonardo Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE SARAH CRISTINA PEREIRA DO NASCIMENTO. Aos trinta dias do mês de outubro de 2024 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Avaliação da resposta imune protetiva de camundongos BALB/c à infecção por *Leishmania (Viannia) guyanensis*: papel de espécies reativas do oxigênio e de linfócitos T helper", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof.ª Maria de Fátima Martins Horta, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Fernanda de Lima Tana (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Luis Henrique Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Leonardo Gomes Vaz - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Maria de Fátima Martins Horta - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de outubro de 2024.

Dra. Fernanda de Lima Tana (UFMG) *Fernanda de Lima Tana*

Dr. Luis Henrique Franco (UFMG) *Luis Henrique Franco*

Dr. Leonardo Gomes Vaz - Coorientador (UFMG) *Leonardo Gomes Vaz*

Maria de Fátima Martins Horta
 Dra. Maria de Fátima Martins Horta - Orientadora (UFMG)

Eliete Aparecida Amaral

Coordenador do Programa de Pós-graduação em
 Bioquímica e Imunologia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente os meus pais, por terem dedicado uma vida para trabalhar para que as filhas pudessem se dedicar aos estudos. Agradeço por terem me feito acreditar que a partir da educação poderíamos mudar nossa realidade. Mãe, pai, nós conseguimos! Agradeço à minha irmã por ter sido a minha maior influência positiva de comportamento, e por sempre ter me mostrado o caminho a seguir. Agradeço também ao meu cunhado pela parceria e por ter acrescentado tanto à nossa família. Aos meus familiares, tios, primos, avós, pelo suporte ao longo da minha vida e por sempre torcerem por mim.

Ao grupo de amigos que formei durante a faculdade, por terem me mostrado o quão importante é ter alguém por perto nos bons e nos maus momentos, por estarem comigo desde o primeiro dia e por terem se tornado a minha família fora de casa. Aos outros amigos que formei durante toda a minha vida, sou grata por toda companhia e afeto que foi me dado e por terem tornado os meus dias mais leves.

À minha terapeuta, Fernanda, que durante várias sessões me escutou falar sobre camundongos soltos e células mortas, e que, com sua sabedoria, me ajudou a enfrentar os momentos desafiadores.

À minha orientadora, Patiu, por ter me mostrado que uma orientação pode ser feita com base no afeto e na empatia. Por ter sido gentil e compreensiva em todos os momentos dessa caminhada, por ter me dado suporte sempre que precisei e por aguentar meu lado teimoso e insistente. Por além de orientadora, ter se tornado uma amiga que quero levar para vida. Ao meu coorientador, Leo, pela paciência ao me ensinar tudo o que precisava aprender, pelo suporte nos momentos de desespero e por equilibrar meu pessimismo com seu otimismo admirável.

Aos alunos de iniciação científica, Roberta e Diego, pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei. Obrigada pela companhia de todos os dias, pela conversa sobre novelas e cultura pop e pela troca de conselhos diários.

À equipe de técnicos do departamento, e em especial ao Elimar, pelo apoio em todas as etapas do projeto e por estar sempre disponível para ajudar a finalizar essa etapa.

À professora Leda Quercia Vieira, que amigavelmente permitiu a realização dos meus experimentos em seu laboratório. Pela companhia agradável nas quintas de reunião, por todo conhecimento compartilhado durante esse tempo juntas e por todas pizzas, bolos e cafés da manhã que tornaram esses momentos ainda mais especiais.

Aos demais membros de laboratórios parceiros, Ana Elisa, Pierre, Laura, Anna Luiza, Vivian e tantos outros que, com muita gentileza, se disponibilizaram a me ajudar sempre que eu precisei (e não foram poucos os momentos que precisei de apoio).

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, e a todos os professores, funcionários e alunos que, juntos, possibilitaram o desenvolvimento do meu projeto e auxiliaram na aquisição de todo o conhecimento que adquiri.

E, por fim, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste projeto.

RESUMO

Certas linhagens de camundongos, como BALB/c, desenvolvem lesões cutâneas não controláveis enquanto outras, como C57BL/6, são capazes de controlar a infecção após inoculação de *L. major* ou *L. amazonensis*. No modelo murino, a resolução ou a progressão da doença causada por *L. major* parece ser determinadas pela ativação preferencial de células Th1 ou Th2, respectivamente. Na presença de uma resposta Th1, macrófagos ativado principalmente por IFN- γ tornam-se capazes de eliminar o parasita por produzirem óxido nítrico (NO), tóxico para o parasito. Esta polarização da resposta em Th1 ou Th2, entretanto, não é tão clara para outras espécies de *Leishmania*. Por exemplo, camundongos da linhagem C57BL/10, enquanto capazes de curar uma infecção por *L. major*, não conseguem resolver a lesão se infectados por *L. amazonensis*. Quando infectados por *L. major*, estes camundongos produzem altos níveis de IFN- γ e nenhuma IL-4, mas se a infecção for por *L. amazonensis* há produção de IL-4, e pouca ou nenhuma de IFN- γ . Assim, um mesmo hospedeiro reage de maneira diversa a diferentes espécies de *Leishmania* e, portanto, resistência e susceptibilidade, bem como padrão Th1/Th2 de resposta, dependem não só do *background* genético do hospedeiro como também da espécie ou mesmo da cepa infectante. Um outro exemplo interessante de uma mesma linhagem de camundongo apresentando respostas completamente diversas frente à infecção por duas espécies de *Leishmania* é o da linhagem BALB/c. Totalmente susceptíveis à infecção por *L. major* e *L. amazonensis*, esses camundongos desenvolvem uma mínima ou nenhuma lesão quando infectados por *L. guyanensis*. *In vitro*, macrófagos de camundongos BALB/c eliminam uma infecção de *L. guyanensis*, ao contrário do que ocorre com *L. amazonensis*. Já verificamos que essa eliminação é dependente da explosão respiratória e de espécies reativas do oxigênio (ROS), induzidas pela infecção e que o parasita morre por apoptose. Esses exemplos mostram que a resposta imune à infecção pelas várias espécies de *Leishmania* é bastante complexa, não podendo ser explicada simplesmente pela dicotomia Th1/Th2 e deve ter uma participação importante de mecanismos de imunidade inata. O objetivo desse projeto foi verificar a participação da explosão respiratória (imunidade inata) e da resposta de células T helper (imunidade adaptativa) na resistência de camundongos BALB/c à infecção por *L. guyanensis*. Em resumo, investigamos alguns aspectos da resposta do hospedeiro após a infecção com *L. guyanensis*, a saber, a real participação de ROS, utilizando a apocinina, um inibidor específico da explosão respiratória, o tipo de resposta adaptativa (Th1 ou Th2), verificando a expressão das citocinas IFN- γ e IL-4 no desfecho da infecção nesses camundongos. Nós verificamos que as ROS são importantes para a contenção de infecção nas primeiras semanas e que nas semanas subsequentes os camundongos produzem IFN- γ

mas não IL-4, o que é um marco distintivo da resposta Th1. Uma vez que nosso grupo já mostrou que *L. guyanensis* é sensível ao NO, nossos resultados demonstram que as ROS são capazes de controlar a infecção em momentos iniciais, e indicam que a ativação de uma resposta do tipo Th1 deve controlar a infecção nos períodos mais tardios.

Palavras chaves: *Leishmania guyanensis*; *Leishmaniose*; *Resposta protetiva*; *ROS*

ABSTRACT

Certain mouse strains, such as BALB/c, develop uncontrollable skin lesions, while others, such as C57BL/6, can control the skin infection after inoculation with *L. major* or *L. amazonensis*. In the murine model, the resolution or progression of disease caused by *L. major* appears to be determined by the preferential activation of Th1 or Th2 cells, respectively. In the presence of a Th1 response, macrophages activated primarily by Th1-derived IFN- γ become capable of eliminating the parasite by producing nitric oxide (NO), which is toxic to the parasite. The polarization of the response into Th1 or Th2, however, is not as clear for other *Leishmania* species. For example, mice of the C57BL/10 strain, while capable of curing a *L. major* infection, fail to resolve the lesion when infected with *L. amazonensis*. When infected with *L. major*, these mice produce high levels of IFN- γ and no IL-4, but if the infection is with *L. amazonensis*, IL-4 is produced but not IFN- γ . Thus, the same host reacts differently to different *Leishmania* species, and therefore, resistance and susceptibility, as well as the Th1/Th2 response pattern, depend not only on the host genetic background but also on the infecting species or even the strain. Another interesting example of the same mouse strain presenting completely different responses to infection by two *Leishmania* species is the BALB/c strain. Completely susceptible to infection by *L. major* and *L. amazonensis*, these mice develop minimal or no lesions when infected with *L. guyanensis*. *In vitro*, macrophages from BALB/c mice eliminate *L. guyanensis* but not *L. amazonensis* infection. We have already shown that this elimination is dependent on the respiratory burst and reactive oxygen species (ROS) induced by the infection, and that the parasite dies by apoptosis. These examples demonstrate that the immune response to infection by various *Leishmania* species is quite complex and cannot be explained simply by the Th1/Th2 dichotomy, but must have an important involvement of innate immunity mechanisms. The objective of this project was to investigate the role of the respiratory burst (innate immunity) and the T helper cell response (adaptive immunity) in the resistance of BALB/c mice to *L. guyanensis* infection. In brief, we investigated some aspects of the host response after infection with *L. guyanensis*, namely, the actual role of ROS using apocynin, a specific inhibitor of the respiratory burst, and the type of adaptive response (Th1 or Th2), through the expression of the cytokines IFN- γ and IL-4, in the infection outcome of these mice. We found that ROS are important for containing infection in the first few weeks and that in subsequent weeks, mice produce IFN- γ but not IL-4, a hallmark of a Th1 response. Since our group has previously shown that *L. guyanensis* is sensitive to NO, our results demonstrate that ROS can control infection in the early during the infection and indicate that activation of a Th1-type response should control infection later on.

Keywords: *Leishmania guyanensis*; Leishmaniasis; protective immunity; Nitric Oxid;

LISTA DE SIGLAS

- BSA: Albumina Sérica Bovina (de *Bovine Serum Albumin*)
- ELISA: Ensaio de imunoadsorvente ligado a Enzima (de *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*)
- gp63: Glicoproteína de 63kD
- IFN- β : Interferon-beta
- IFN- γ : Interferon-gama
- IL: Interleucina
- IL-2R: Receptor de Interleucina 2
- iNOS: Óxido nítrico sintase induzível (de inducible *Nitric Oxide Synthase*)
- IRF-1: Fator regulador 1 de IFN (de *IFN regulatory factor 1*)
- LACK: Cinase C ativada de *Leishmania* (de *Leishmania Activated C kinase*)
- LC: Leishmaniose cutânea
- LCD: Leishmaniose cutânea difusa
- LCL: Leishmaniose cutânea localizada
- LCM: Leishmaniose cutaneomucosa
- LPG: Lipofosfoglicano
- LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano
- LTA: Leishmaniose tegumentar americana
- LTh: Linfócito T auxiliar (de *T helper lymphocyte*)
- LV: Leishmaniose Visceral
- MyD88: fator de diferenciação mielóide 88 (de *myeloid differentiation primary response 88*)
- NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (de *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
- NETs: armadilhas extracelulares de neutrófilos (de *neutrophil extracellular traps*)
- NK: matadoras naturais (de *Natural Killer*)
- NO: Óxido nítrico (de *Nitric Oxide*)
- NOX: NADPH Oxidase
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- PBS: Tampão fosfato-salino (de *Phosphate-buffered Saline*)
- PFA: Paraformaldeído
- Phox: Oxidase de fagócitos (de *Phagocyte oxydase*)

ROS: Espécies reativas do oxigênio (de *Reactive Oxygen Species*)

SFB: Soro fetal bovino

STAT-1: Transdutor de sinais e ativador de transcrição 1 (de *Signal transducer and activator of transcription 1*)

TGF- β : Fator de crescimento transformador beta

TLR: Receptor do tipo Toll (de *Toll-Like receptor*)

TMB: Tetrametil-benzidina

TNF: Fator de necrose tumoral (de *Tumor Necrosis Factor*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de *Leishmania spp.*

Figura 2: Taxa de prevalência da leishmaniose cutânea no mundo, 2022.

Figura 3: Resposta imune de camundongos C57BL/6 ou BALB/c à infecção por *L. major*.

Figura 4: Ativação da NADPH oxidase.

Figura 5: Estratégia de gating para as análises de citometria de fluxo

Figura 6: Progressão da lesão em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. guyanensis* ou *L. major* e quantificação parasitária após 8 semanas de infecção.

Figura 7: Efeito da apocinina na produção de ROS por macrófagos de camundongos.

Figura 8: Efeito da inibição da explosão respiratória sobre o tamanho da lesão de camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis*.

Figura 9. Produção de IFN- γ e IL-4 por células da pata de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. guyanensis* ou *L. major*.

Figura 10: Produção de IFN- γ e IL-4 por células do linfonodo de camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 A leishmaniose e as principais características de seu agente etiológico	14
1.2 Resposta imune do hospedeiro durante a infecção experimental por <i>Leishmania</i> no modelo murino: resistência <i>versus</i> susceptibilidade	18
1.3 Características da infecção de camundongos BALB/c causada por <i>L. guyanensis</i>	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Parasitos	28
3.2 Criopreservação	29
3.3 Animais	29
3.4 Infecção dos animais com <i>L. guyanensis</i> e/ou <i>L. major</i>	30
3.5 Curso da infecção e quantificação de parasitos.....	30
3.6 Tratamento com apocinina	31
3.7 Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos	31
3.8 Quantificação de ROS.....	32
3.9 Obtenção de antígeno	32
3.10 Cultura de células de linfonodo.....	32
3.11 Citometria de fluxo.....	33
3.12 ELISA	34
3.13 Análise estatística.....	35
4. RESULTADOS.....	36
4. 1 Infecção por <i>L. guyanensis</i> não gera lesões em camundongos BALB/c.	36
4. 2 O tratamento de camundongos BALB/c com apocinina inibe a produção de ROS. ..	38
4. 3 A explosão respiratória é importante para resistência de camundongos BALB/c infectados por <i>L. guyanensis</i> nas primeiras semanas de infecção.....	39
4. 4 Camundongos BALB/c infectados com <i>L. guyanensis</i> produzem IFN- γ mas não IL-4, tanto nas patas (avaliado 4 semanas) quanto nos linfonodos (avaliado em 8 semanas). 40	
5. DISCUSSÃO.....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 A leishmaniose e as principais características de seu agente etiológico

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas pela infecção por múltiplas espécies do gênero *Leishmania* pertencentes à ordem Kinetoplastida (HONIGBERG, 1963; LAINSON & SHAW, 1979) e à família Trypanosomatidae (LAINSON & SHAW, 1979). Atualmente, o gênero *Leishmania* é descrito em três subgêneros: *Leishmania* (*Leishmania*), *Leishmania* (*Viannia*) e *Leishmania* (*Sauroleishmania*), os quais são classificados com base na região do trato digestório que colonizam e se desenvolvem no hospedeiro invertebrado (CROAN et al., 1997; OVEZMUKHAMMEDOV, & SAF'IANOVA, 1989, CUPOLILLO, 2000).

Os protozoários do gênero *Leishmania* têm um ciclo de vida complexo, envolvendo hospedeiros invertebrados e vertebrados. Os hospedeiros invertebrados são os flebotomíneos, insetos transmissores da doença, que são popularmente conhecidos por diversos nomes, como mosquito-palha, asa-dura, birigui, entre outros, dependendo da região de ocorrência. Dentre os hospedeiros vertebrados, encontram-se diversos grupos de mamíferos que desempenham o papel de reservatórios da doença, incluindo cães e roedores (ciclo zoonótico) e, em alguns países, os próprios seres humanos (ciclo antroponótico) (PISCOPO & MALLIA, 2006; PEARSON & SOUSA, 1996; ALMEIDA M. C. et al., 2003).

A transmissão do agente etiológico ocorre quando fêmeas infectadas do flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (LAINSON, RYAN & SHAW, 1987; KILLICK-KENDRICK, 1990), transmitem o protozoário para o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. Encontram-se também na literatura relatos de transmissão vertical (congênita) ou por meio de fluidos corporais. Entretanto esses casos não são frequentes e não apresentam importância epidemiológica comprovada (NEVES et al., 2016).

Durante o seu ciclo biológico, a *Leishmania* apresenta várias formas. Em algumas etapas do ciclo, os parasitos são intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear e apresentam formato ovalado sem o flagelo aparente, forma conhecida como amastigota (RITTIG & BOGDAN, 2000). Em outras etapas, estes protozoários são observados em formas extracelulares no trato digestivo de fêmeas de flebotomíneos, apresentando corpo alongado e flagelo aparente, forma infectante que é conhecida como promastigota (HANDMAN & BULLEN, 2002; PEARSON & SOUSA, 1996).

A *Leishmania* inicia o seu ciclo biológico no hospedeiro invertebrado quando o flebotomíneo ingere, durante o repasto sanguíneo em indivíduos infectados, fagócitos contendo o protozoário internalizado na forma amastigota (Fig. 1) (PIMENTA et al., 1992;

OMONDI et al., 2022). Ao chegar no intestino médio do inseto, as células fagocíticas se rompem e as amastigotas internalizadas são liberadas e rapidamente transformadas em promastigotas procíclicas. Após aproximadamente 3-4 dias de intensa replicação, os protozoários migram para o esôfago e faringe do hospedeiro invertebrado e se aderem ao epitélio por meio do lipofosfoliglicano (LPG), o principal componente de superfície das promastigotas (PIMENTA et al., 1992, SOARES et al., 2005). Uma vez neste ambiente, as menores temperaturas, o pH mais elevado em relação a pele do hospedeiro vertebrado e o esgotamento dos nutrientes desencadeiam um processo conhecido como metaciclogênese. Nesta etapa, modificações no perfil do LPG são observadas, fazendo com que ocorra a liberação das promastigotas que estavam aderidas no epitélio (MUSKUS & VILLA, 2002; DA SILVA et al., 2015). Após esse processo, as promastigotas procíclicas são transformadas em uma forma não divisível e infectante, denominada promastigotas metacíclicas. As formas infectantes da *Leishmania* apresentam também alta motilidade que as permite migrar para as porções anteriores do aparelho digestivo do inseto. Por fim, durante um segundo repasto sanguíneo, o vetor regurgita, na derme do hospedeiro, as formas promastigotas metacíclicas que estão presente na saliva, a qual parece favorecer a infectividade do parasito (THEODOS et al., 1991; NORSWORTHY et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005; KAYE et al., 2011).

Recentemente, foi demonstrado que cada repasto sanguíneo em indivíduos não infectados realizada por flebotomíneos infectados aumenta a infectividade do parasita. Isso ocorre pois o contato com o sangue não contaminado induz uma espécie de desdiferenciação das formas metacíclicas presentes no hospedeiro invertebrado em uma metaciclogênese reversa. Esses dados são importantes, pois mostram que as formas metacíclicas, antes consideradas um estágio terminal e diferenciada, podem, na verdade, passar por um processo de diferenciação. No estudo, foi mostrado que as formas metacíclicas se desdiferenciam em uma forma posterior às promastigotas procíclicas, conhecidas como formas leptomonas. Essas formas são replicantes e podem se rediferenciar em promastigotas metacíclicas infectantes provocando um aumento da carga parasitária no inseto vetor, portanto, mais infectante (SERAFIM et al, 2018).

Quando chegam ao tecido epitelial do hospedeiro vertebrado, as promastigotas infectam principalmente células do sistema fagocítico mononuclear, como neutrófilos e macrófagos e células dendríticas, mas também podem infectar células não fagocíticas (HOLBROOK & PALCZUK, 1975; SCHWARTZMAN & PEARSON, 1985; BOGDAN et al., 2000; PETERS et al., 2008; CAVALCANTE-COSTA et al., 2019). Após essa ligação, o parasita é internalizado formando um vacúolo contendo o parasito, o qual se funde com lisossomos, dando origem a um fagolisossomo ou vacúolo parasitóforo (COURRET et al., 2002; JAMES et al., 2006; HORTA et al., 2020). No interior desse vacúolo, o pH baixo e a temperatura local levam as promastigotas a se diferenciarem em formas amastigotas, forma

adaptada às condições do fagolisossomo. Durante este estágio, as formas amastigotas se estabelecem e replicam-se rapidamente, podendo levar à morte da célula hospedeira, por necrose ou apoptose (DAMATA et al., 2015). Os corpos apoptóticos ou amastigotas livres, caso liberadas no espaço extracelular podem ser fagocitados por outros macrófagos (SILVA-MOREIRA et al., 2024), levando à amplificação da infecção e/ou à propagação para outros tecidos como linfonodos, baço, fígado e medula óssea (PEARSON & SOUSA, 1996; Ministério da saúde, 2006).

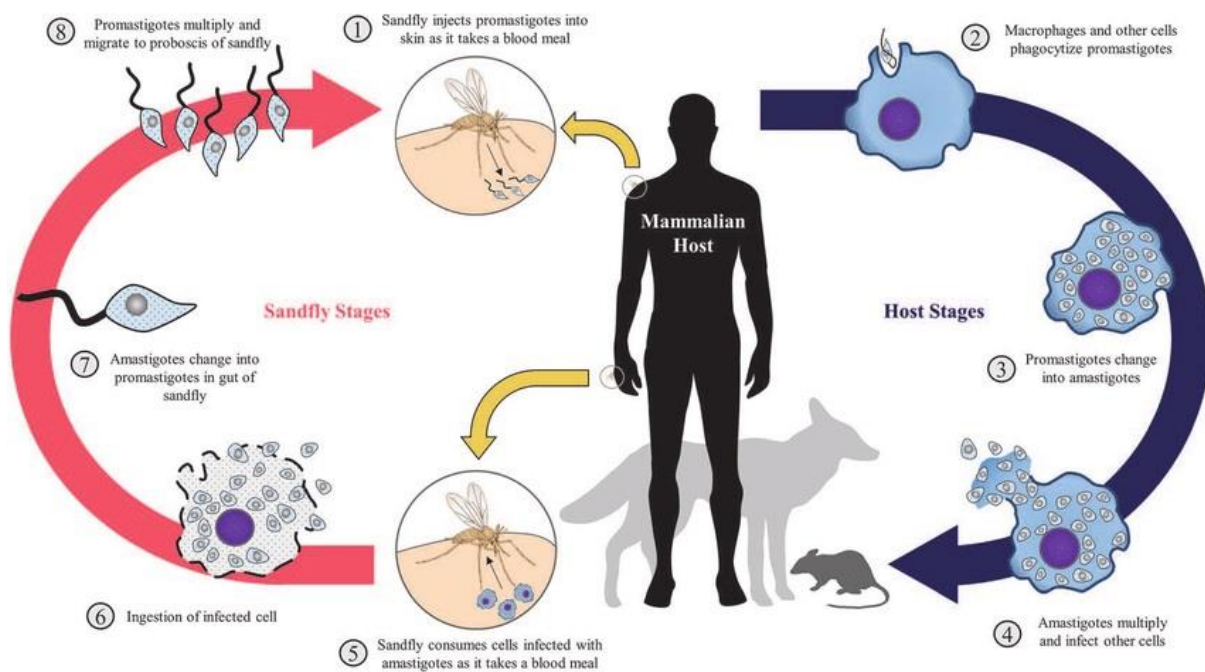


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Durante o repasto sanguíneo, flebotomíneos fêmeas infectadas regurgitam *Leishmania* promastigotas metacíclicas no tecido epitelial de hospedeiros vertebrados (1). Na derme, a *Leishmania* infecta principalmente células do sistema fagocitário mononuclear, como macrófagos e neutrófilos (2). Dentro do fagolisossomo da célula hospedeira, as leishmanias se transformam em amastigotas, formas arredondadas e sem flagelo aparente (3). Dentro do vacúolo parasitário, as amastigotas se replicam por bipartição e, por fim, saem das células hospedeiras para infectar novas células (4). Flebotomíneos se infectam ao se alimentar do sangue de vertebrados infectados com a *Leishmania* (5). As células contendo amastigotas são ingeridas (6). No intestino do mosquito-palha, as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas (7). Durante essa fase, as *leishmanias* se multiplicam e, após a metaciclologênese, se transformam em promastigotas metacíclicas. As metacíclicas migram para a probóscide, utilizada pela fêmea para penetrar a pele de outros animais em busca de sangue (8). (PACHECO et al., 2020).

Em seres humanos, a leishmaniose pode se manifestar em mais de uma forma clínica que, ainda, pode ser subdividida. Qual forma clínica o paciente irá apresentar depende de

fatores como a espécie envolvida na infecção, o grau de virulência e o estado imunológico do hospedeiro (SILVEIRA et al., 2004). A forma mais grave da doença, a leishmaniose visceral (LV), apresenta alto índice de mortalidade e os pacientes podem apresentar febre, perda de peso, anemia, sangramentos e alterações em órgãos internos como fígado e baço (DESJEUX, 2004). Essa manifestação clínica é causada comumente pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum*.

A forma clínica mais comum da doença é a leishmaniose tegumentar americana (LTA), e é caracterizada pelo surgimento de feridas na pele que podem ser únicas ou múltiplas, geralmente com bordas elevadas e centro ulcerado (BARRAL et al., 1995). Quando a LTA se apresenta pela formação de lesão única (nodular ou ulcerativa) bem determinada, ela é classificada como leishmaniose cutânea localizada (LCL). Por outro lado, quando surgem lesões difusas não ulceradas por toda a pele, o paciente é diagnosticado com leishmaniose cutânea difusa (LCD). Além dessas duas manifestações clínicas, também podem ser observadas lesões mucosas agressivas que afetam as regiões nasofaríngeas, característica da leishmaniose cutaneomucosa (LCM) (BARRAL et al., 1995; DESJEUX, 2004). Nas Américas, a manifestação tegumentar é causada principalmente pelas espécies *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. mexicana*. Já no Velho Mundo, *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* são as principais responsáveis pelo desenvolvimento da doença.

A leishmaniose afeta principalmente populações que residem em regiões tropicais e subtropicais e é classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das 10 principais doenças tropicais negligenciadas (PAHO/WHO, 2024). A OMS estima que mais de 1 bilhão de pessoas vivem em regiões endêmicas de leishmaniose, onde estão expostas a um alto risco de infecção. Entretanto, apesar da abrangência e impacto da leishmaniose na população mundial, pesquisas para o combate e prevenção da doença são negligenciadas por parte das instituições governamentais, que investem pouco nas pesquisas de prevenção e tratamento da doença.

Noventa e nove países ao redor do mundo são endêmicos para leishmaniose, sendo 89 para LTA, 80 para LV e 71 para as duas formas da doença (Fig. 2) (PAHO/WHO, 2024). Anualmente é estimado 30.000 novos casos de leishmaniose visceral e mais de 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea. Sessenta e oito por cento dos casos de LV estão concentrados em quatro países: Brasil, Índia, Sudão e Quênia. Já para a LC, 3 dos 9 países que concentram 85% dos casos mundiais são da América do Sul, sendo eles: Brasil, Colômbia e Peru (PAHO/WHO 2024).

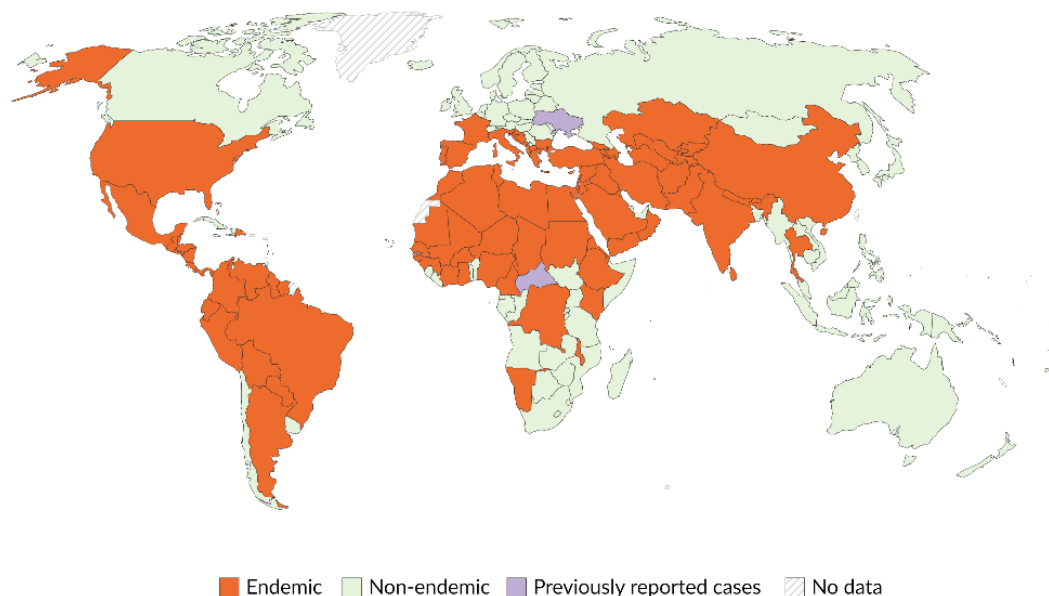


Figura 2. Taxa de prevalência da leishmaniose cutânea no mundo, 2022. Dados obtidos pela Organização Mundial da Saúde.

1.2 Resposta imune do hospedeiro durante a infecção experimental por *Leishmania* no modelo murino: resistência *versus* susceptibilidade

Existem uma série de fatores que influenciam o curso da infecção na leishmaniose cutânea. O grau de infecção, a região do corpo onde ocorreu o inóculo (NABORS et al., 1995), as características genéticas e o sexo do hospedeiro vertebrado, bem como o tipo de resposta imunológica desenvolvida influenciam no desenvolvimento ou não de uma lesão (SCOTT, SACKS & SHER, 1983; BARRAL et al., 1983; MCEL RATH et al., 1987; DE ROSSELL, BRAY & ANDER, 1987). Além disso, características moleculares do agente etiológico como a espécie, ou mesmo a cepa, envolvida na infecção e a forma do parasito também são capazes de alterar o curso da doença (PEACOCK et al., 2007; AFRIN, KHAN & HEMEG, 2019; KAUSHAL et al., 2023).

A maioria dos estudos a respeito da resposta imunológica contra a leishmaniose é realizada em modelos murinos. Nesses estudos, diversas linhagens de camundongos são utilizadas para identificar os mecanismos imunológicos responsáveis pela resistência ou a susceptibilidade à infecção por *Leishmania* (PRESTON et al., 1972; HOLBROOK & COOK, 1983; SCOTT & FARRELL, 1998; SACKS & MELBY, 2001). Camundongos resistentes são capazes de curar a lesão (*healer*), mesmo sem a eliminação completa do parasito, e os susceptíveis são incapazes de curá-la (*nonhealer*), apresentando quase sempre um aumento progressivo da lesão, podendo até levar à morte do camundongo (PRESTON & DUMONDE, 1976).

Estudos realizados no fim do século passado que utilizaram *L. major*, um dos agentes etiológicos da LC no velho mundo, trouxeram importantes dados a respeito da relação parasito-hospedeiro. Nestes estudos, foi evidenciado que animais susceptíveis e resistentes desenvolvem respostas imunológicas diferentes quando infectados com o parasito (LIEW & O'DONNELL, 1993; BOGDAN et al., 1993; REINER & LOCKSLEY, 1995). A infecção por *L. major* em camundongos BALB/c resulta em um padrão de alta susceptibilidade, com o desenvolvimento progressivo da lesão, e o animal não se cura. Juntamente com a progressão da lesão, também é observado o aumento do número de parasitos na região, podendo, por fim, ocorrer metástases (NASSERI & MODABBER, 1979; ALEXSANDER & KAYE, 1985). Por outro lado, camundongos C57Bl/6, quando infectados com o mesmo número de parasitos da mesma espécie de *Leishmania* desenvolvem um padrão totalmente diferente. Nesses animais, uma pequena inflamação no sítio da infecção se desenvolve nas primeiras semanas e essa lesão regride até desaparecer por completo e o animal se cura (REINER & LOCKSLEY, 1995; NASHED et al., 2000).

A susceptibilidade ou resistência de camundongos à infecção foi continuamente estudada, com diferentes linhagens de camundongos e com diferentes espécies de *Leishmania* (LIEW et al., 1991; MÜLLER et al., 1991; AKUFFO, MAASHO & HOWE, 1993; REINER & LOCKSLEY, 1995; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; PÉREZ-CABEZAS et al., 2019). Infecções feitas com *L. amazonensis*, espécie causadora de LC nas Américas, também foi estudada em várias linhagens de camundongo como BALB/c, C57Bl/6 e C57Bl/10 e, diferentemente do que foi demonstrado para *L. major*, infecções por *L. amazonensis* resultam em lesão que não se cura em várias linhagens estudadas (ALMEIDA et al., 1996; MAIOLI et al., 2004; DE SOUZA et al., 2011). Estes dados sugerem que fatores genéticos presentes nas diferentes espécies de *Leishmania* são capazes de moldar o curso da doença.

Fatores genéticos presentes nos hospedeiros também influenciam o desenvolvimento ou não de lesões cutâneas. Algumas linhagens de camundongos, como C57Bl/6 são muito mais resistentes à *L. amazonensis* que outras, como BALB/c (DA MATA et al., 2015). Também é observado que camundongos C57Bl/6 quando infectados com *L. major* são capazes de curar espontaneamente as lesões desenvolvidas, enquanto não se curam da infecção causada por *L. amazonensis*, com pequena progressão da lesão e eventual metástase (REINER & LOCKSLEY, 1995; MAIOLI et al., 2004). Outras linhagens também apresentam respostas diferentes a infecções por diferentes *Leishmanias*. Enquanto infecção por *L. amazonensis* resulta em progressão da lesão em camundongos CBA, a inoculação de *L. major* nestes mesmos animais resulta em padrão de resistência (DE SOUZA et al., 2000; GOMES et al., 2003). Paralelamente, todos estes dados são bons indícios de que a resposta imunológica desenvolvida na leishmaniose cutânea depende da somatória entre os fatores vinculados à interação parasito-hospedeiro.

A infecção por *Leishmania* leva os camundongos a desenvolverem a resposta imunológica adaptativa caracterizada pela multiplicação e diferenciação dos linfócitos TCD4⁺, conhecidos como linfócitos auxiliares (*helper*), LTh. Essas células Th podem ser ativadas a expressarem fenótipos distintos com relação ao padrão de secreção de citocinas. Se na presença de interleucina (IL)-12, secretada por células dendríticas infectadas (BOGDAN & RÖLLINGHOFF, 1998), diferenciam-se em células secretoras de IL-2, IL-3, Interferon-gama (IFN γ), principalmente, tendo sido denominadas de Th1. Se em presença de IL-4, secretada possivelmente por uma população de linfócitos T CD4⁺ que expressam receptores V β 4-V α 8 T que reconhecem um epítipo particular de um antígeno de *Leishmania* denominado LACK (*Leishmania* receptor for activated C kinase) (LAUNOIS et al., 1997 e HIMMELRICH et al., 1999) ou por eosinófilos durante a resposta imune inata (SASSE et al., 2022), LTh diferenciam-se em células secretoras de IL-4, IL-5 e IL-13, denominadas Th2 (MOSMANN et al., 1986; SHER & COFFMAN, 1992; ABBAS et al., 1996; MOSMANN & SAD, 1996; O'GARRA, 1998; ESPIR et al., 2014 SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Os diferentes perfis de LTh desenvolvidos são capazes de conduzir o curso de infecções para diferentes desfechos nos modelos murinos (SHER & COFFMAN, 1992; Powrie & Coffman, 1993; Scott et al., 1994; LIBLAU et al., 1995; O'GARRA, STEINMAN & GIJBELS, 1997; RAPHAEL et al., 2015).

No modelo de infecção por *L. major*, o desenvolvimento do padrão de resistência está relacionado com a capacidade das células dendríticas do hospedeiro produzirem IL-12 no início da infecção (REINER et al., 1994; MACATONIA et al., 1995) (Fig. 3). A IL-12 produzida é capaz de ativar a produção e liberação de IFN- γ em células *natural killer* (NK) (SCHARTON & SCOTT, 1993) e, em sinergismo com o Fator de Necrose tumoral (TNF), estimulam a diferenciação dos linfócitos Th0 em Th1 (HSIEH et al., 1993; SEDER et al., 1993; TRINCHIERI, 1995). Linfócitos Th1 produzem IFN- γ , citocina que, juntamente com moléculas do parasito, estimula a produção de TNF pelos macrófagos, que pode atuar de maneira autócrina nestas células (BOGDAN et al., 1990). Juntas, essas duas citocinas induzem nos macrófagos a produção de uma enzima denominada óxido nítrico sintase (iNOS) que catalisa a produção de óxido nítrico (NO) (GREEN et al., 1990; BOGDAN et al., 1990; LIEW et al., 1990a; LIEW et al., 1991), molécula com alta capacidade leishmanicida, que controla o número de parasitos e o desenvolvimento da lesão (LIEW et al., 1990b).

Além da sua importância no início da infecção, a produção de IL-12 também se mostra essencial durante toda infecção por *L. major* em camundongos resistentes, como o C57BL/6. A contínua síntese e liberação dessa citocina nesses animais contribui para manutenção do fenótipo Th1 e a contínua secreção de IFN- γ e, conseqüentemente, da produção de NO (PARK et al., 2000). Quando é feita a supressão ou remoção de IFN- γ e IL-12 em

camundongos resistentes, eles perdem a capacidade de eliminar parasito, desenvolvendo padrão de susceptibilidade (BELOSEVIC et al., 1989; WANG et al., 1994; SWIHART et al., 1995; SCHARTON-KERSTEN et al., 1995; MATTNER et al., 1996). Por outro lado, quando camundongos susceptíveis à infecção por *L. major* são tratados com IL-12 exógena, eles desenvolvem capacidade de curar lesão (HEINZEL et al., 1993; SYPEK et al., 1993), característica comum a animais resistentes.

Já em camundongos BALB/c, o fenótipo de susceptibilidade quando infectados com *L. major* é consequência da ativação de linfócitos Th0 em Th2 (SCOTT et al., 1988; HEINZEL et al., 1989; SHER & COFFMAN, 1992; REINER & LOCKSLEY, 1995). Nesses animais, a ausência da cadeia $\beta 2$ do receptor de IL-12 (IL-12R) prejudica a ativação das vias sinalização da citocina que leva os linfócitos a se diferenciarem em Th2 (SZABO et al., 1997). Na ausência ou em uma menor taxa de produção de IL-12, a IL-4, juntamente com TGF- β , suprimem o desenvolvimento de linfócitos Th1 e favorecem a resposta Th2, sem a produção de NO, o que leva a susceptibilidade desses camundongos (CHATELAIN, VARKILA & COFFMAN, 1992; SZABO et al., 1995; LI, HUNTER & FARRELL, 1999; GORELIK et al., 2002).

Além disso, produção de IL-4 nos camundongos BALB/c é continua durante a infecção, ao contrário do que é visto nos animais resistentes, observado apenas nas primeiras semanas (MORRIS et al., 1992; REINER et al., 1994). A produção desta citocina é transitória em camundongos C57Bl/6. Nesses animais, a resposta Th2 vista no início da inflamação é rapidamente redirecionada para a resposta do tipo Th1 pela ação da IL-12 (MORRIS et al., 1992; SCOTT et al., 1996; BELKAID et al., 2000). Na resposta que confere resistência a camundongos C57Bl/6, outras citocinas também são importantes para o desfecho da lesão, como IL-17 (GONZALEZ-LOMBANA et al., 2013; DIETZE-SCHWONBERG K. et al., 2019), IL-10, IL-5 (GROUX et al., 1999; NASHED et al., 2000) e IL-13 (MATTHEWS et al., 2000).

Apesar dos estudos com a *L. major* terem sido fundamentais para a estruturação do conhecimento que se tem sobre a resposta imunológica desenvolvida na leishmaniose, esse padrão de resistência e susceptibilidade, mediado pelas respostas Th1 e Th2, respectivamente, não explica todos os fenótipos de resistência e susceptibilidade em diferentes linhagens de camundongos infectados com diferentes espécies de *Leishmania* (MCMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004). Além disso, a ideia da existência de uma dicotomia entre respostas Th1 e Th2 traz a falsa ideia de que os fenótipos de resistência e susceptibilidade estão vinculados apenas pela ausência ou presença de uma ou outra citocina. Estudos mais atuais mostram que o desenvolvimento ou não da doença é o resultado de uma somatória de diversos fatores do hospedeiro e do parasito que, juntos, levam a produção de um balanço de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias que determinam a

proteção ou patologia da infecção (MCMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004; SAHA, ROY & UKIL, 2022).

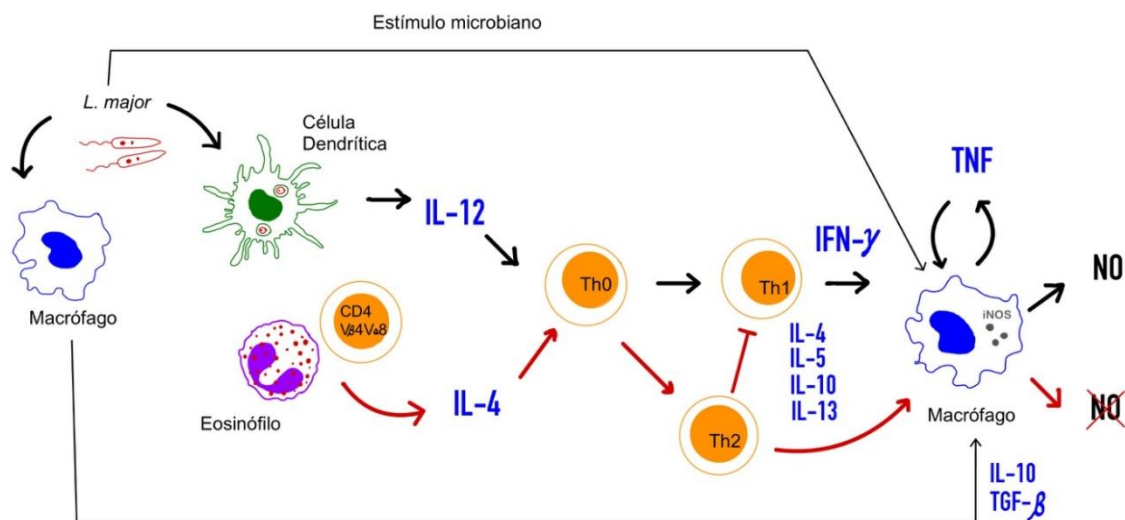


Figura 3. Resposta imune de camundongos C57BL/6 ou BALB/c à infecção por *L. major*. Ao infectar camundongos C57BL/6 (setas pretas), a *L. major* invade macrófagos e CD residentes, que liberam IL-12. A citocina liberada atua na diferenciação de linfócitos T *naive* (Th0) para o fenótipo Th1, células que produzem citocinas inflamatórias como o IFN- γ . As citocinas produzidas e os estímulos do próprio parasito ativam a produção de NO, substância leishmanicida que controla o desenvolvimento da lesão. Por outro lado, camundongos BALB/c (setas vermelhas) possuem uma dificuldade na sinalização da IL-12 e, por isso, a IL-4 produzida pelo animal ativa os linfócitos Th0 a se diferenciarem para o subtipo Th2, capaz de produzir citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13 que não ativam a produção da iNOS.

Um estudo realizado, que pode ser usado para exemplificar que a dicotomia entre a resposta Th1 e Th2 não é um padrão para todas as infecções, é o de C57BL/10 inoculados com *L. amazonensis*. Foi mostrado que quando infectados, essa linhagem de camundongos apresenta padrão de susceptibilidade, não sendo capaz de curar a lesão espontaneamente (NEAL & HALE, 1983; CHILDS et al., 1984). Assim como no modelo de BALB/c infectados com *L. major*, os camundongos C57BL/10 infectados com *L. amazonensis* tampouco são capazes de desenvolver o fenótipo Th1 de linfócitos (AFONSO & SCOTT, 1993). Entretanto, também não é observado a produção de uma resposta Th2 típica de animais susceptíveis, com a ausência da produção de IL-4 ao longo da infecção (AFONSO & SCOTT, 1993). Estes dados sugerem que neste modelo de infecção, a susceptibilidade não está relacionada com o desenvolvimento preferencial de uma resposta Th2 e sim pela ausência da resposta Th1.

Um outro exemplo é o que ocorre durante a infecção de camundongos BALB/c com *L. braziliensis*, animais estes que são resistentes, mas não apresentam alta produção de IFN- γ (NEAL & HALE, 1983; DeKREY et al., 1998). Nesses animais, o não desenvolvimento da

lesão é associada as baixas taxas de IL-4 produzidas. Neste caso, a pequena quantidade de IFN- γ produzido seria suficiente para resolução da lesão pois não haveria IL-4 o suficiente para inibir o seu efeito protetor (DeKREY et al., 1998). Portanto, este seria um exemplo no qual o desenvolvimento de um padrão de resistência não seria pela presença de uma resposta Th1 e sim pela ausência de uma resposta Th2.

Outro ponto importante foi levantado com o estudo de uma cepa de *L. major* (MHOM/SN/74/SD) retirada de pacientes com lesões incuráveis. Quando usaram essa cepa para infectar camundongos C57Bl/6, normalmente resistentes à *L. major*, estes animais foram susceptíveis à infecção. Entretanto, ao contrário do que se podia imaginar, esses animais ainda desenvolviam uma resposta Th1 polarizada, com a produção de IFN- γ e ausência de IL-4 e IL-13. Nesse modelo de infecção, foi sugerido que a citocina IL-10, produzida pelo animal, seria crucial para o desenvolvimento de lesão (ANDERSON et al. 2005).

Em conjunto, esses resultados demonstram a importância de se estudar a resposta imunológica desenvolvida frente à infecção por *Leishmania* com ciência da sua complexidade, utilizando outras espécies e outros hospedeiros. Os casos citados anteriormente são apenas alguns dos exemplos que são descritos na literatura. Juntos, eles sugerem que o balanço de citocinas liberadas pelas células Th podem apresentar diversos padrões, e que o modelo de *L. major* amplamente estudado não representa vários outros exemplos de infecções por *Leishmania*.

Outros mecanismos independentes de células T são sugeridos como importantes para o desenvolvimento ou não de lesões em infecções por *Leishmania*. Principalmente no início da infecção, na ausência da resposta adaptativa, células do sistema imune inato produzem importantes elementos como citocinas, quimiocinas e substâncias microbidas que são capazes de determinar o curso da inflamação. Macrófagos são exemplos de células do sistema inato que desempenham importante função durante o processo inflamatório. Essas células frente a infecção de *Leishmania* desempenham diversas funções pois, além de serem as principais células hospedeiras do protozoário, elas também atuam como apresentadora de antígeno e células efectoras capazes de eliminar o patógeno (TOMIOTTO-PELLISSIER, 2018; SANDOVAL-PACHECO et al., 2021). Dependendo dos estímulos presentes no tecido, os macrófagos podem se apresentar vários fenótipos distintos, sendo que dois são os mais característicos: M1, resultado da ativação por IFN- γ , denominada ativação clássica, e M2, resultado da ativação por IL-4, denominada ativação alternativa (ADAMS, 1989; MILLS, 2000; ANDERSON & MOSSER, 2002; MARTINEZ et al., 2008). Esses dois fenótipos se diferenciam pelas citocinas por eles produzidas, com o subtipo M1 secretando citocinas inflamatórias como IFN- γ , TNF, IL-1 β e IL-12 e o subtipo M2 produzindo IL-10, IL-4, IL-13 entre outras citocinas anti-inflamatórias. (SHAPOURI-MOGHADDAM, et al., 2018) A liberação dos

diferentes tipos de citocinas pode determinar se a célula irá produzir substâncias leishmanicidas ou se vão atuar como ambiente seguro para replicação das leishmanias (MARTINEZ et al., 2008; ARANGO-DUQUE & DESCOTEAUX, 2014; TOMIOTTO-PELLISSIER, 2018; SANDOVAL-PACHECO et al., 2021). Portanto, os macrófagos, juntamente com outras células do sistema imune inato determinam diferenças importantes no curso da doença.

Como já mencionado, ao entrarem em contato com a *Leishmania*, e sob estímulo de citocinas inflamatórias como IFN- γ e TNF, o macrófago é capaz de induzir a produção de metabólitos leishmanicidas, como o NO, um gás altamente reativo que é capaz de afetar as vias metabólicas do parasito, eliminando-o (NATHAN, 1992; JAMES, 1995). A produção de NO nos macrófagos é feita pela oxidação do aminoácido L-arginina pela iNOS produzindo L-citrulina (HIBBS-JR et al., 1988). Utilizando o modelo de infecção de *L. major* em C57Bl/6, foi sugerido que a produção desse metabólito é essencial para a capacidade de cura espontânea da lesão. De maneira interessante, foi mostrado pelo nosso e por outros grupos de pesquisas que macrófagos de linhagens diferentes de camundongos possuem capacidades distintas de produção de NO. Foi mostrado que macrófagos de camundongos C57Bl/6 não infectados produzem mais NO do que macrófagos de camundongos BALB/c, quando estimulados por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e IFN- γ ou apenas por LPS (SANTOS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2014). Também foram feitos estudos que demonstraram que a maior produção de NO pelos camundongos C57Bl/6 se deve por uma maior produção de IFN- β , que induz a produção de STAT-1 e IRF-1 (OLIVEIRA et al., 2014), fatores de transcrição importantes para a transcrição da iNOS.

Além do NO, o contato de promastigotas de *L. guyanensis* e *L. amazonensis* com macrófagos leva a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*) (SOUSA-FRANCO et al., 2006). Essas substâncias são produzidas durante uma reação denominada explosão respiratória, que ocorre em algumas células do sistema imune inato (LOCKSLEY & KLEBANOFF, 1983; MURRAY & CARTELLI, 1983; BEAMAN & BEAMAN, 1984; ROOS & WINTERBOURN, 2002; NAKAI & TSRUTA, 2021). Durante a explosão respiratória, o oxigênio é metabolizado pela NADPH oxidase, ou fagócito oxidase (Phox, *phagocyte oxydase*) ou ainda NOX, em ânion superóxido (O_2^-) que, em seguida, pode ser novamente metabolizado em outras ROS, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH \cdot) e ácido hipocloroso (HClO) (BUCHMULLER & MANUEL, 1981; LOCKSLEY & KLEBANOFF, 1983; ROOS & WINTERBOURN, 2002). Presente principalmente em macrófagos e neutrófilos, a Phox consiste em uma unidade catalítica NOX2 (gp91phox) e de unidades regulatórias p22phox, p40phox, p47phox, p67phox e a RAC GTPase. A Phox é naturalmente inativa e apresenta a unidade gp91phox e p22phox formando um complexo

intramembranar estável, enquanto as outras subunidades estão presentes no citoplasma (Fig. 4). Quando a célula é estimulada com antígenos e/ou mediadores inflamatórios, as subunidades citoplasmáticas são induzidas a se ligarem nas subunidades intramembranares, o que dá origem à enzima ativa (HEYWORTH et al., 1991; AGO et al., 2003; GROEMPING et al., 2003; GROEMPING & RITTINGER, 2005; VIGNAIS, 2005; BELAMBRI et al., 2018). Quando ativa, a Phox transfere um elétron da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) ao oxigênio molecular (O_2) para produzir o O_2^- (BABIOR, 2000). Essa ROS atua oxidando DNA, proteínas, lipídios, carboidratos e centros de ferro-enxofre da cadeia respiratória dos microrganismos (ROOS & WINTERBOURN, 2002). Juntamente com o NO, o O_2^- forma o peroxinitrito ($ONOO^-$), também tóxico para o parasito. Assim como o NO, as ROS produzidas pelas células do sistema imune inato são sugeridas como um importante mecanismo leishmanicida, embora o seu papel não esteja completamente elucidado. Em infecção por *L. amazonensis*, camundongos *knockout* para a subunidade gp91 da Phox, embora não sejam diferentes quanto ao número de parasitos infectantes, demonstraram uma patologia mais severa do que animais que fazem a explosão respiratória nos estágios mais avançados da infecção por mediar a apoptose de neutrófilos induzida pela infecção (CARNEIRO et al, 2018).

Além de serem produzidos por macrófagos, as ROS e o NO também são produzidos por neutrófilos, células que podem proteger ou aumentar a infecção por *Leishmania* pela interação com outros tipos celulares. Assim como macrófagos, neutrófilos de camundongos resistentes (C57Bl/6) à *L. major* são descritos como melhores produtores de NO quando comparado com neutrófilos de camundongos susceptíveis (BALB/c) (DUARTE, 2008; HORTA et al., 2012). Em infecção por *Leishmania*, os neutrófilos são as primeiras células a se infectarem por promastigotas, servem como célula hospedeira por um curto período, entram em apoptose sendo fagocitadas por macrófagos que chegam ao sítio da infecção posteriormente (PETERS et al, 2008). A infecção inicial de neutrófilos seguida da fagocitose das células apoptóticas infectadas por macrófagos é conhecida como o mecanismo do “cavalo de Troia” (VAN-ZANDBERGEN et al., 2004; PETERS et al., 2008; LASKAY, VAN-ZANDBERGEN & SOLBACH, 2008). Até bem recentemente, pensava-se que neutrófilos não permitiriam ao parasita transformar-se em amastigotas, mas foi posteriormente foi mostrado que *L. mexicana* replica dentro de neutrófilos, demonstrando que esse tipo celular também pode agir como um nicho para a replicação do parasito (HURRELL et al, 2017).

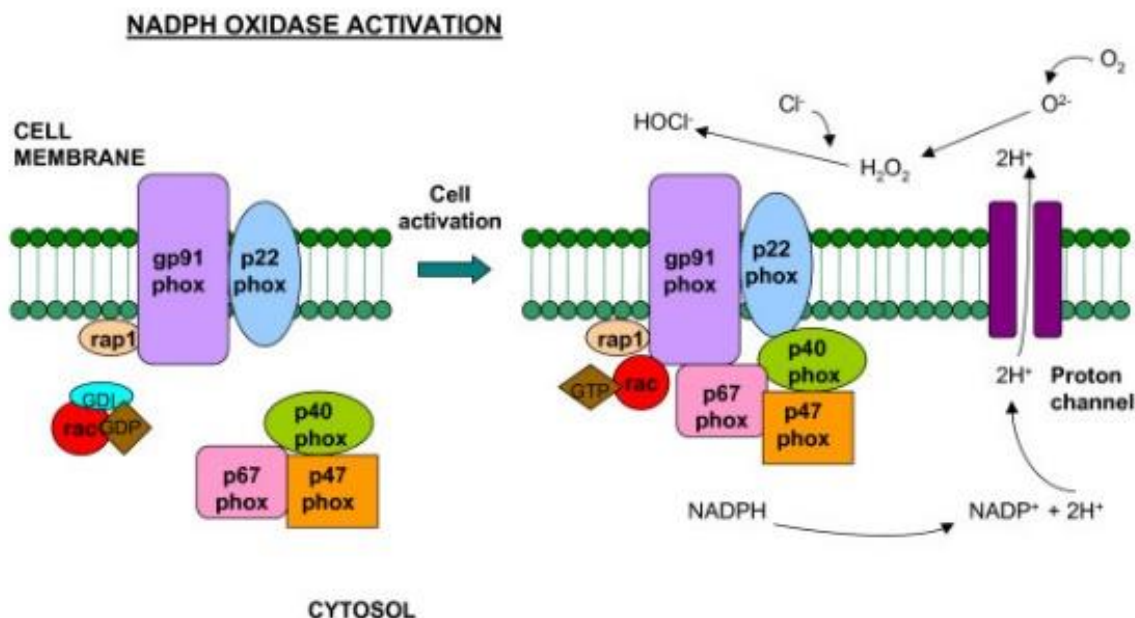


Figura 4. Ativação da NADPH oxidase. A NADPH oxidase é uma enzima com várias subunidades, sendo algumas intramembranares e outras citosólicas. Para ser ativada, as subunidades citosólicas são fosforiladas e ligadas nas unidades presentes na membrana plasmática. Quando ativa, a enzima é capaz de transferir elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, o transformando em superóxido. (ASSARI, 2006)

Além disso, foi mostrado que neutrófilos são capazes de eliminar *L. amazonensis* por intermédio das NETs (neutrophil extracellular traps), estruturas fibrosas compostas por DNA, elastase, histonas, catepsina G e mieloperoxidase (BRINKMANN et al., 2004; GUIMARÃES-COSTA et al., 2009). Este processo de morte celular é distinto da apoptose e da necrose e depende da geração de ROS pela NADPH oxidase (FUCHS et al, 2007).

Como visto, tanto características do sistema imune inato quanto do sistema adaptativo são capazes de determinar o desenvolvimento ou não de lesão em infecção por *Leishmania*. Macrófagos, neutrófilos, células dendríticas juntamente com outras células do sistema imune inato influenciam no desenvolvimento do tipo de resposta de células auxiliares. Ao mesmo tempo, os linfócitos TCD4+ ativados são capazes de induzir a atividade inflamatória ou anti-inflamatória das células inatas.

1.3 Características da infecção de camundongos BALB/c causada por *L. guyanensis*

Endêmica no Brasil, na Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Peru e Suriname, (GRIMALDI et al., 1989; ESCOBAR et al., 1992; LAINSON et al., 1994) a espécie *L. guyanensis* é o foco do nosso trabalho. Quando infecta hospedeiros vertebrados, essa espécie pode levar o desenvolvimento uma úlcera dérmica com bordas definidas, característica da manifestação cutânea da doença. Entretanto, a infecção pela *L. guyanensis*

também pode levar a manifestação mucocutânea da doença, gerando lesões na mucosa do indivíduo infectado (GUTIERREZ et al., 1991; BIDDLESTONE et al., 1994; ROMERO et al., 2002; PIRES et al., 2015; ABADÍAS-GRANADO et al., 2021). Além das infecções em seres humanos, essa espécie também pode ser encontrada parasitando cães, como demonstrado em um estudo feito em 2020 (SANTOS et al., 2020).

Nas Américas, *L. guyanensis* é responsável por 10% dos casos de LC (OLIVER, MINGUEZ-MENENDEZ & FERNANDEZ-PRADA, 2019). Entretanto, estudos reportam a necessidade de uma caracterização correta das *Leishmanias* presentes nas Américas, principalmente entre os protozoários do subgênero *Viannia*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis*. Por consequência dessa má identificação, os autores sugerem que presença da *L. guyanensis* pode estar sendo subnotificada nas regiões endêmicas (PIRES et al., 2015). Apesar da sua importância epidemiológica, há pouquíssimos estudos sobre essa espécie, particularmente sobre a resposta imune desenvolvida frente à infecção causada por ela.

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa e por outros demonstram que quando infectados com *L. guyanensis*, os camundongos C57Bl/6 não desenvolvem lesão, sendo considerado resistente para a espécie. De maneira interessante, a linhagem BALB/c, conhecida por ser extremamente susceptível a infecção por espécies como *L. major* e *L. amazonensis*, quando infectados por *L. guyanensis* tampouco desenvolvem lesão ou desenvolve pequenas lesões que se curam espontaneamente (SOUSA-FRANCO et al., 2006; MENDES, 2011), semelhante ao que ocorre com a infecção com *L. braziliensis* (DEKREY, LIMA & TITUS, 1998). Quando analisada a quantidade de parasitos na pata (local do inóculo) e linfonodo, os dados apontam que o número de parasitos é baixo em ambas as linhagens, o que sugere que além de controlar o desenvolvimento da patogênese, estes animais também são capazes de eliminar o parasito (SOUSA-FRANCO et al., 2006; MENDES, 2011).

Em camundongos C57Bl/6 infectados com *L. guyanensis*, estudos demonstraram que a produção de citocinas inflamatórias (IL-12 e IFN- γ), típicas de um padrão de resposta Th1, está envolvido com a sinalização dependente de Myd88 e TLR9. A sugestão é baseada em experimentos que mostraram que camundongos Myd88^{-/-} e TLR9^{-/-} se tornaram susceptíveis a infecção, aumentando a produção de IL-4 e IL-13 (IVES et al., 2014). O perfil de citocinas também foi avaliado em pacientes em uma área endêmica do Brasil e foi mostrado que a persistência da infecção por *L. guyanensis* está relacionada com a deficiência de produção de IFN- γ e à produção de IL-10 na lesão (BOURREAU et al., 2001; BOURREAU et al., 2007; MATTA et al., 2007; BOURREAU et al., 2009).

Em camundongos BALB/c, nosso grupo de pesquisa demonstrou que, *in vitro*, os macrófagos de camundongos BALB/c eliminam amastigotas por uma via independente de

NO. Foi verificado que as amastigotas morrem *in vitro* por apoptose, causada pela explosão respiratória e a produção de ROS induzidas pelo parasito (SOUSA-FRANCO et al., 2006).

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar os mecanismos da imunidade inata e adaptativa responsáveis pela resposta que protege camundongos BALB/c do desenvolvimento de lesão pela infecção por *L. guyanensis*. Devido ao resultados *in vitro* obtidos anteriormente em nosso laboratório, investigamos se a explosão respiratória, eficaz na eliminação do parasito *in vitro*, estaria envolvida na resistência desses camundongos à por *L. guyanensis in vivo*. Como não há dados sobre a resposta imune adaptativa nessa linhagem de camundongos infectados por *L. guyanensis*, investigamos ainda qual o tipo de células Th estavam atuando durante a infecção e que pudesse ter participação nessa resistência.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Buscar os mecanismos de resistência de camundongos BALB/c à infecção por *L. guyanensis*, avaliando a participação das ROS e a resposta imune adaptativa mediada por linfócitos Th.

2.2 Objetivos específicos

- Reproduzir o curso da infecção de camundongos BALB/c com *L. guyanensis* comparando-o com o da *L. major* em camundongos BALB/c e C57BL/6;
- Avaliar a duração do efeito da apocinina administrada *in vivo* sobre a explosão respiratória de macrófagos;
- Avaliar o efeito da inibição da produção de ROS em camundongos BALB/c sobre a curso da infecção por *L. guyanensis*;
- Quantificar as citocinas IFN- γ (Th1) e IL-4 (Th2) no local da lesão e nos linfonodos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Parasitos

A cultura de promastigotas de *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) foi iniciada a partir de descongelamentos de cepas doadas pela prof. Norma de Melo, da Universidade Federal de Minas Gerais. Já as promastigotas da cepa

Leishmania (*Leishmania*) *major* (MHOM/IL/80/Friedlin) foi gentilmente fornecida pela prof. Camila Indiani de Oliveira, da Universidade Federal da Bahia.

Ambas as espécies eram cultivadas em Meio 199 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Grand Island, USA) suplementado com 20% de SFB (Cultilab, São Paulo, Brazil) em pH 7,2-7,4. Após a adição de Adenina 1%, Hemina 0,2%, Biotina 0,1%, Glutamina 1% e Penicilina 1%, o meio de cultura era filtrado em filtros com membrana de porosidade 0,22 µm para esterilização e, então, eram estocados em recipientes estéreis. Para a manutenção do cultivo eram feitos repiques a cada 4-5 dias, utilizando 1×10^6 parasitos por mL de meio em garrafas de cultura. Para fazer a contagem dos parasitos, a cultura era diluída 20x em PBS contendo 4% de paraformaldeído (PFA) e contadas com auxílio de câmara hemocitométrica de Neubauer (C.A. Hausser & Son, Philadelphia, USA). A observação da cultura era feita em microscópio invertido (Olympus IMT, Tóquio, Japão) para verificar a ausência de contaminação. As formas promastigotas utilizadas nos experimentos eram mantidas por no máximo 15 repiques, para prevenir perda de virulência após longos períodos de cultura (NOLAN & HERMAN, 1985; NASYROVA et al., 1989).

3.2 Criopreservação

Para a criopreservação, as promastigotas eram centrifugadas a 2.000 x g por 15 minutos a 4°C para a retirada do meio de cultura. O *pellet*, então, era ressuspendido com solução de congelamento (SFB + 10% DMSO) estéril e a suspensão era alíquotada em criotubos de 2 mL (Nunclon-Delta, Nunc, Dinamarca) apropriados para o congelamento. As alíquotas eram mantidas por 24h em *deep-freezer* a -80°C (Bio Freezer, Forma Scientific, Marietta, Ohio) antes de serem transferidas para um botijão de nitrogênio (N₂) líquido (Omega EM-32, MVE Cryogenics, New Prague, Minnesota, USA). Para recuperar as formas promastigotas previamente criopreservadas, as alíquotas eram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37°C, inoculadas em meio 199, acrescido de 20% de soro fetal bovino (SFB) estéril e inativado, e mantidas a 25°C (estufa BOD-REVCO). As culturas recuperadas só eram utilizadas em experimentos após dois repiques consecutivos para total recuperação dos parasitos.

3.3 Animais

Camundongos machos de 5 a 6 semanas da linhagem BALB/c e C57Bl/6 foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Antes do início dos experimentos, todos os animais passaram por

protocolos de vermifugação utilizando Triatox[®] (Cooper, Cotia, SP, Brazil) e Albendathor[®] (Fabiani, Albendathor10) para prevenção de parasitos ectópicos e internos. O protocolo consiste na administração, via oral, de uma solução composta de 1 mL de Albendathor[®] em 250mL de água por 24h e no borrifamento de uma solução contendo 1,5 mL em 200 mL de Triatox[®] nos animais. Esse protocolo foi repetido duas vezes com um intervalo de uma semana entre eles. Todos os animais foram mantidos em isoladores no biotério do departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB-UFMG. Os estudos foram realizados de acordo com as leis brasileiras de experimentação animal. Para realização do presente trabalho os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA - 59/2022) e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento e estresse dos animais.

3.4 Infecção dos animais com *L. guyanensis* e/ou *L. major*

Camundongos BALB/c e C57Bl/6 foram infectados, subcutâneamente, nas patas traseiras, com 40 µl de uma suspensão em solução salina de 1×10^5 ou 1×10^6 de promastigotas de *L. major* e/ou *L. guyanensis* obtidas no 5^o dia de cultura (quando a grande maioria das promastigotas são metacíclicas infectantes). As *Leishmanias* utilizadas se encontravam na fase estacionária, 4^o-5^o dia após o repique, dias em que porcentagem de promastigotas metacíclicas é de praticamente 100% pelo menos para *L. guyanensis* (MENDES et al., 2019) embora para *L. major* a população possa ser heterogênea (SACKS, 1989). Para o experimento de quantificação de citocinas, os camundongos BALB/c foram infectados com 1×10^6 promastigotas de *L. guyanensis* em ambas as patas traseiras. Como grupos comparativos, camundongos BALB/c ou C57Bl/6 foram infectados da mesma forma com *L. major*. Ainda como controle, um grupo de camundongos BALB/c permaneceu não infectado.

Para o experimento com a apocinina, descrito mais à frente, os camundongos BALB/c foram infectados com 10^6 de *L. guyanensis* apenas em uma das patas traseiras.

3.5 Curso da infecção e quantificação de parasitos.

Para acompanhar o curso da infecção foi feita a medição semanal das patas infectadas com auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Kawasaki, Kanagawa, Japão). A medida do tamanho da lesão foi representada pela diferença do tamanho entre a pata infectada e a pata não infectada (média \pm EP) da semana 0.

Para quantificar o número de parasitos presentes na pata infectada foi utilizado o método de diluição limitante descrito em Afonso & Scott (1993) com algumas alterações. As patas infectadas com *L. major* ou *L. guyanensis* foram coletadas e transferidas para um tubo falcon pré-identificado contendo Meio 199 suplementado com 20% de SFB. Logo após, as patas foram maceradas com auxílio de macerador de tecidos de vidro. O conteúdo macerado foi transferido novamente para o tubo falcon para ser centrifugado por 4 min a 400 x *g* na temperatura de 4°C. Então, o sobrenadante foi vertido em um novo tubo falcon para ser novamente centrifugado, dessa vez a 2000 x *g* por 15 minutos à 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 400µl de Meio 199. Essa suspensão contendo parasitos foi diluída serialmente em fator de diluição de 4, de 1:4¹ até 1:4¹⁶, para um volume final de 200µL de Meio 199 com 20% de SFB em placa de cultura celular de 96 poços. Todo o processo descrito foi realizado em fluxo laminar e todos o material utilizados foram autoclavados para evitar possíveis contaminações. As placas foram incubadas por 10 dias a 25°C e analisadas em microscópio invertido (Olympus, IMT, Tóquio, Japão) para observação do crescimento dos parasitos.

3.6 Tratamento com apocinina

A apocinina (Acetovanilona 98%, Sigma-Aldrich) é um composto que, quando dimerizado no interior da célula, inibe especificamente a enzima NADPH oxidase responsável pela explosão respiratória e, conseqüentemente à produção de ROS. A apocinina foi dissolvida em água deionizada aquecida a 100°C, sendo então armazenada à temperatura ambiente. Camundongos BALB/c foram tratados ou não com 40mg/Kg de apocinina em 300µL por via intraperitoneal duas vezes por semana (a cada 3-4 dias).

3.7 Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos

Para coleta de macrófagos peritoneais, camundongos BALB/c foram injetados por via intraperitoneal com 2 mL de meio tioglicolato 4% para aumentar a quantidade de células na região (GORDON et al., 1974). Após 96 horas, os camundongos foram eutanasiados e 10ml de PBS gelado foram injetados na cavidade peritoneal do animal. Ainda com o auxílio de seringa e agulha (21G1”), o PBS injetado era homogeneizado dentro do abdômen do animal e, por fim, coletado e transferido para um tubo Falcon. O processo foi repetido até obter um volume final de 30 a 40ml.

As células, então, foram centrifugadas a 400 x *g* por 10 minutos e o *pellet* foi ressuspensionado em 1ml de RPMI incolor (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Oslo, Norway) para

evitar que a coloração não interferisse com a leitura posterior no luminômetro. Por fim, a suspensão de células foi contada com auxílio da câmera de Neubauer para plaqueamento em placas de 96 poços para o ensaio de quantificação de ROS.

3.8 Quantificação de ROS

Para quantificar a produção de ROS, camundongos machos da linhagem BALB/c foram injetados por via intraperitoneal com 2 ml de tioglicolato 4%. Após 96 horas, os animais foram eutanasiados e células peritoneais eram coletadas, como descrito anteriormente. As células coletadas eram centrifugadas a 400 x *g* por 10 minutos e o *pellet* foi ressuscitado em 1 ml de RPMI incolor. Para leitura, 1x10⁶ células, por poço, foram plaqueadas em placas para luminômetro de 96 well com ou sem estímulo de 50 μ l de zymosan (1mg/ml) e 25 μ l de luminol (0,05mM). A produção de ROS foi avaliada em um luminômetro de microplacas (Cambridge Technology, Cambridge, UK) em intervalos de 2 minutos por 2 h.

3.9 Obtenção de antígeno

O antígeno utilizado nos experimentos foi produzido a partir de cultivo de *Leishmania major* ou *Leishmania guyanensis* obtidas no 4-5^o dia, quando eles se encontravam, em sua maioria, na fase estacionária de crescimento, como verificado para *L. guyanensis* (MENDES et al., 2019). As promastigotas foram centrifugadas a 2000 x *g* por 15 minutos e o *pellet* foi ressuscitado em 20 ml de solução salina para retirada total do Meio 199. Após essa etapa de lavagem, o *pellet* foi ressuscitado em 10mL de PBS e submetido a sete ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e banho-maria 37°C, respectivamente, para rompimento dos parasitos. A quantificação de proteína era então feita no extrato total dos parasitos pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Por fim, o extrato era aliqotado em *pellets* de 1 mg/mL e estocados em freezer a -80°C.

3.10 Cultura de células de linfonodo

Linfonodos poplíteos esquerdos e direitos foram coletados de camundongos C57Bl/6 e BALB/c infectados com *L. major* ou *L. guyanensis* nas patas traseiras com auxílio de kit cirúrgico esterilizado em autoclave. Após a coleta, os linfonodos foram macerados com auxílio de maceradores de vidro e o conteúdo final foi ressuscitado em 2 ml de RPMI e centrifugado a 400 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 1 ml de RPMI contendo 20% de SFB. As células presentes na suspensão foram quantificadas

com auxílio de uma câmara de Neubauer e adicionadas em placas de cultivo celular de 24 poços na concentração de 1×10^6 de células em 1 mL de RPMI suplementado com 20% SFB. As células eram plaqueadas com ou sem estímulo de 50 μ l de suspensão de antígeno de *L. guyanensis* ou *L. major* e, então, eram incubadas em estufa 5% CO₂ a 37°C. Após 72 horas todo o sobrenadante era coletado e mantido em freezer a -20°C.

3.11 Citometria de fluxo

Quatro semanas após a infecção com *L. major* ou *L. guyanensis*, patas de camundongos BALB/c e C57Bl/6 foram coletadas. As amostras retiradas das patas foram encubadas por 90 minutos em uma solução contendo 62,5 μ g/mL de liberasse TL (Roche) e 0,5 mg/mL de desoxiribonuclease I (sigma Aldrich) diluídas em 1 ml de RPMI incompleto (Gibco). Após o período de encubação, as amostras foram maceradas com a adição de 1 mL de RPMI 10% SFB. Em seguida, o homogenato foi centrifugado por 10 min a 400 x g.

Na sequência, as células foram lavadas e encubadas por 15 min com o kit para avaliação de viabilidade celular LIVE/DEAD™ (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) junto ao anticorpo anti-Fc- γ III/II CD16/32 (clone 2.4G2) e com o seguinte mix de anticorpos monoclonais fluorescentes: CD45 (30-F11); B220 (RA3-6B2); TCR- β (H57-597); CD8a (53-6.7); CD4 (RM4-5); FOXP3 (MF-14). Logo após, as células foram lavadas para remoção do excesso de anticorpos e fixas com PFA 2% por 20 minutos.

Logo após as lavagens, as células foram encubadas por 45 minutos com Perm/Wash Buffer™ (BD) juntamente com o seguinte mix de anticorpos intracelulares: FOXP3 (MF-14), IFN- γ (XMG1.2) e IL-4 (BVD4-1D11). Novamente as células passaram por uma sequência de lavagens para remoção do excesso de anticorpos.

Por fim, as amostras adquiridas foram lidas utilizando o citômetro de fluxo DXFlex (Beckman Coulter). As análises foram realizadas no software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

A estratégia de *gating* utilizada para as análises estão representadas na figura 5.

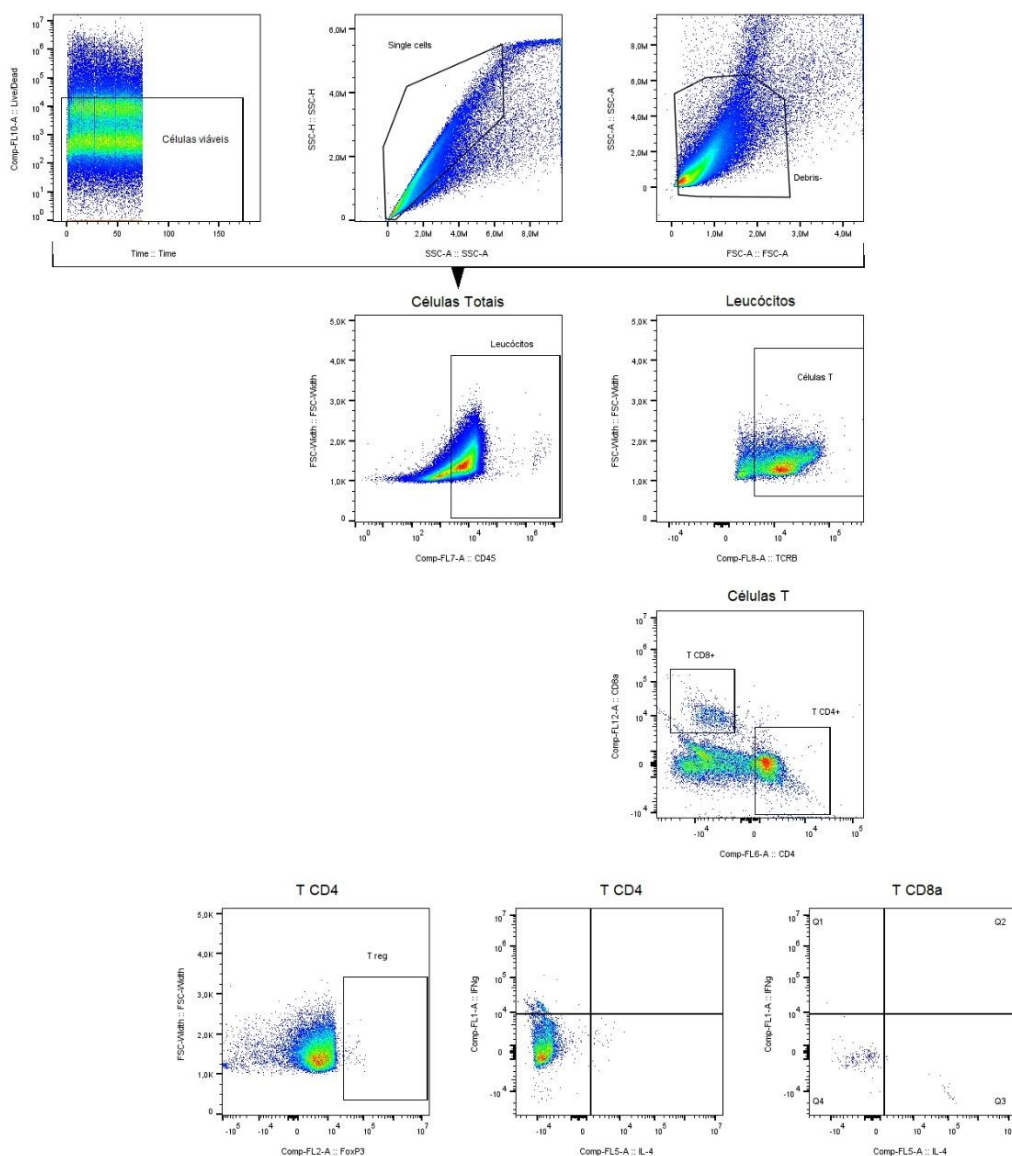


Figura 5 – Estratégia de *gating* para as análises de citometria de fluxo

3.12 ELISA

Os sobrenadantes coletados das culturas de linfonodo foram utilizados para quantificar a produção das citocinas IFN- γ e IL-4. Para realização dos experimentos, foram utilizados kits (BD e R&D, respectivamente) exclusivos para detecção das citocinas. As recomendações do fabricante foram seguidas com pequenas alterações descritas a seguir.

Para detecção de IFN- γ , placas de ELISA (Nalgene NUNC, Rochester, NY, EUA) foram sensibilizadas com 50 μ l por poço de tampão de cobertura, solução composta por anticorpo de captura diluído em 5 mL de tampão de carbonato de cálcio, pH 9,5. As placas sensibilizadas foram incubadas por 18h a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3

vezes com PBS contendo 0,05% Tween (PBS/Tween) utilizando uma lavadora de microplacas de ELISA (BioTek® 50™ TS Microplate Washer) e bloqueadas utilizando 200 μ l por poço do diluente especificado no protocolo (PBS + 10% SFB (PBS/SFB)). Após incubação por 1h a 25°C, as placas foram novamente lavadas 3 vezes com PBS/Tween e as amostras diluídas em PBS/SFB (1:5) foram adicionadas na placa em um volume final de 50 μ l por poço. Nessa mesma etapa, o padrão foi adicionado na concentração de 1ng/mL em duplicata e diluído (1:2) nos poços subsequentes para montagem da curva padrão. Mais um ciclo de lavagem foi realizado após o fim da incubação de 2h a 25°C. Logo após, 10 μ l de anticorpo de detecção e 20 μ l de conjugado estreptavidina-peroxidase foram diluídos em 5ml de diluente e 50 μ l dessa solução foi adicionada em cada poço. Ao fim da incubação de 1h a 25°C, as placas foram lavadas 7 vezes. Para a etapa de revelação, foram adicionados 50 μ l por poço de uma solução composta por Tetrametil-benzidina (TMB) (1 mg/mL) e 2 μ l de H₂O₂ 30% diluído em tampão citrato-fosfato (0,1M, pH=4,0). Após acompanhar o aparecimento de cor, a reação era parada com a adição de 25 μ l de ácido sulfúrico (2N) por poço. As placas foram lidas em um comprimento de onda de 450nm com um leitor de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Para a dosagem de IL-4 as placas foram sensibilizadas com anticorpo de captura diluído em PBS e bloqueadas com 200 μ l de PBS contendo 1% BSA (PBS/BSA). Já as amostras não foram diluídas e, portanto, foram adicionadas em um volume final de 50 μ l por poço. O protocolo de dosagem dessa citocina contava com incubações separadas do anticorpo de detecção e de conjugado estreptavidina-peroxidase. Primeiramente eram adicionados 50 μ L de anticorpo de detecção diluído em PBS/BSA e incubado por 2h a 25°C e, depois, eram adicionados 50 μ l do conjugado diluído na solução diluente (1:40) e incubado por 20 minutos a 25°C. Com exceção dessas alterações, o procedimento utilizado para dosagem de IL-4 foi o mesmo descrito anteriormente para a dosagem de IFN- γ .

3.13 Análise estatística

As análises foram feitas com o programa GraphPad Prism 5.5 (San Diego, CA, USA), utilizando-se t-test de Student não pareado; os valores de P que são estatisticamente significativos foram determinados para cada análise e estão indicados em cada gráfico. Os experimentos também foram analisados para a existência de *outliers* e todos foram removidos para a análise.

4. RESULTADOS

4. 1 Infecção por *L. guyanensis* não gera lesões em camundongos BALB/c.

Com o objetivo de verificar e reproduzir o curso de infecção de camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis*, animais foram infectados com promastigotas em ambas as patas. Promastigotas de *L. major* também foram utilizadas no experimento para infectar camundongos BALB/c e C57BL/6, a fim de reproduzir a infecção amplamente descrita na literatura e para servir de comparação com a infecção feita por *L. guyanensis*. A avaliação da progressão da lesão foi feita a partir da medição semanal das patas infectadas.

Como pode ser observado na figura 6A, não houve desenvolvimento de lesão em camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis* por pelo menos dez semanas após a infecção. Esse desfecho é semelhante à infecção de camundongos C57BL/6 com *L. major*, onde há um leve desenvolvimento da lesão que cessa e regride após a quarta semana de infecção. Como comparação, ainda na figura 6A, podemos observar que camundongos BALB/c infectados com *L. major* apresentam um crescimento progressivo da lesão e posterior ulceração das patas. Esses resultados confirmam dados da literatura que descrevem as linhagens BALB/c e C57BL/6 como suscetíveis ou resistentes à infecção por *L. major*, respectivamente e a linhagem BALB/c como resistente à *L. guyanensis*.

Para verificarmos se o desenvolvimento ou não de lesão correlaciona-se com a quantidade de parasitos no local de inóculo, foi realizada a quantificação de parasitos utilizando as patas dos camundongos infectados. Na 8ª semana de infecção, realizou-se uma diluição seriada do conteúdo macerado das patas infectadas e, após 10 dias de incubação em meio de cultura, as placas foram analisadas em microscópio óptico para contagem de promastigotas provenientes de amastigotas das lesões.

Como pode ser observado na figura 6B, o aumento ou não da espessura da pata correlaciona-se com a quantidade de parasitos presentes no local da inflamação. Na 8ª semana de infecção, camundongos BALB/c infectados com *L. major* apresentaram uma carga parasitária consideravelmente maior do que dos animais infectados com *L. guyanensis*. A baixa taxa de parasitos recuperados de animais infectados com *L. guyanensis* (10.000 vezes menor quando comparado com animais infectados com *L. major*) indica que, na 8ª semana de infecção, camundongos BALB/c são capazes de eliminar a grande maioria dos parasitos na pata quando infectados com *L. guyanensis*. Este padrão não é observado quando a mesma linhagem é infectada com *L. major*. Não foi feita a recuperação de parasitos em camundongos C57BL/6 infectados com *L. major*.

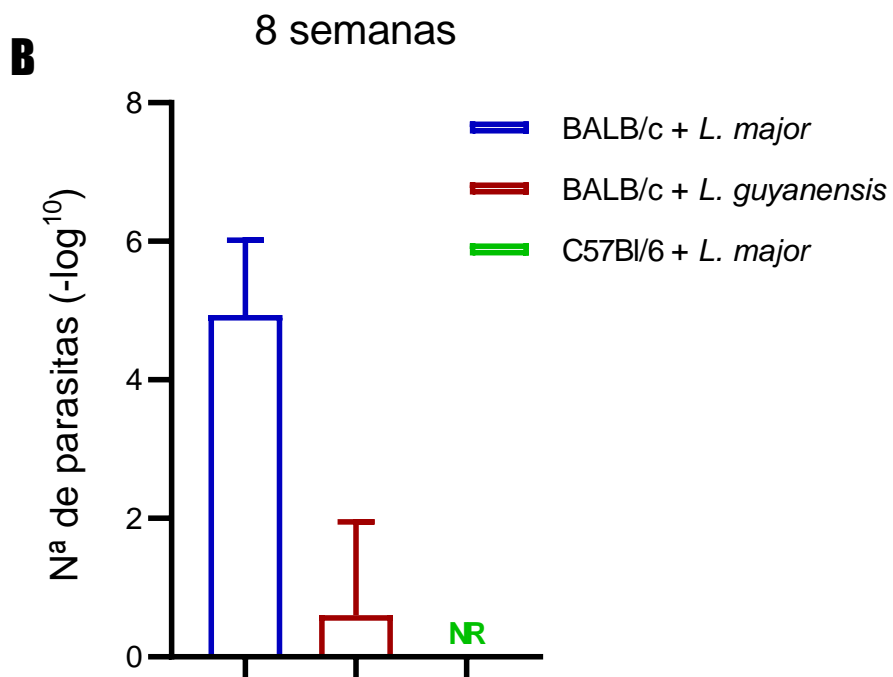
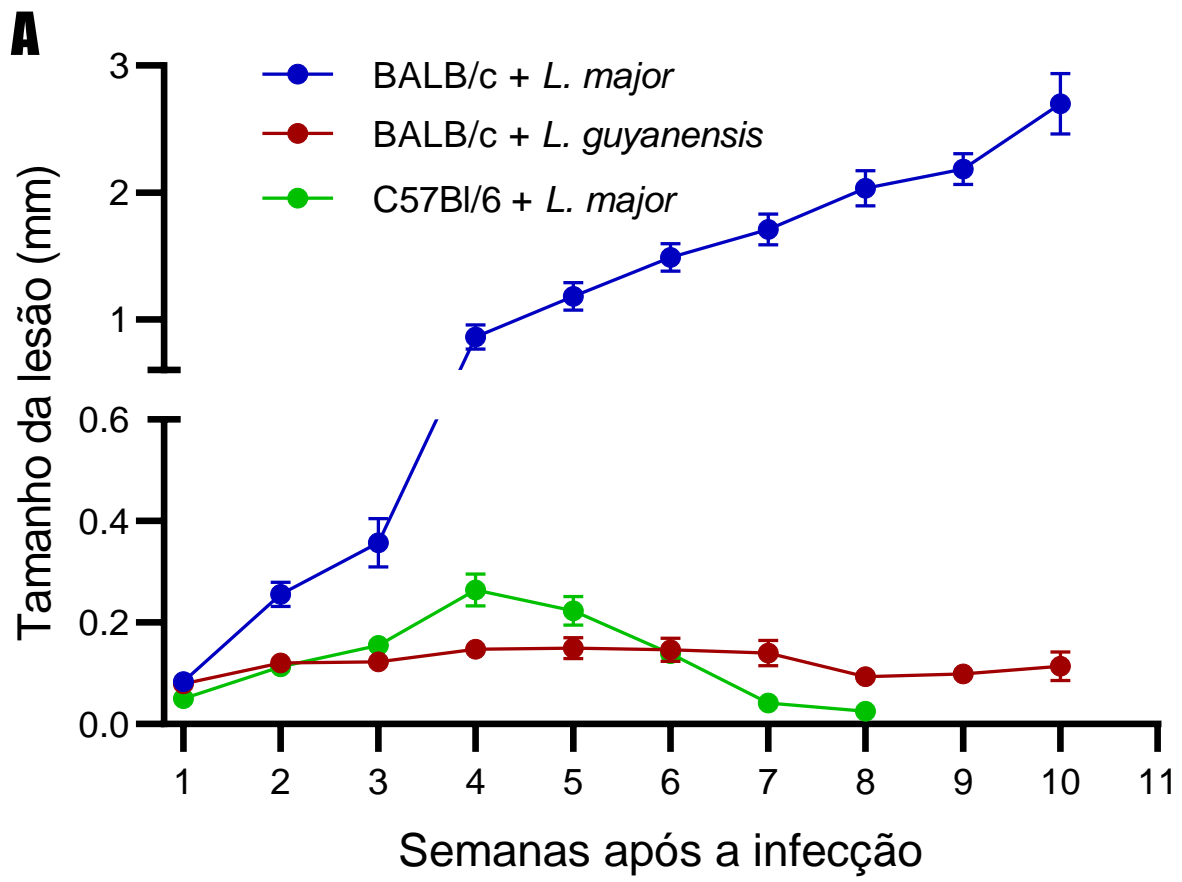


Figura 6: Progressão da lesão em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. guyanensis* ou *L. major* e quantificação de parasitos após 8 semanas de infecção. (A) Grupos de 10 camundongos BALB/c ou C57BL/6 foram infectados com 1×10^6 promastigotas de *L. major* (azul e verde) ou *L. guyanensis* (vermelho) em ambas as patas traseiras. O desenvolvimento da lesão foi monitorado por 8 semanas (C57BL/6 com *L. major*) ou 10 semanas (BALB/c com *L. major* ou *L. guyanensis*). O tamanho da lesão foi representado como a diferença entre a espessura da pata infectada pela não infectada (semana 0). Cada ponto representa a média das medidas \pm EP **(B)** Para cada grupo, patas de 5 camundongos foram coletadas para quantificação de parasitos na oitava semana após a infecção. As barras verticais representam o número médio de parasitos \pm DP por pata (representados como o logaritmo negativo do título de parasitos). EP = Erro padrão; DP= Desvio padrão; NR = Não realizado.

4. 2 O tratamento de camundongos BALB/c com apocinina inibe a produção de ROS.

Resultados anteriores do nosso laboratório demonstraram que, *in vitro*, macrófagos de camundongos BALB/c matam amastigotas de *L. guyanensis* por apoptose, por meio de ROS, produzidas pela explosão respiratória induzida pelo próprio parasito (SOUSA-FRANCO, 2006). Para avaliar se a explosão respiratória participava na eliminação do parasito *in vivo*, participando da resistência de camundongos BALB/c à infecção por *L. guyanensis*, utilizamos a apocinina, um potente inibidor da enzima NADPH oxidase durante a infecção. Assim, para verificar se a dose de apocinina que iríamos utilizar inibia completamente a explosão respiratória dos macrófagos de camundongos BALB/c e por quanto tempo, tratamos os camundongos com 40 mg/Kg de apocinina, injetada intraperitonealmente, e quantificamos a produção de ROS 1, 2, 3 ou 5 dias após o tratamento. Para isto, macrófagos peritoneais de camundongos, tratados ou não com apocinina, foram coletados e utilizados para o ensaio de quimioluminescência descrito em Material e Métodos.

É possível observar, na figura 7, que macrófagos peritoneais de camundongos produzem ROS quando estimuladas por zymosan, indutor da explosão respiratória. Como esperado, as células dos grupos tratados com apocinina mostraram uma redução de cerca de 70% na produção de ROS, já no primeiro dia após o tratamento. Esta redução aumenta com o tempo, chegando a 100% de inibição no 3º dia. No 5º dia, o efeito da apocinina ainda é considerável, mas já começa a desaparecer, com as células tendendo a se aproximarem dos valores do 1º e 2º dia. Com esses resultados, para que a explosão respiratória ficasse completamente inibida durante todo o experimento, a apocinina foi injetada nos camundongos infectados com intervalos de 3 dias.

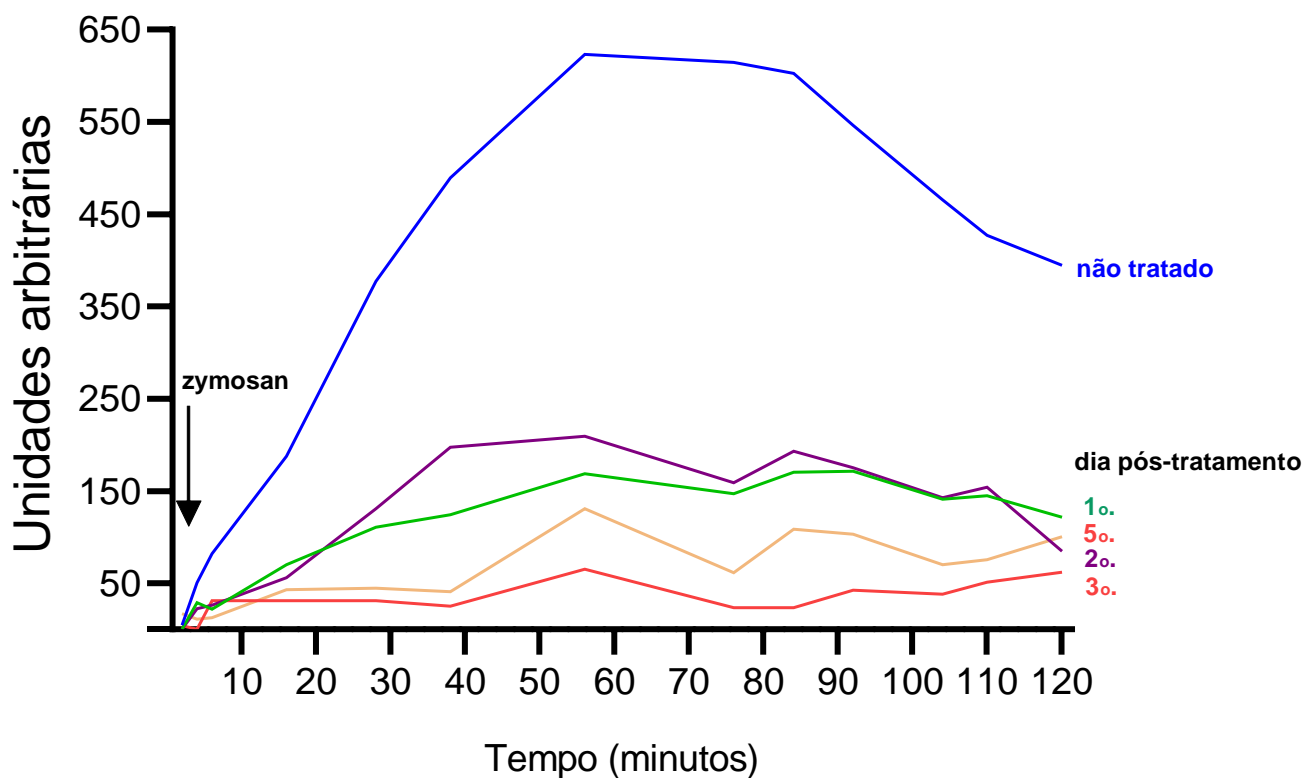


Figura 7: Efeito da apocinina na produção de ROS por macrófagos de camundongos. Camundongos foram tratados, via intraperitoneal, com 40 mg/Kg de apocinina 1 dia (verde), 2 dias (roxo), 3 dias (vermelho) ou 5 dias (amarelo) antes da quantificação de ROS. Animais não tratados (azul) foram utilizados como controle negativo para o experimento. O ensaio de oxidação do luminol por quimioluminescência foi realizado usando zymosan como estimulador da produção de ROS.

4. 3 A explosão respiratória é importante para resistência de camundongos BALB/c infectados por *L. guyanensis* nas primeiras semanas de infecção.

Para verificar se a explosão respiratória, como ocorre *in vitro*, é importante na eliminação dos parasitos durante a infecção de camundongos BALB/c por *L. guyanensis*, 20 camundongos tiveram suas patas infectadas com 1×10^6 promastigotas de *L. guyanensis*, como descrito em Material e Métodos. Logo após a infecção, 10 animais foram tratados com 40 mg/Kg de apocinina, por via intraperitoneal, duas vezes na semana durante todo experimento, de acordo com os resultados apresentados anteriormente (Fig. 7). Os animais não tratados foram utilizados como controle da infecção. A progressão da lesão foi avaliada semanalmente, como também descrito em Material e Métodos.

Como pode ser observado na figura 8, e como já demonstrado nos resultados anteriores (Fig. 6A), camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis* apresentam pouca progressão da lesão (máximo 0.2 mm), mostrando sua resistência à infecção. No entanto,

quando tratados com apocinina, os animais infectados apresentaram um maior aumento no tamanho da pata verificado da 3ª à 7ª semana, sendo que da 4ª à 6ª semana pós infecção, o tamanho da pata dos animais tratados chegou a ser cerca de 2 vezes maior quando comparados com os animais não tratados. Estes resultados indicam que a explosão respiratória é um mecanismo importante para a resistência de camundongos BALB/c frente à infecção por *L. guyanensis* nas primeiras semanas de infecção.

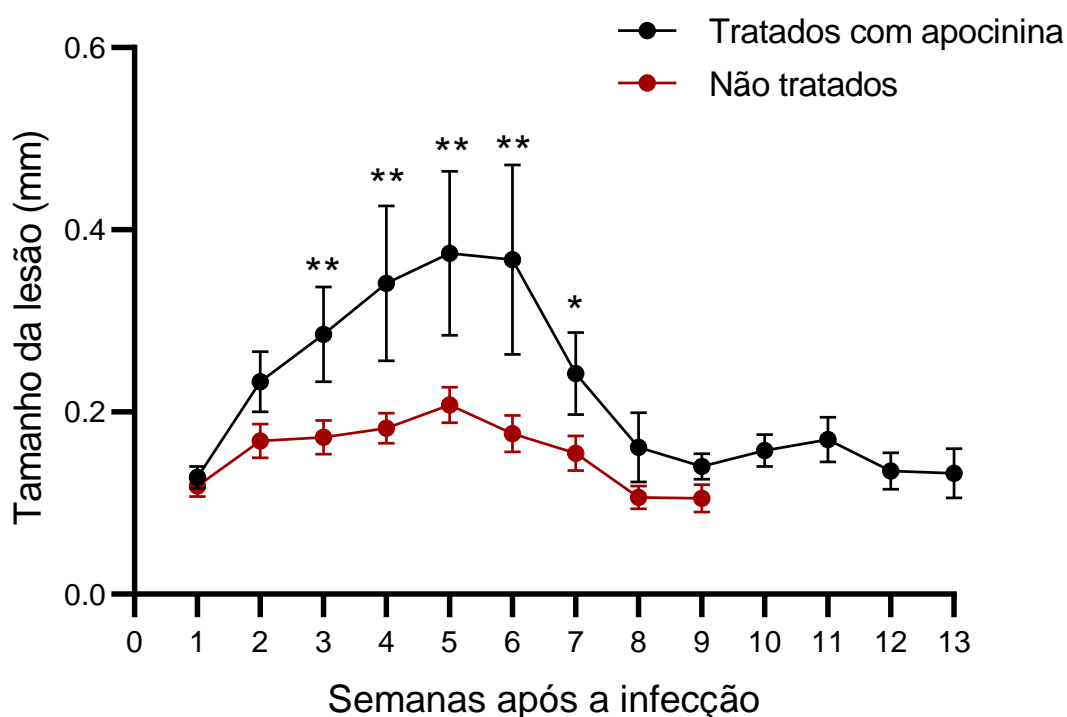


Figura 8: Efeito da inibição da explosão respiratória sobre o tamanho da lesão de camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis*. Camundongos BALB/c foram infectados com 1×10^6 promastigotas de *L. guyanensis* e, no dia da infecção, tratados (n=10) ou não (n=30) com 40 mg/Kg de apocinina, via i.p, duas vezes na semana durante todo período do experimento. A progressão da lesão foi monitorada pela medida da espessura da pata infectada. O tamanho da lesão foi representado como a diferença entre a espessura da pata infectada pela não infectada. *P < 0,05; ** P < 0,01

4. 4 Camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis* produzem IFN- γ mas não IL-4, tanto nas patas (avaliado 4 semanas) quanto nos linfonodos (avaliado em 8 semanas).

Com objetivo de verificar qual o tipo de resposta de linfócitos Th é montada frente à infecção de BALB/c por *L. guyanensis*, patas de animais infectados com 1×10^6 foram

utilizadas para realização de citometria de fluxo para a detecção de IFN- γ e de IL-4, citocinas características de respostas Th1 e Th2, respectivamente. Para esse experimento, utilizamos camundongos BALB/c e C57Bl/6 infectados com *L. major* de forma a servir de controle comparativo com o grupo de interesse. Camundongos não infectados foram utilizados como controle negativo. Os animais infectados tiveram suas patas coletadas 4 semanas após a infecção, a fim de avaliar a produção das citocinas no início da resposta imune adaptativa.

Na figura 9A podemos observar que a frequência de linfócitos Th produtores de IFN- γ (TCD4+ IFN- γ + IL-4-) em camundongos BALB/c infectadas com *L. major* (azul) não é maior do que em camundongos não infectados (preto), condizente com o que já está estabelecido na literatura. Por outro lado, a frequência dessas células em camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis*, (vermelho) é igual à de camundongos C57Bl/6 infectados com *L. major* (verde), que desenvolvem uma resposta do tipo Th1, esta última também condizente com a literatura, chegando a ser 3 vezes maior, quando comparado com a frequência basal de animais não infectados (preto).

Com relação à IL-4 (Fig. 9B), a porcentagem de LTh de camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis* que a produzem (TCD4+ IFN- γ - IL-4+) (vermelho) não é diferente da observada em LTh de camundongos não infectados (preto) ou de camundongos C57Bl/6 infectados com *L. major* (verde), este último também condizente com dados da literatura. Dados relativos à produção de IL-4 por camundongos BALB/c (azul) infectados com *L. major* não foram obtidos.

Nesse experimento, avaliamos ainda a intensidade média de fluorescência das células analisadas e verificamos que é a mesma para todos os grupos (Fig. 9 C e D)

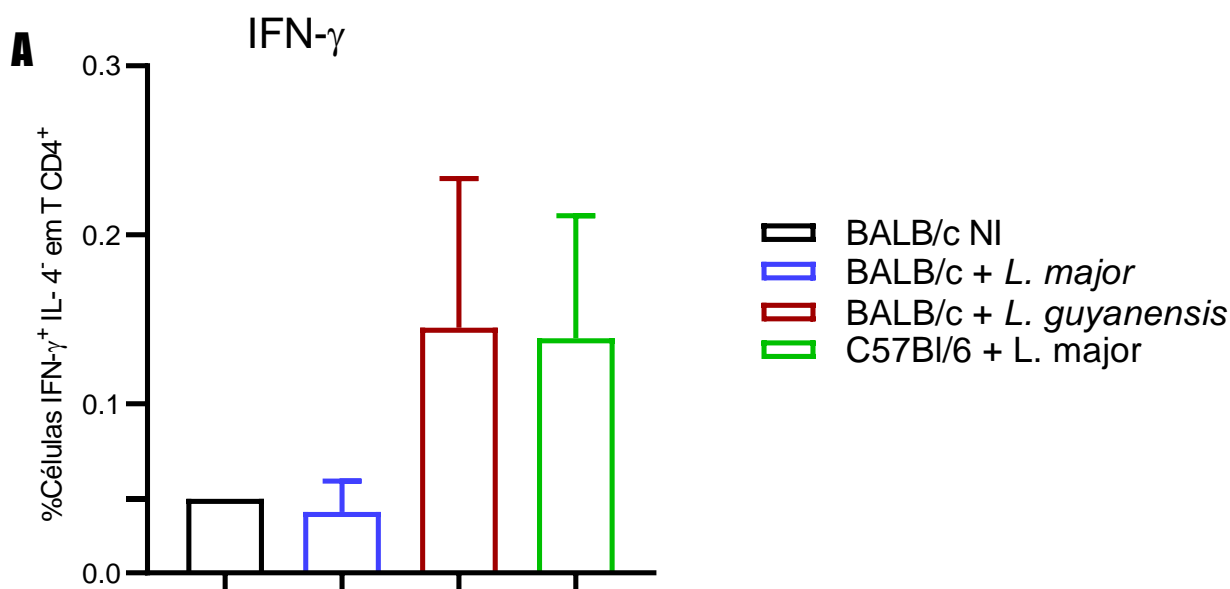
Além de avaliarmos a frequência de LTh produzindo IFN- γ e IL-4 na 4^a. semana, nas patas dos camundongos infectados com *L. guyanensis*, avaliamos também a concentração destas citocinas produzidas por células dos linfonodos poplíteos, na 8^a semana de infecção com *L. guyanensis*, período no qual poucos parasitos são detectados na lesão (Fig. 6B). Utilizamos, desta vez, o ensaio de ELISA, animais não infectados foram utilizados como controle negativo e utilizamos antígeno de *L. guyanensis* para estimular as células dos linfonodos como descrito em Material e Métodos.

Os dados apresentados na figura 10 mostram que, também na 8^a semana após a infecção, é observado a produção de IFN- γ pelas células de linfonodos de camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis* (Fig. 10A). A produção de IFN- γ apresentou um aumento de cerca de 17 vezes sem a adição de antígeno e de cerca de 47 vezes com a adição de antígeno de *L. guyanensis* em comparação com o grupo controle, composto por animais não infectados. Esses dados também demonstram que, ao contrário das células de

animais não infectadas, as células dos camundongos infectados são sensíveis a antígenos de *L. guyanensis*.

Ao contrário do que foi observado na quantificação de IFN- γ , a produção de IL-4 em camundongos infectados com *L. guyanensis* não foi observada, apresentando valores semelhantes aos obtidos nos animais não infectados (Fig. 10B), na presença ou na ausência de antígeno de *L. guyanensis*. Estes resultados apontam que a produção de IFN- γ parece ser contínua até pelo menos a oitava semana de infecção enquanto IL-4 continua não sendo produzida, mostrando que o padrão de citocinas produzido pelas células do linfonodo é o mesmo observado na pata infectada na 4ª semana (Fig. 9) com aumento da produção de IFN- γ e nenhuma produção de IL-4.

Coletivamente, esses dados demonstram que camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis* desenvolvem uma resposta imune adaptativa do tipo Th1, com a produção de IFN- γ e ausência de produção de IL-4, confirmando nossa hipótese. Esse padrão é o mesmo apresentado por camundongos C57Bl/6 infectado com *L. major* e é o oposto do reportado para camundongos BALB/c infectados com a mesma espécie.



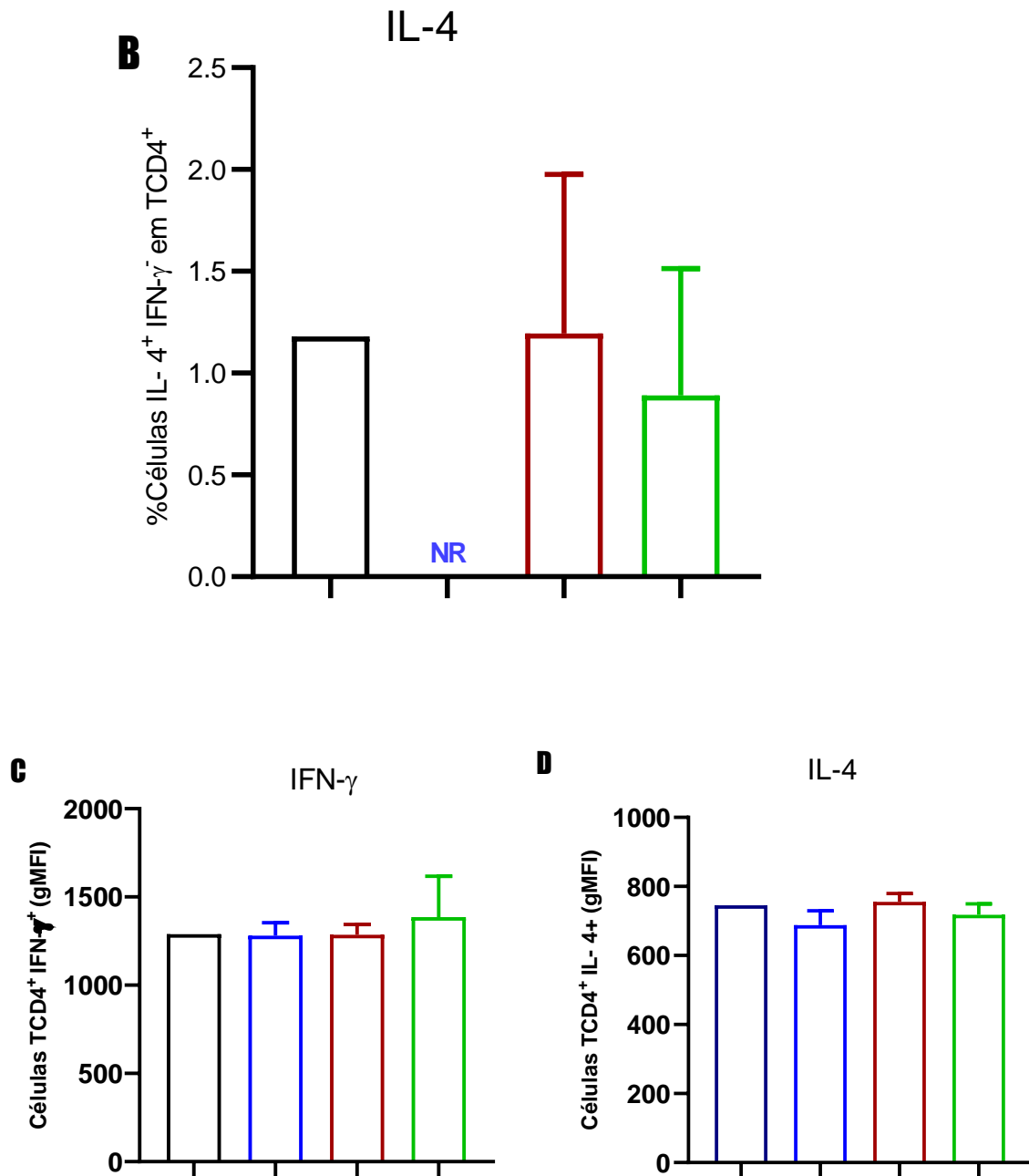


Figura 9. Produção de IFN- γ e IL-4 por células da pata de camundongos BALB/c e C57Bl/6 infectados com *L. guyanensis* ou *L. major*. Camundongos BALB/c ou C57Bl/6 foram infectados nas patas com 1×10^6 de promastigotas de *L. guyanensis* ou *L. major* (n=5). Após 4 semanas de infecção, as patas foram removidas e as células da lesão utilizadas para realização de citometria de fluxo. **(A)** Porcentagem de linfócitos TCD4⁺ IFN γ ⁺ IL4⁻. **(B)** Porcentagem de linfócitos TCD4⁺ IFN γ ⁻ IL4⁺. **(C)** Intensidade de fluorescência média de TCD4⁺ IFN γ ⁺ IL4⁻; **(D)** Intensidade de fluorescência média de linfócitos TCD4⁺ IFN γ ⁻ IL4⁺; NI = não infectados - pool de células. NR = Não realizado

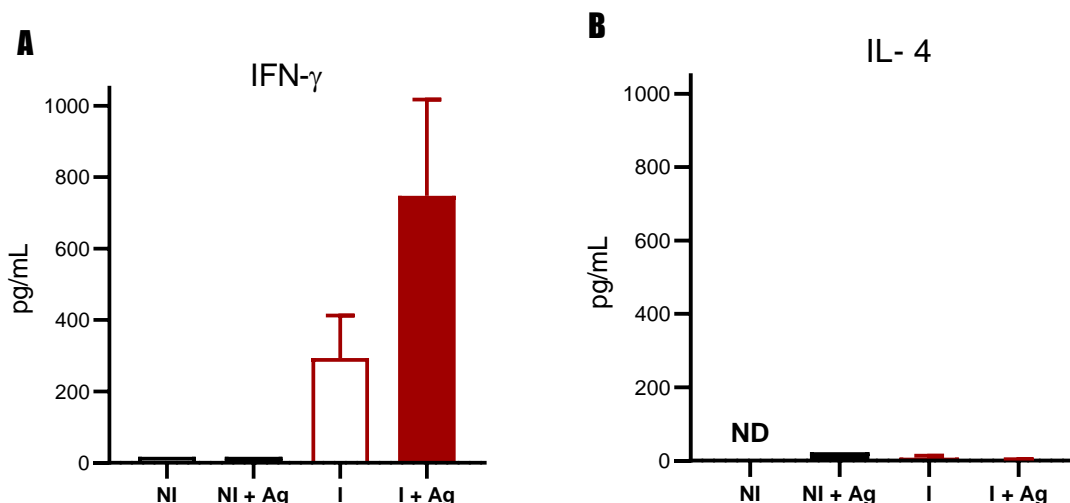


Figura 10: Produção de IFN- γ e IL-4 por células do linfonodo de camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis*. Os linfonodos poplíteos de 5 camundongos BALB/c infectados em ambas as patas traseiras com 1×10^6 promastigotas de *L. guyanensis* foram coletados após 8 semanas de infecção. As células dos linfonodos foram cultivadas na presença ou ausência de antígeno de *L. guyanensis* (Ag) e, após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para quantificar a produção de IFN- γ (A) ou IL-4 (B) pelo ensaio de ELISA. NI=não infectado; I=infectado; ND= Não detectado

5. DISCUSSÃO

Por muitos anos, estudos em camundongos vêm sendo utilizados para elucidar padrões imunológicos responsáveis pelo desenvolvimento ou não de lesão em leishmaniose cutânea. Espécies vinculadas à leishmaniose no velho mundo, como a espécie *L. major*, foi amplamente estudada e, devido a isso, sabe-se bastante a respeito dos aspectos imunológicos responsáveis pela sua resistência e susceptibilidade (HEINZEL, et al., 1989; SCOTT, 1991; HEINZEL et al., 1993; KOPF et al., 1996; REINER & LOCKSLEY, 1995; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Entretanto, apesar de ser um modelo experimental que elucidou muitas questões relacionadas a resposta protetora em leishmaniose, ele não representa todas as variáveis de infecções envolvendo diferentes espécies de *Leishmania* e diferentes linhagens de camundongo.

Nas Américas, 1 a cada 10 casos registrados de LC são resultantes da infecção por *L. guyanensis* (OLIVER, MINGUEZ-MENENDEZ & FERNANDEZ-PRADA, 2019), uma espécie do subgênero *Viannia* que pode sofrer metástases para tecidos da mucosa oral, resultando na leishmaniose mucocutânea (BIDDLESTONE et al., 1994; ROMERO et al., 2002; ABADÍAS-GRANADO et al., 2021). Um estudo, feito em 2015, em uma região endêmica do Brasil sugeriu a existência de subnotificação em infecção por *L. guyanensis*, ocasionado

por diagnósticos incorretos entre as espécies encontradas no país (PIRES et al., 2015). Entretanto, apesar da sua importância epidemiológica nas Américas, pouco se sabe a respeito dos mecanismos imunológicos relacionados à resistência em infecções causadas pela espécie. A ausência de estudos sobre a espécie é evidente ao considerarmos a quantidade de artigos ao pesquisarmos termos referentes à *L. guyanensis* no portal PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Acessado no dia 07 de outubro de 2024, enquanto a busca pela palavra-chave “*Leishmania*” leva ao achado de 32.689 resultados, apenas 605 (1,85%) destes resultados contêm a espécie *L. guyanensis*. Destes últimos apenas 86 (0,26%) apresentam os termos “*immunity*” ou “*immune*” juntamente com *L. guyanensis*. Estes números demonstram a lacuna de conhecimento que existe para a espécie, principalmente no que se refere à resposta imune e a imunidade protetora estimulada por ela.

Em trabalhos anteriores, o nosso grupo de pesquisa mostrou que camundongos BALB/c, susceptíveis à infecção por *L. major* e *L. amazonensis*, desenvolvendo graves lesões no sítio da infecção, não desenvolvem lesões durante a infecção por *L. guyanensis* (SOUSA-FRANCO, 2006; MENDES, 2011; da Mata et al., 2015; MENDES et al., 2019). No presente trabalho, confirmamos estes dados para darmos continuidade ao nosso estudo. Mostramos que a linhagem de camundongos BALB/c infectada com *L. major* apresenta desenvolvimento progressivo da lesão até pelo menos a 10^a. semana de infecção. Por outro lado, essa mesma linhagem quando infectado com *L. guyanensis* não desenvolve lesão durante as mesmas semanas analisadas, de forma muito semelhante ao que ocorre com camundongos C57BL/6 infectados com *L. major*, que é um padrão amplamente conhecido na literatura de resistência à leishmaniose cutânea no modelo murino (Fig. 6A). Isto demonstra que a mesma linhagem de camundongos que morre da infecção por *L. major* ou *L. amazonensis*, é totalmente resistente à infecção por *L. guyanensis*. Isto demonstra também que *L. guyanensis* deve possuir componentes diferentes de *L. major* e *L. amazonensis*, que é capaz de estimular em camundongos BALB/c, resposta imune totalmente diferentes nesses camundongos. Alternativamente, *L. guyanensis* pode estimular respostas imunes semelhantes às estimuladas pelas duas outras espécies, mas que *L. guyanensis* é sensível e *L. major* e *L. amazonensis* possui resistência aos mecanismos efetores induzidos.

É possível que a ausência de lesão na infecção por *L. guyanensis* seja devida à eliminação dos parasitos pelos animais durante a infecção, como visto pelo número de parasitos no sítio de lesão, ao contrário do que ocorre na lesão ocasionada pela infecção por *L. major* onde o número de parasitos é cerca de 10.000 vezes maior do que na lesão acarretada por *L. guyanensis* (Fig. 6B). Em nossos resultados, é possível observar que a diferença no crescimento da lesão é evidenciada a partir da 4^a semana, momento no qual o sistema imune adaptativo do hospedeiro já foi ativado, sugerindo uma ativação diferenciada de linfócitos TCD4⁺ (Th). Como mencionado anteriormente, dados da literatura mostram que

a resistência de C57Bl/6 à infecção por *L. major* está associada à produção de citocinas inflamatórias, como IL-12 e IFN- γ que, de maneira direta ou indireta, ativam linfócitos Th a produzir mais IFN- γ que induzem os macrófagos a sintetizarem a iNOS, e produzir NO, gás tóxico para *Leishmania* (REINER et al., 1994; OLEKHNOVITCH & BOUSSO, 2015; FORMAGLIO et al., 2021). Já a susceptibilidade da linhagem BALB/c à mesma espécie é decorrente da ausência de produção da citocina IL-12 e a grande produção de IL-4, que não só não induz a síntese de NO, como ativa os linfócitos Th a produzirem mais IL-4 além de IL-10 e IL-13, citocinas que inibem a produção de NO pelo fagócitos (LIEW et al, 1991; CUNHA, MOHCADA & LIEW, 1992; DOHERTY et al, 1993; REINER & LOCKSLEY, 1995; HIMMELRICH et al., 1998; LI et al., 2002). Além do mais, ao contrário de outros modelos de resistência, como C57Bl/6 infectados com *L. major* e BALB/c infectados com *L. braziliensis*, nos quais a lesão geralmente aumenta até a quarta ou quinta semana, a infecção por *L. guyanensis* resulta em pouco ou nenhum desenvolvimento da lesão. Isto sugere que o controle do crescimento da lesão nas primeiras semanas é resultante de uma resposta imune inata eficaz que controlaria a replicação do parasito até que a resposta adaptativa se desenvolva.

A importância da produção de ROS na eliminação de patógenos pelos macrófagos já foi amplamente debatido na literatura (NOVAIS et al., 2014; DRYDEN, 2018). Quando são produzidas, ROS reagem rapidamente com moléculas do parasita, incluindo seu DNA, lipídios, proteínas e carboidratos, levando à apoptose (ROOS & WINTERBOURN, 2002). Estudos anteriores mostraram que o ânion superóxido juntamente com o peróxido de hidrogênio são tóxicas para *L. panamensis* e *L. guyanensis* (ACESTOR et al., 2006). Dados do nosso laboratório, da mesma época, mostraram que macrófagos de camundongos BALB/c, quando infectados *in vitro* com *L. guyanensis*, matam as amastigotas apenas com o estímulo da infecção. A infecção de macrófagos, por si só, induz a explosão respiratória nessas células, com a produção de ROS. A morte dos parasitas nos macrófagos ocorre por apoptose, e a inibição da produção de ROS abole totalmente a capacidade de eliminação dos parasitos pelos macrófagos. Esses resultados mostraram que a morte dos parasitos *in vitro* é causada por ROS, mostrando ainda que é independente da produção de NO (SOUSA-FRANCO et al., 2006). Foi ainda mostrado que a morte dos parasitos era causada principalmente pelo O_2^- e pelo H_2O_2 (MENDES, 2016). No entanto, não havia sido demonstrado que a explosão respiratória tinha algum papel *in vivo* na resistência à infecção de camundongos BALB/c por *L. guyanensis*, fazendo-se necessário validar esse mecanismo *in vivo*.

Um composto bem utilizado para inibir a produção de ROS é a apocinina, um inibidor da enzima Phox, droga que foi utilizada *in vitro* nos estudos anteriores do nosso grupo

(SOUSA-FRANCO et al., 2006). Assim decidimos utilizar a apocinina para investigar a importância de ROS na resistência de camundongos BALB/c à infecção por *L. guyanensis*. Na literatura, é possível encontrar diversos estudos que utilizam a apocinina para investigar a participação de ROS em várias patologias, como artrite (HART et al., 1990), doença pulmonar obstrutiva crônica (CHAN et al., 2023) e colite (HWANG et al., 2019). Entretanto, não existiam estudos que tivessem investigado o tempo de ação da droga em camundongos BALB/c. Desta forma, no presente trabalho iniciamos por investigar o efeito da apocinina injetada intraperitonealmente em camundongos BALB/c na capacidade de seus macrófagos de produzirem ROS e a duração do possível efeito inibidor. Após realizar o teste, optamos por injetar 40 µl/kg de apocinina de 3 em 3 dias, durante todo o período de infecção por *L. guyanensis*, para assegurar que macrófagos desses animais não seriam capazes de produzir ROS, uma vez que verificamos que a aplicação desta dose é eficaz na redução da produção de ROS nos primeiros 5 dias, sendo totalmente inibitória no 3º. dia após a injeção (Fig. 7).

Estabelecido, então, o intervalo de tempo no qual a apocinina deveria ser administrada, fomos avaliar, *in vivo*, a influência da explosão respiratória na resposta protetora observada nos camundongos BALB/c. O fato de termos observado que animais tratados com apocinina apresentaram lesão da pata infectada 2 vezes maior do que animais não tratados (Fig. 8) demonstra que ROS exerce um papel importante no controle inicial da infecção, antes da resposta imune celular adaptativa. Este resultado corrobora os dados anteriores *in vitro* do nosso grupo (Sousa-Franco, et al., 2006) e, juntos, confirmam a hipótese inicial da importância da explosão respiratória no desenvolvimento do padrão de resistência nestes camundongos.

É necessário reforçar que a influência do ROS na eliminação dos parasitas descrita neste estudo é para os camundongo BALB/c. Nem todas as linhagens de camundongos em que a *L. guyanensis* não acarreta nenhuma lesão se comportam da mesma forma. Em estudos anteriores, o nosso grupo avaliou o desenvolvimento da lesão por esta espécie em camundongos C57BL/6 *knockout* para a subunidade catalítica gp91phox da NADPH oxidase. Entretanto, assim como os animais selvagens, os animais destituídos da atividade da NADPH oxidase tampouco desenvolvem lesão (MENDES, 2011), indicando que a explosão respiratória não é tão importante para a eliminação dos parasitas nesta linhagem de camundongo. Resultados anteriores mostram que em camundongos C57BL/6 o mecanismo de eliminação da *Leishmania* é dependente da produção de NO, uma vez que camundongos *knockout* para a iNOS desenvolvem lesões quando infectados com *L. guyanensis* (MENDES, 2016).

Nossos dados também mostraram que o aumento da lesão em animais tratados com apocinina só é observado até a 6ª. semana de infecção, sendo que a partir da 7ª. semana a lesão já começa a diminuir (Fig. 7), sugerindo que, a partir desse momento, outros

mecanismos imunológicos estariam atuando na eliminação do parasito. Sugerimos aqui que o aumento temporário da lesão nestes animais é observado pela ausência de um dos mecanismos do sistema inato que o BALB/c utiliza para eliminar a *Leishmania*. Já a diminuição iniciada na 7^a. semana pode ser resultado da ativação da resposta imune adaptativa, com a produção de linfócitos Th1 (como se verá à frente), com a produção de citocinas que aumentem a capacidade leishmanicida das células hospedeiras.

Em estudos futuros, seria interessante replicar este experimento, mas com uma modificação: realizar o tratamento com apocinina quatro dias antes da infecção, ao invés de fazê-lo no mesmo dia da infecção, como feito neste trabalho. É possível que, com a metodologia aqui usada, a explosão respiratória nos macrófagos ainda não estivesse completamente inibida no momento da infecção e macrófagos tenham conseguido eliminar, pelo menos em parte, os parasitas. Assim, de fato, pode ser que essa diferença do curso de infecção entre os dois grupos experimentais ainda seja maior. Além do mais, como perspectivas futuras também seria bastante informativo adicionar a quantificação de parasitas na pata, para verificar se o aumento da lesão é conjunta com o aumento de parasitas no local. Juntos, estes dados podem ajudar a entender melhor a importância da explosão respiratória na resposta protetiva da linhagem BALB/c em infecção por *L. guyanensis*.

Para então identificar o padrão de resposta imune adaptativa de linfócitos Th produzida pelos camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis* quantificamos a produção de citocinas típicas da resposta do tipo Th1 (IFN- γ) ou Th2 (IL-4) e investigamos a frequência de células T CD4⁺ produtoras dessas citocinas nas patas e o nível de sua produção nos linfonodos poplíteos. A avaliação do perfil de linfócitos Th a partir da citocina IFN- γ e IL-4 é amplamente utilizada na literatura por elas serem moléculas clássicas liberadas pelas células Th1 e Th2, respectivamente (LOCKSLEY et al, 1987). Para esse experimento utilizamos como controles camundongos BALB/c e C57Bl/6 infectados com *L. major* para que os resultados adquiridos pudessem ser comparados com um modelo de infecção já amplamente estudado. Como na infecção com *L. guyanensis*, as frequências de células CD4⁺ na pata produtoras de IFN- γ ou de IL-4 na 4^a semana foram as mesmas observadas nas patas de camundongos C57Bl/6 infectados com *L. major*, que tipicamente fazem uma resposta do tipo Th1 (Fig. 9), já podemos concluir que a infecção de camundongos BALB/c com *L. guyanensis* induz uma resposta do tipo Th1. Essa conclusão é ainda corroborada pela quantificação nos linfonodos das mesmas citocinas na 8^a. semana (Fig. 10). Estes dados confirmam resultados preliminares feitos pelo nosso grupo de pesquisa, que demonstrou a produção de IFN- γ e a ausência da produção de IL-4 no linfonodo tanto na 4^a. quanto na 8^a. semana de infecção (MENDES, 2011).

Como descrito anteriormente, a produção de IFN- γ leva a síntese de NO em macrófagos pela regulação positiva da iNOS. Resultados anteriores do nosso laboratório já haviam demonstrado que camundongos *knockout* para o gene da iNOS desenvolvem lesões nas patas de camundongos C57BL/c infectados com *L. guyanensis* (MENDES, 2016), mostrando que a resistência desses camundongos é dependente de NO e que, portanto, *L. guyanensis* é sensível ao NO. Desta forma, podemos inferir que o que está causando a resistência de camundongos BALB/c à *L. guyanensis* é mesmo o NO produzido por macrófagos ativados por IFN- γ produzido por linfócitos Th1 induzida nesses camundongos. Como perspectiva futura, seria interessante comprovar a sensibilidade de *L. guyanensis* ao NO *in vitro* bem como tratar camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis* com inibidores da produção de NO, para verificar se, na ausência de NO, há o desenvolvimento da lesão, para confirmar nossa inferência. Isso determinará inequivocamente se, após a ativação da resposta imune adaptativa, a eliminação de *L. guyanensis* que ocorre a partir da 7ª. semana de infecção os camundongos BALB/c é mediada por NO.

Outra evidência que a *L. guyanensis* estimula a ativação do perfil Th1 em camundongos BALB/c foi apresentada por nosso grupo de pesquisa com experimentos com coinfeção com *L. guyanensis* e *L. major*. Foi mostrado que a infecção conjunta com *L. guyanensis* faz com que os animais infectados com *L. major* apresentem uma lesão bastante diminuída quando comparada com animais infectados apenas com *L. major* (MENDES, 2016). Esse experimento é importante pois demonstra que a resposta imunológica do tipo Th1 desenvolvida pela infecção com *L. guyanensis* é capaz de alterar o desenvolvimento da inflamação em um modelo de infecção amplamente descrito como do tipo Th2. Com experimentos em andamento, iremos avaliar se a infecção com *L. major* de camundongos BALB/c, que desenvolvem uma resposta Th2, sem a produção de NO, alteraria o curso de uma infecção com *L. guyanensis*, levando ao desenvolvimento de lesão. Seria importante ainda que nesses experimentos de coinfeção ocorra a quantificação de IFN- γ e IL-4 nos animais coinfectados com as duas espécies, das duas formas mencionadas, para confirmar as respectivas alterações no padrão dessas citocinas.

A quantificação de IFN- γ e IL-4 realmente sugere o perfil de resposta adaptativa que está sendo ativada no animal. Entretanto, para confirmarmos a hipótese de uma resposta exclusivamente Th1, seria importante quantificar outras citocinas como IL-12 e TNF além de citocinas típicas de uma resposta Th2 como IL-5 e IL-13. Como descrito anteriormente, a polarização entre Th1/Th2 pode não ser observada em todos os modelos de infecção, podendo ser um mecanismo muito mais complexo no qual o balanço de citocinas produzidas tenha grande influência na definição do desenvolvimento de uma resposta de resistência ou susceptibilidade.

Assim como a *L. guyanensis*, a *L. braziliensis* também apresenta uma resposta protetiva em camundongos BALB/c (NEAL & HALE, 1983; CHILDS et al., 1984; LIMA, DeKrey & TITUS, 1999). Ambas as espécies, pertencentes ao subgênero *Viannia*, são causadoras da CL na América do Sul. Além da semelhança morfológica, molecular e filogenética (PIRES et al., 2015), a *L. braziliensis* também apresenta semelhanças no padrão imunológico desenvolvido quando infectado a linhagem BALB/c. Assim como demonstrado no presente trabalho para espécie *L. guyanensis*, na infecção por *L. braziliensis* também é descrito um padrão de resposta Th1, com a produção de IFN- γ e ausência de IL-4 e IL-10 (DEKREY, LIMA & TITUS, 1998; CARVALHO et al., 2012). Também é observada uma maior influência da explosão respiratória em relação ao NO na eliminação do parasito, com trabalhos mostrando ROS como sendo um importante mecanismo leishmanicida, tanto nas fases iniciais quanto nas fases finais da inflamação (NOVAIS et al., 2014), o que parece diferir dos nossos achados, onde a explosão respiratória parece ser importante no controle da infecção apenas até a 6ª semana de infecção. Juntos, estes dados podem indicar que algum padrão molecular presente nas duas espécies estaria associado ao desenvolvimento do fenótipo de resistência em camundongos BALB/c, padrão não observado para outras espécies com menor relação filogenética. Estudos futuros são necessários para que se determine qual o padrão molecular presente nas espécies do subgênero *Viannia* que resulta no desenvolvimento de resistência de camundongos BALB/c à infecção por essas duas espécies de *Leishmania*.

Por fim, com os dados obtidos no presente trabalho as seguintes conclusões podem ser tiradas:

- Utilizando 40mg/Kg de apocinina, por via intraperitoneal, a produção de ROS em camundongos BALB/c é totalmente inibida no 3º. dia pós-tratamento;
- A infecção com *L. guyanensis* em camundongos BALB/c não leva ao desenvolvimento de lesão até pelo menos a décima semana (resultados anteriores do nosso grupo mostraram este perfil até a 20ª. semana);
- Na 8ª. semana de infecção, a o número de parasitos de *L. guyanensis* é 10.000 x menor do que o de *L. major*;
- O tratamento com apocinina leva à duplicação do tamanho de lesão na linhagem resistente à *L. guyanensis* por volta da 6ª. semana;
- Camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis* produzem IFN- γ tanto na pata quanto no linfonodo, na 4ª. e 8ª. semana pós-infecção;
- *L. guyanensis* não induz a produção de IL-4 em camundongos BALB/c na 4ª. ou 8ª semana de infecção.

Juntos, nossos resultados são importantes para complementar os conhecimentos sobre os mecanismos imunológicos responsáveis pela resposta imunológica protetora contra

L. guyanensis, espécie de grande importância epidemiológica cujo estudo é negligenciado. Validamos estudos preliminares realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa e adicionamos novos dados que contribuem para a compreensão tanto da resposta imune inata quanto adaptativa relacionado neste modelo de infecção.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, v. 383, n. 6603, p. 787-793, 1996.

ADAMS, D. O. Molecular interactions in macrophage activation. *Immunology Today*, v. 10, n. 2, p. 33-35, 1989.

AFRIN, F.; KHAN, I.; HEMEG, H. A. *Leishmania*-host interactions- an epigenetic paradigm. *Frontiers in immunology*, v. 10, p. 446075, 2019.

AFONSO L. C. C. & SCOTT P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*. 61: 2952-2959, 1993.

AGO, T.; KURIBAYASHI, F.; HIROAKI, H.; TAKEYA, R.; ITO, T.; KOHDA, D.; SUMIMOTO, H. Phosphorylation of p47 phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 8, p. 4474-4479, 2003.

AKUFFO, H.; MAASHO, K.; HOWE, R. Natural and acquired resistance to *Leishmania*: cellular activation by *Leishmania aethiopica* of mononuclear cells from unexposed individuals is through the stimulation of natural killer (NK) cells. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 94, n. 3, p. 516-521, 1993.

ALEXANDER, J.; KAYE, P. M. Immunoregulatory pathways in murine leishmaniasis: different regulatory control during *Leishmania mexicana* and *Leishmania major* infections. *Clinical and experimental immunology*, v. 61, n. 3, p. 674, 1985.

ALMEIDA, R. P. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from human with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 54, p. 178-184, 1996.

ALMEIDA, T. F. D.; PALMA, L. C.; MENDEZ, L. C.; NORONHA-DUTRA, A. A.; VERAS, P. S. T. *Leishmania amazonensis* fails to induce the release of reactive oxygen intermediates by CBA macrophages. *Parasite immunology*, v. 34, n. 10, p. 492-498, 2012.

ANDERSON, C. F.; MOSSER, D. M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *Journal of leukocyte biology*, v. 72, n. 1, p. 101-106, 2002.

ANDERSON, C. F.; MENDEZ, S.; SACKS, D. L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *The Journal of Immunology*, v. 174, n. 5, p. 2934-2941, 2005.

ARANGO-DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in immunology*, v. 5, p. 117833, 2014.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. *The American journal of medicine*, v. 109, n. 1, p. 33-44, 2000.

BARRAL, A.; PETERSEN, E. A.; SACKS, D. L.; NEVA, F. A. Late metastatic Leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 32, n. 2, p. 277-285, 1983.

BARRAL, A.; COSTA, J. M.; BITTENCOURT, A. L.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *International journal of dermatology*, v. 34, n. 7, p. 474-479, 1995.

BEAMAN, L. & BEAMAN, B. L. The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. *Annual review of microbiology*, v. 38, n. 1, p. 27-48, 1984.

BELAMBRI, S. A.; ROLAS, L.; RAAD, H.; HURTADO-NEDELEC, M.; DANG, P. M. C.; EL-BENNA, J. NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *European journal of clinical investigation*, v. 48, p. e12951, 2018.

BELKAID, Y.; MENDEZ, S.; LIRA, R.; KADAMBI, N.; MILON, G.; SACKS, D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *The Journal of Immunology*, v. 165, n. 2, p. 969-977, 2000.

BELOSEVIC, M. I. O. D. R. A. G.; FINBLOOM, D. S.; VAN DER MEIDE, P. H.; SLAYTER, M. V.; NACY, C. A. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), v. 143, n. 1, p. 266-274, 1989.

BOGDAN, C.; MOLL, H.; SOLBACH, W.; RÖLLINGHOFF, M. Tumor necrosis factor- α in combination with interferon- γ , but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *European journal of immunology*, v. 20, n. 5, p. 1131-1135, 1990.

BOGDAN, C.; GESSNER, A.; RÖLLINGHOFF, M. Cytokines in leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. *Immunobiology*, v. 189, n. 3-4, p. 356-396, 1993.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International journal for parasitology*, v. 28, n. 1, p. 121-134, 1998.

BOGDAN, C.; DONHAUSER, N.; DÖRING, R.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A.; RITTIG, M. G. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. *The Journal of experimental medicine*, v. 191, n. 12, p. 2121-2130, 2000.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *science*, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, 2004.

BUCHMULLER, Y. & MANUEL, J. Studies on the mechanisms of macrophage activation: possible involvement of oxygen metabolites in killing of *Leishmania enriettii* by activated mouse macrophages. 1981.

CARNEIRO, M. B.; ROMA, E. H.; RANSON, A. J.; DORIA, N. A.; DEBRABANT, A.; SACKS, D. L.; VIEIRA, L. Q.; PETERS, N. C. NOX2-derived reactive oxygen species control inflammation during *Leishmania amazonensis* infection by mediating infection-induced neutrophil apoptosis. *The Journal of Immunology*, v. 200, n. 1, p. 196-208, 2018.

CAVALCANTE-COSTA, V. S.; COSTA-REGINALDO, M.; QUEIROZ-OLIVEIRA, T.; OLIVEIRA, A. C.; COUTO, N. F.; DOS ANJOS, D. O.; LIMA-SANTOS, J.; ANDRADE, L. O.; HORTA, M. F.; CASTRO-GOMES, T. *Leishmania amazonensis* hijacks host cell lysosomes involved in plasma membrane repair to induce invasion in fibroblasts. *Journal of Cell Science*, v. 132, n. 6, p. jcs226183, 2019.

CHATELAIN, R.; VARKILA, K.; COFFMAN, R. L. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), v. 148, n. 4, p. 1182-1187, 1992.

CHILDS, G. E.; LIGHTNER, L. K.; MCKINNEY, L.; GROVES, M. G.; PRICE, E. E.; HENDRICKS, L. D. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis: I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 78, n. 1, p. 25-34, 1984.

COURRET, N.; FRÉHEL, C.; GOUHIER, N.; POUCHELET, M.; PRINA, E.; ROUX, P.; ANTOINE, J. C. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *Journal of cell science*, v. 115, n. 11, p. 2303-2316, 2002.

CROAN, D. G.; MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 89, n. 2, p. 149-159, 1997.

CUNHA, F. Q.; MOHCADA, S.; LIEW, F. Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- γ in murine macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 182, n. 3, p. 1155-1159, 1992.

CUPOLILLO, E.; MEDINA-ACOSTA, E.; NOYES, H.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. A Revised Classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today*, v. 16, n. 4, p. 142-144, 1 abr. 2000.

DAMATA, J. P.; MENDES, B. P.; MACIEL-LIMA, K.; MENEZES, C. A. S.; DUTRA, W. O.; SOUSA, L. P.; HORTA, M. F. Distinct macrophage fates after in vitro infection with different species of *Leishmania*: induction of apoptosis by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, but not by *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *PLoS One*, v. 10, n. 10, p. e0141196, 2015.

DA SILVA J. R., I. A.; MORATO, C. I.; QUIXABEIRA, V. B. L.; PEREIRA, L. I. D. A.; DORTA, M. L.; DE OLIVEIRA, M. A. P.; HORTA, M. F.; RIBEIRO-DIAS, F. In vitro metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* clinical field isolates, as evaluated by morphology, complement resistance, and infectivity to human macrophages. *BioMed research international*, v. 2015, 2015.

DE ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 861-870, 2003.

DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infection and immunity*, v. 66, n. 2, p. 827-829, 1998.

DE ROSSELL, R. A.; BRAY, R. S.; ALEXANDER, J. The correlation between delayed hypersensitivity, lymphocyte activation and protective immunity in experimental murine leishmaniasis. *Parasite immunology*, v. 9, n. 1, p. 105-115, 1987.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DE SOUZA, V. L.; SOUZA, J. A.; SILVA, T. M. C.; VERAS, P. S. T.; DE-FREITAS, L. A. R. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes and infection*, v. 2, n. 15, p. 1807-1815, 2000.

DE SOUZA, V. L.; VERAS, P. S.; WELBY-BORGES, M.; SILVA, T., LEITE; B. R., FERRARO, R. B.; MEYER-FERNANDES, J.; BARRAL, A.; COSTA, J. M. L.; DE FREITAS, L. A. Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, p. 23-31, 2011.

DIETZE-SCHWONBERG, K.; LOPEZ KOSTKA, S.; LORENZ, B.; REGEN, T.; WAISMAN, A.; VON STEBUT, E. IL-17A/F in *Leishmania major*-resistant C57 BL/6 mice. *Experimental Dermatology*, v. 28, n. 3, p. 321-323, 2019.

DOHERTY, T. M.; KASTELEIN, R.; MENON, S.; ANDRADE, S.; COFFMAN, R. L. Modulation of murine macrophage function by IL-13. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), v. 151, n. 12, p. 7151-7160, 1993.

DUARTE M. M. *Produção diferencial de óxido nítrico e intermediários reativos do oxigênio por neutrófilos de camundongos susceptíveis e resistentes à infecção por Leishmania major*. Belo Horizonte, 2008. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

ESPIR, T. T.; FIGUEIRA, L. D. P.; NAIFF, M. D. F.; DA COSTA, A. G.; RAMALHO-ORTIGÃO, M.; MALHEIRO, A.; & FRANCO, A. M. R. The role of inflammatory, anti-inflammatory, and regulatory cytokines in patients infected with cutaneous leishmaniasis in Amazonas State, Brazil. *Journal of immunology research*, v. 2014, n. 1, p. 481750, 2014.

FUCHS, T. A.; ABED, U.; GOOSMANN, C.; HURWITZ, R.; SCHULZE, I.; WAHN, V.; WEINRAUCH, Y.; BRINKMANN, V. ZYCHLINSKY, A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology*, v. 176, n. 2, p. 231, 2007.

GOMES, I. N.; DE CARVALHO CALABRICH, A. F.; DA SILVA TAVARES, R.; WIETZERBIN, J.; DE FREITAS, L. A. R.; VERAS, P. S. T. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes and Infection*, v. 5, n. 4, p. 251-260, 2003.

GONZALEZ-LOMBANA, C.; GIMBLET, C.; BACELLAR, M. O. A. R.; OLIVEIRA, W. W.; PASSOS, S.; CARVALHO, L. P. D.; GOLDSCHMIDT, M.; CARVALHO, E. M.; SCOTT, P. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. *PLoS pathogens*, v. 9, n. 3, p. e1003243, 2013.

GORDON, S.; UNKELESS, J. C.; COHN, Z. A. Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis: evidence for a two-stage process. *Journal of Experimental Medicine*. 140: 995-1010, 1974.

GORELIK, L.; CONSTANT, S.; FLAVELL, R. A. Mechanism of transforming growth factor β -induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *The Journal of experimental medicine*, v. 195, n. 11, p. 1499-1505, 2002.

GREEN, S. J.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α . *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), v. 145, n. 12, p. 4290-4297, 1990.

GROEMPING, Y.; LAPOUGE, K.; SMERDON, S. J.; & RITTINGER, K. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell*, v. 113, n. 3, p. 343-355, 2003.

GROEMPING, Y. & RITTINGER, K.. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochemical Journal*, v. 386, n. 3, p. 401-416, 2005.

GROUX, H.; COTTREZ, F.; ROULEAU, M.; MAUZE, S.; ANTONENKO, S.; HURST, S.; MCNEIL, T.; BIGLER, M.; RONCAROLO, M. G.; COFFMAN, R. L. A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. *The Journal of Immunology*, v. 162, n. 3, p. 1723-1729, 1999.

GUIMARÃES-COSTA, A. B.; ASCIMENTO, M. T.; FROMENT, G. S.; SOARES, R. P.; MORGADO, F. N.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SARAIVA, E. M. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 16, p. 6748-6753, 2009.

HANDMAN, E. & BULLEN, D. V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in parasitology*, v. 18, n. 8, p. 332-334, 2002.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or

progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *The Journal of experimental medicine*, v. 169, n. 1, p. 59-72, 1989.

HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *The Journal of experimental medicine*, v. 177, n. 5, p. 1505-1509, 1993.

HEYWORTH, P. G.; CURNUTTE, J. T.; NAUSEEF, W. M.; VOLPP, B. D.; PEARSON, D. W.; ROSEN, H.; CLARK, R. A. Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. *The Journal of clinical investigation*, v. 87, n. 1, p. 352-356, 1991.

HIBBS JR, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 157, n. 1, p. 87-94, 1988.

HIMMELRICH, H.; LAUNOIS, P.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOUIS, J. A. Some of the Early Events Underlying Th2. Cell Maturation and Susceptibility to *Leishmania major* Infection in BALB/c Mice. 1999.

HOLBROOK, T. W. & PALCZUK, N. C. *Leishmania* in the chick embryo: IV. Effects of embryo age and hatching, and behavior of *L. donovani* in cultures of chick fibroblasts. *Experimental parasitology*, v. 37, n. 3, p. 398-404, 1975.

HOLBROOK, T. W. & COOK, J. A. Non-specific and specific stimulation of resistance against *Leishmania donovani* in C57BL/6 mice. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, v. 13, n. 5, p. 411-417, 1983.

HONIGBERG, B. M. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. *The Journal of Protozoology*, v. 10, n. 1, p. 20-63, 1963.

HORTA, M. F.; MENDES, B. P.; ROMA, E. H.; NORONHA, F. S. M.; MACÊDO, J. P.; OLIVEIRA, L. S.; DUARTE, M. M.; VIEIRA, L. Q. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *Journal of parasitology research*, v. 2012, n. 1, p. 203818, 2012.

HORTA, M. F.; ANDRADE, L. O.; MARTINS-DUARTE, É. S.; CASTRO-GOMES, T. Cell invasion by intracellular parasites—the many roads to infection. *Journal of cell science*, v. 133, n. 4, p. jcs232488, 2020.

HSIEH, C. S.; MACATONIA, S. E.; TRIPP, C. S.; WOLF, S. F.; O'GARRA, A.; MURPHY, K. M. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, v. 260, n. 5107, p. 547-549, 1993.

HURRELL, B. P.; BEAUMANN, M.; HEYDE, S.; REGLI, I. B.; MÜLLER, A. J.; TACCHINI-COTTIER, F. Frontline Science: *Leishmania mexicana* amastigotes can replicate within neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, v. 102, n. 5, p. 1187-1198, 2017.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiological Reviews*, v. 59, n. 4, p. 533-547, 1995.

JAMES, T. Y.; KAUFF, F.; SCHOCH, C. L.; MATHENY, P. B.; HOFSTETTER, V.; COX, C. J.; CELIO, G.; GUEIDAN, C.; FRAKER, E.; MIADLIKOWSKA, J.; LUMBSCH, H. T.; RAUHUT, A.; REEB, V.; ARNOLD, A. E.; AMTOFT, A.; STAJICH, J. E.; HOSAKA, K.; SUNG, G. H.; JOHNSON, D.; ROURKE, B. O.; CROCKETT, M.; BINDER, M.; CURTIS, J. M.; SLOT, J.C.; WANG, Z.; WILSON, A. W.; SCHUBLER, A.; LONGCORE, J. E.; WHITE, M. M.; GRIFFITH, G. W.; DAVIES, D. H.; HEWITT, D.; HANSEN, K.; HAMBLETON, S.; SHOEMAKER, R. A.; KOHLEMEYEW, J.; VOLKMANN-KOLMEYER, B.; SPOTTS, R. A.; SERDANI, M.; CROUS, P. W.; HUGHES, K. W.; MATSUURA, K.; LANGER, E.; LANGER, G.; UNTEREINER, W. A.; LUCKING, R.; BUDEL, B.; GEISER, D. M.; APTROOT, A.; DIEDERICH, P. SCHMITT, I.; SCHULTZ, M.; YAHR, R.; HIBBETT, D. S. LUTZONI, F.; MCLAUGHLIN, D. J.; SPTAFORA, J. W.; VILGALYS, R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, v. 443, n. 7113, p. 818-822, 2006.

KAUSHAL, R. S.; NAIK, N.; PRAJAPATI, M.; RANE, S.; RAULJI, H.; AFU, N. F.; UPADHYAY, T. K.; SAEED, M. *Leishmania* species: a narrative review on surface proteins with structural aspects involved in host–pathogen interaction. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 102, n. 2, p. 332-356, 2023.

KAYE, P. & SCOTT, P.. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature reviews microbiology*, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and veterinary entomology*, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.

LAINSON R. & SHAW J. J. The role of animals in the epidemiology of south american leishmaniasis. In: Lumsden W. H. R., Evans D. A (eds). *Biology of the Kinetoplastida*. London Academic Press, 1979, vol. 2, chap.1, p. 1-116.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J.. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 82, p. 421-424, 1987.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*, v. 213, n. 3-4, p. 183-191, 2008.

LAUNOIS, P.; MAILLARD, I.; PINGEL, S.; SWIHART, K. G.; XENARIOS, I.; ACHA-ORBEA, H.; DIGGELMANN, H.; LOCKSLEY, R. M.; MACDONALD, H. R.; LOUIS, J. A. IL-4 rapidly produced by V β 4 V α 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity*, v. 6, n. 5, p. 541-549, 1997.

LIBLAU, R. S.; SINGER, S. M.; MCDEVITT, H. O. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunology today*, v. 16, n. 1, p. 34-38, 1995.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), v. 145, n. 12, p. 4306-4310, 1990a.

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M.; & MONCADA, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), v. 144, n. 12, p. 4794-4797, 1990b.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; SEVERN, A.; MILLOTT, S.; SCHMIDT, J.; SALTER, M.; MONCADA, S. A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *European journal of immunology*, v. 21, n. 10, p. 2489-2494, 1991.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MOSS, D.; PARKINSON, C.; ROGERS, M. V.; & MONCADA, S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *European journal of immunology*, v. 21, n. 12, p. 3009-3014, 1991.

LIEW, F. Y. & O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. *Advances in parasitology*, v. 32, p. 161-259, 1993.

LI, J.; HUNTER, C. A.; FARRELL, J. P. Anti-TGF- β treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. *The Journal of Immunology*, v. 162, n. 2, p. 974-979, 1999.

LOCKSLEY, R. M. & KLEBANOFF, S. J. Oxygen-dependent microbicidal systems of phagocytes and host defense against intracellular protozoa. *Journal of cellular biochemistry*, v. 22, n. 3, p. 173-185, 1983.

LOCKSLEY, R. M.; HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; GARDNER JR, K. D. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. In: *Annales de l'Institut Pasteur/Immunologie. Elsevier Masson*, 1987. p. 744-749.

MACATONIA, S. E.; HOSKEN, N. A.; LITTON, M.; VIEIRA, P.; HSIEH, C. S.; CULPEPPER, J. A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; MURPHY, K. M.; O'GARRA, A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), v. 154, n. 10, p. 5071-5079, 1995.

MAIOLI, T. U.; TAKANE, E.; ARANTES, R. M. E.; FIETTO, J. L. R.; AFONSO, L. C. C. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitology Research*, v. 94, p. 207-212, 2004.

MARTINEZ, F. O.; SICA, A; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. *Front biosci*, v. 13, n. 13, p. 453-461, 2008.

MATTHEWS, D. J.; EMSON, C. L.; MCKENZIE, G. J.; JOLIN, H. E.; BLACKWELL, J. M.; MCKENZIE, A. N. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *The Journal of Immunology*, v. 164, n. 3, p. 1458-1462, 2000.

MATTNER, F.; MAGRAM, J.; FERRANTE, J.; LAUNOIS, P.; PADOVA, K. D.; BEHIN, R.; GATELY, M.K.; LOUIS, J. A.; ALBER, G. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *European journal of immunology*, v. 26, n. 7, p. 1553-1559, 1996.

MCEL RATH, M. J.; KAPLAN, G. I. L. L. A.; NUSRAT, A. S. M. A.; COHN, Z. A. Cutaneous leishmaniasis. The defect in T cell influx in BALB/c mice. *The Journal of experimental medicine*, v. 165, n. 2, p. 546-559, 1987.

MCMAHON-PRATT, D. & ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunological reviews*, v. 201, n. 1, p. 206-224, 2004.

MENDES, B. P. Mecanismos de resistência de camundongos BALB/c e C57BL/6 à infecção por *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Belo Horizonte, 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

MENDES, B. P. Estudo da metaciclo gênese e purificação de promastigotas metacíclicas para a avaliação de mecanismos de resistência de camundongos à infecção por *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

MENDES, B. P.; DA SILVA, I. A.; DAMATA, J. P.; CASTRO-GOMES, T.; VIEIRA, L. Q.; RIBEIRO-DIAS, F.; & HORTA, M. F. Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) guyanensis*: A comprehensive study of the main transformation features in axenic culture and purification of metacyclic promastigotes by negative selection with Bauhinia purpurea lectin. *Parasitology*, v. 146, n. 6, p. 716-727, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. 1ª Ed. 2006.

MORRIS, L.; TROUTT, A. B.; HANDMAN, E.; KELSO, A. Changes in the precursor frequencies of IL-4 and IFN-gamma secreting CD4+ cells correlate with resolution of lesions in murine cutaneous leishmaniasis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), v. 149, n. 8, p. 2715-2721, 1992.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; & COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* (Baltimore, MD.: 1950), v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.

MOSMANN, T. R. & SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today*, v. 17, n. 3, p. 138-146, 1996.

MÜLLER, I.; PEDRAZZINI, T.; KROPF, P.; LOUIS, J.; & MILON, G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8+ T cells. *International immunology*, v. 3, n. 6, p. 587-597, 1991.

Murray, H. W. & Cartelli, D. M. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and-independent leishmanicidal activity. *The Journal of clinical investigation*, v. 72, n. 1, p. 32-44, 1983.

MUSKUS, C. E. & VILLA, M. M. Metaciclologénesis: un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. *Biomedica*, v. 22, n. 2, p. 167-177, 2002.

NABORS, G. S.; NOLAN, T.; CROOP, W.; LI, J.; FARRELL, J. P. The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/cx C57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. *Parasite immunology*, v. 17, n. 11, p. 569-579, 1995.

NAKAI, K. & TSURUTA, D. What are reactive oxygen species, free radicals, and oxidative stress in skin diseases?. *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 19, p. 10799, 2021.

NASHED, B. F.; MAEKAWA, Y.; TAKASHIMA, M.; ZHANG, T.; ISHII, K.; DAINICHI, T.; ISHIKAWA, H.; SAKAI, T.; HISAEDA, H.; HIMENO, K. Different cytokines are required for induction and maintenance of the Th2 type response in DBA/2 mice resistant to infection with *Leishmania major*. *Microbes and infection*, v. 2, n. 12, p. 1435-1443, 2000.

NASSERI, M. & MODABBER, F. Z. Generalized infection and lack of delayed hypersensitivity in BALB/c mice infected with *Leishmania tropica major*. *Infection and immunity*, v. 26, n. 2, p. 611-614, 1979.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB journal*, v. 6, n. 12, p. 3051-3064, 1992.

NEAL, R. A. & HALE, C. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*, v. 87, n. 1, p. 7-13, 1983.

NEVES, D. P.; DE MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; ALMEIDA-VITOR, R. W.; *Parasitologia Humana*. 13a edição. *Rio de Janeiro: Livraria Atheneu*, 2016.

NOLAN, T. J. & HERMAN, R. Effects of long-term in vitro cultivation on *Leishmania donovani* promastigotes. *The Journal of protozoology*, v. 32, n. 1, p. 70-75, 1985.

NORSWORTHY, N. B.; SUN, J.; ELNAIEM, D.; LANZARO, G.; SOONG, L. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infection and immunity*, v. 72, n. 3, p. 1240-1247, 2004.

O'GARRA, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, v. 8, n. 3, p. 275-283, 1998.

O'GARRA, A.; STEINMAN, L.; GIJBELS, K. CD4+ T-cell subsets in autoimmunity. *Current opinion in immunology*, v. 9, n. 6, p. 872-883, 1997.

OLIVEIRA, L. S.; DE QUEIROZ, N. M.; VELOSO, L. V.; MOREIRA, T. G.; OLIVEIRA, F. S.; CARNEIRO, M. B.; FARIA, A. M.; VIEIRA, L.Q; HORTA, M. F. A defective TLR4 signaling for IFN- β expression is responsible for the innately lower ability of BALB/c macrophages to produce NO in response to LPS as compared to C57BL/6. *Plos one*, v. 9, n. 6, p. e98913, 2014.

OLIVIER, M.; MINGUEZ-MENENDEZ, A.; FERNANDEZ-PRADA, C. *Leishmania viannia guyanensis*. *Trends in Parasitology*, v. 35, n. 12, p. 1018-1019, 2019.

OMONDI, Z. N.; ARSERIM, S. K.; TÖZ, S.; ÖZBEL, Y. Host-Parasite Interactions: Regulation of *Leishmania* Infection in Sand Fly. *Acta Parasitologica*, v. 67, n. 2, p. 606-618, 2022.

OVEZMUKHAMMEDOV, A. & SAF'IANOVA, V. M. Taxonomic problems of the *Leishmania* of reptiles. *Parazitologija*, v. 23, n. 4, p. 334-343, 1989.

PACHECO, G. A. B.; KAMBOH, A. A. (Ed.). *Parasitology and Microbiology Research*. BoD-Books on Demand, 2020.

PAHO, Leishmaniose. Endereço eletrônico (<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>). Acesso em 25 de agosto de 2024

PARK, A. Y.; HONDOWICZ, B. D.; SCOTT, P. IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *The Journal of Immunology*, v. 165, n. 2, p. 896-902, 2000.

PEACOCK, C. S.; SEEGER, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; RUIZ, J. C.; QUAIL, M. A.; PETER, N. ADLEM, E.; ASLETT, M.; KERHORNOU, A.; IVENS, A.; FRASER, A.; RAJANDREAM, M. A.; CARVER, T.; NORBERTCZAK, H.; CHILINGWORTH, T.; HANCE, Z.; JAGELS, K.; MOULE, S.; ORMOND, D.; RUTTER, S.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; RABBINOWITSCH, E.; ARROWSMITH, C.; WHITE, B.; THURSTON, S.; BRINGAUD, F.; BALDAUF, S. L.; FAULCONBRIDGE, A.; JEFFARES, D.; DEPLEGGE, D. P.; OYOLA, S. O.; HILLEY J. D.; BRITO, L. O.; TOSI, L. R. O.; BARREL, B.; CRUZ, A. K.; MOTTRAM, J. C.; SMITH, D. F.; BERRIMAN, M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature genetics*, v. 39, n. 7, p. 839-847, 2007.

PEARSON R. D. & SOUSA A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*. 22: 1-13, 1996.

PÉREZ-CABEZAS, B.; CECÍLIO, P.; GASPAS, T. B.; GÄRTNER, F.; VASCONCELLOS, R.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Understanding resistance vs. susceptibility in visceral leishmaniasis using mouse models of *Leishmania infantum* infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 9, p. 30, 2019.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.

PIMENTA P. F. P.; TURCO S. J.; MCCONVILLE M. J.; LAWYER P. G.; PERKINS P. V.; SACKS D. L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*. 256: 1812-1815, 1992.

PISCOPO T. V. & MALLIA A. C. Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal*. 82: 649-657, 2006.

POWRIE, F. & COFFMAN, R. L. Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention. *Trends in pharmacological sciences*, v. 14, n. 5, p. 164-168, 1993.

PRESTON, P. M.; CARTER, R. L.; LEUCHARS, E.; DAVIES, A. J. S.; DUMONDE, D. C. Experimental cutaneous leishmaniasis. III. Effects of thymectomy on the course of infection of CBA mice with *Leishmania tropica*. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 10, n. 2, p. 337, 1972.

PRESTON, P. M. & DUMONDE, D. C. Immunology of clinical and experimental leishmaniasis. In *Immunology of Parasitic Infections* (ed. by S. Cohen and E. Sadun), pp. 167-202. Blackwell, Oxford, 1976.

PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 06 out. 2024

RAPHAEL, I.; NALAWADE, S.; EAGAR, T. N.; FORSTHUBER, T. G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, v. 74, n. 1, p. 5-17, 2015.

REINER, S. L.; ZHENG, S.; WANG, Z. E.; STOWRING, L.; LOCKSLEY, R. M. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *The journal of experimental medicine*, v. 179, n. 2, p. 447-456, 1994.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual review of immunology*, v. 13, n. 1, p. 151-177, 1995.

RISSOAN, M. C.; SOUMELIS, V.; KADOWAKI, N.; GROUARD, G.; BRIERE, F.; MALEFYT, R. D. W.; & LIU, Y. J. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*, v. 283, n. 5405, p. 1183-1186, 1999.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitology today*, v. 16, n. 7, p. 292-297, 2000.

ROOS, D. & WINTERBOURN, C. C. Lethal weapons. *Science*, v. 296, n. 5568, p. 669-671, 2002

SACKS, D. L. & MELBY, P. C. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. *Current protocols in immunology*, v. 28, n. 1, p. 19.2. 1-19.2. 20, 1998.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental parasitology*, v. 69, n. 1, p. 100-103, 1989.

SACKS, D. & NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature reviews immunology*, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.

SAHA, A.; ROY, S.; UKIL, A. Cytokines and signaling networks regulating disease outcomes in leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v. 90, n. 8, p. e00248-22, 2022.

SANDOVAL PACHECO, C. M.; ARAUJO FLORES, G. V.; GONZALEZ, K.; DE CASTRO GOMES; C. M., PASSERO; L. F., TOMOKANE; T. Y., SOSA-OCHOA, W.; ZUNIGA,

C.; CALZADA, J.; SALDANA, A.; CORBETT, C. E. P.; SILVEIRA, F. T.; LAURENTI, M. D. Macrophage polarization in the skin lesion caused by neotropical species of *Leishmania* sp. *Journal of Immunology Research*, v. 2021, n. 1, p. 5596876, 2021.

SANTOS, J. L.; ANDRADE, A. A.; DIAS, A. A.; BONJARDIM, C. A.; REIS, L. F.; TEIXEIRA, S. M.; HORTA, M. F. Differential sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages to the stimuli of IFN- γ /LPS for the production of NO: Correlation with iNOS mRNA and protein expression. *Journal of interferon & cytokine research*, v. 26, n. 9, p. 682-688, 2006.

SASSE, C.; BARINBERG, D.; OBERMEYER, S.; DEBUS, A.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. Eosinophils, but not type 2 innate lymphoid cells, are the predominant source of interleukin 4 during the innate phase of *Leishmania major* infection. *Pathogens*, v. 11, n. 8, p. 828, 2022.

SCHARTON-KERSTEN, T.; AFONSO, L. C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), v. 154, n. 10, p. 5320-5330, 1995.

SCHWARTZMAN, J. D. & PEARSON, R. D. The interaction of *Leishmania donovani* promastigotes and human fibroblasts in vitro. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 34, n. 5, p. 850-855, 1985.

SCOTT, P.; SACKS, D.; SHER, A. Resistance to macrophage-mediated killing as a factor influencing the pathogenesis of chronic cutaneous leishmaniasis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), v. 131, n. 2, p. 966-971, 1983.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R. L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *The Journal of experimental medicine*, v. 168, n. 5, p. 1675-1684, 1988.

SCOTT, B.; LIBLAU, R.; DEGERMANN, S.; MARCONI, L. A.; OGATA, L.; CATON, A. J.; MCDEVITT, H. O.; LO, D. A role for non-MHC genetic polymorphism in susceptibility to spontaneous autoimmunity. *Immunity*, v. 1, n. 1, p. 73-82, 1994.

SCOTT, P.; EATON, A.; GAUSE, W. C.; DI ZHOU, X.; HONDOWICZ, B. Early IL-4 Production Does Not Predict Susceptibility to *Leishmania major*. *Experimental parasitology*, v. 84, n. 2, p. 178-187, 1996.

SCOTT, P. & FARRELL, J. P. Experimental cutaneous leishmaniasis: induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. *Immunology of Intracellular Parasitism*, v. 70, p. 60-80, 1998.

SEDER, R. A.; GAZZINELLI, R.; SHER, A.; PAUL, W. E. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 21, p. 10188-10192, 1993.

SERAFIM, T. D.; COUTINHO-ABREU, I. V.; OLIVEIRA, F.; MENESES, C.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nature microbiology*, v. 3, n. 5, p. 548-555, 2018.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A.; MOHAMMADIAN, S.; VAZINI, H.; TAGHADOSI, M.; ESMAEILI, S. A.; MARDANI, F.; SEIFI, B.; MOHAMMADI, A.; SAHEBKAR, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of cellular physiology*, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 2018.

SHAW, Jeffrey Jon et al. Ecology and epidemiology: New World. **The leishmaniasis in biology and medicine. Volume I. Biology and epidemiology**, p. 291-363, 1987.

SHER, A.; COFFMAN, R. L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. **Annual review of immunology**, v. 10, n. 1, p. 385-409, 1992.

SILVA-MOREIRA, A. L.; RIOS-BARROS, L. V.; DE MENEZES, J. P. B.; HORTA, M. F.; CASTRO-GOMES, T. *Leishmania* and Leishmaniasis: new insights into the biology of the parasites and its impact on the comprehension of a puzzling disease. Submetido a Infection and Immunity, 2024.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 239-251, 2004.

SOARES, R. P.; CARDOSO, T. L.; BARRON, T.; ARAÚJO, M. S.; PIMENTA, P. F.; TURCO, S. J. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *International journal for parasitology*, v. 35, n. 3, p. 245-253, 2005.

SYPEK, J. P.; CHUNG, C. L.; MAYOR, S. E.; SUBRAMANYAM, J. M.; GOLDMAN, S. J.; SIEBURTH, D. S.; WOLF, S. F.; SCHAUB, R. G. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *The Journal of experimental medicine*, v. 177, n. 6, p. 1797-1802, 1993.

SWIHART, K.; FRUTH, U.; MESSMER, N.; HUG, K.; BEHIN, R.; HUANG, S.; GIUDICE, G. D.; AGUET, M.; LOUIS, J. A. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon γ receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4⁺ T cell response. **The Journal of experimental medicine**, v. 181, n. 3, p. 961-971, 1995.

SZABO, S. J.; JACOBSON, N. G.; DIGHE, A. S.; GUBLER, U.; MURPHY, K. M. Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. *Immunity*, v. 2, n. 6, p. 665-675, 1995.

SZABO, S. J.; DIGHE, A. S.; GUBLER, U.; MURPHY, K. M. Regulation of the interleukin (IL)-12R β 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *The Journal of experimental medicine*, v. 185, n. 5, p. 817-824, 1997.

TEIXEIRA, C. R.; TEIXEIRA, M. J.; GOMES, R. B.; SANTOS, C. S.; ANDRADE, B. B.; RAFFAELE-NETTO, I.; SILVA, J. S.; GUGLIELMOTTI, A.; MIRANDA, J. C.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *The Journal of Immunology*, v. 175, n. 12, p. 8346-8353, 2005.

THEODOS C. M.; RIBEIRO J. M.; TITUS R. G. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infection and Immunity*. 59: 1592-1598, 1991.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; BORTOLETI, B. T. D. S.; ASSOLINI, J. P.; GONÇALVES, M. D.; CARLOTO, A. C. M.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; COSTA, I. C.; BORDIGNON, J.; PAVANELLI, W. R. Macrophage polarization in leishmaniasis: broadening horizons. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 418569, 2018.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual review of immunology*, v. 13, n. 1, p. 251-276, 1995.

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, 2004.

VIGNAIS, P. V. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, v. 59, p. 1428-1459, 2002.

WANG, Z. E.; REINER, S. L.; ZHENG, S.; DALTON, D. K.; LOCKSLEY, R. M. CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. *The Journal of experimental medicine*, v. 179, n. 4, p. 1367-1371, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, v. 95, n. 22, p. 265–289, 2022.