



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA

YURI TAYRO CARNEIRO NÓBREGA PAIVA

**IMUNOMODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR INFECÇÃO
IN VITRO COM CEPA DE *Leishmania braziliensis* RESISTENTE AO TRATAMENTO.**

FORTALEZA

2023

YURI TAYRO CARNEIRO NÓBREGA PAIVA

IMUNOMODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR INFECÇÃO *IN VITRO* COM CEPA DE *Leishmania braziliensis* RESISTENTE AO TRATAMENTO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de Concentração: Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P171i Paiva, Yuri Tayro Carneiro Nóbrega.
Imunomodulação da resposta inflamatória induzida in vitro com cepa de *Leishmania braziliensis* resistente ao tratamento / Yuri Tayro Carneiro Nóbrega Paiva. – 2023.
61 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Maria Jania Teixeira.
1. *Leishmania braziliensis*. 2. Leishmaniose tegumentar. 3. Resistência ao antimônio. I. Título.
CDD 571.9
-

A Deus.

A minha mãe Zuleide, pela sua delicadeza e apoio na dificuldade.

Ao meu pai Tarcísio (*in memoriam*) que, por seu amor a ciência, me incentivou a busca pelo conhecimento e sapiência. Minha eterna gratidão.

A minha irmã Suyanne, pelo companheirismo e atenção.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua imensa bondade e graça, por me dar forças para vencer as dificuldades e colocar pessoas maravilhosas na minha vida que me ajudaram a proporcionar mais essa conquista.

À Prof. Dra. Maria Jania Teixeira, pela inestimável orientação científica que me foi dada, por acreditar no meu potencial e disponibilizar o laboratório, pela sua amizade, paciência e incentivo no período mais difícil da minha vida. Representa uma grande inspiração para mim como pesquisadora, farmacêutica e por seu amor a ciência.

Aos meus amigos do Laboratório de Parasitologia, em especial, Naya Castro, Charles Barbosa, Miguel Gomes e Renato Ribeiro por toda a contribuição em momentos difíceis e disponibilidade nos experimentos; Dorotheia Teixeira, pelas dicas e auxílio na seleção do mestrado; Fabíola Fernandes, por todo o auxílio nas atividades de laboratório; e aos demais amigos Allan Rodrigo, Josias Martins, Ticiane Abreu, Raquel Pinheiro, Rafael Fonseca, Aline Sombra por terem me acolhido, além de toda a ajuda, convivência e conhecimento transmitido.

As professoras Flavia Almeida Santos e Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal pela parceria com nosso laboratório e o apoio oferecido em minha pesquisa.

Ao amigo Paulo Iury, pela ajuda prestada em momentos delicados e a sua disponibilidade durante os experimentos e explicações sobre o protocolo. Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos.

Aos meus amigos, em especial, João Victor por ter me apresentado o Laboratório de Parasitologia e a minha orientadora.

Aos meus amigos e colegas de profissão do Instituto Doutor José Frota - IJF, Oselita Maciel, Alexandra Vieira e Márcio Batista, pela compreensão, parceria e apoio nas atividades do mestrado.

Aos servidores e funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal, em especial à Valéria Cordeiro, pela prontidão e eficácia em lidar com todas as questões administrativas e sua disponibilidade em ajudar os alunos.

Aos professores do mestrado, por toda a sabedoria compartilhada.

Aos meus colegas de mestrado, por todo o apoio e amizade nos momentos mais difíceis e pela coragem de enfrentarmos juntos as adversidades geradas pela pandemia de COVID-19.

A minha família, especialmente aos meus pais e irmã por todo o apoio e incentivo que

me deram durante a realização do mestrado. Sem a ajuda deles, não teria sido possível superar os desafios e obstáculos que enfrentei. Sua presença constante e palavras de encorajamento foram fundamentais para me manter motivado e concentrado em meu trabalho. Sou extremamente grato pela presença de vocês em minha vida.

À CAPES, pelo suporte econômico fornecido por meio da bolsa durante todo o desenvolvimento deste estudo.

“O sonho é que leva a gente para frente. Se a gente for seguir a razão, fica aquietado, acomodado.”

(Ariano Suassuna)

RESUMO

A *Leishmania braziliensis* é o principal agente etiológico da leishmaniose tegumentar (LT) no Brasil. Os antimonialis são os fármacos de primeira escolha para o tratamento da LT, entretanto, os emergentes relatos de resistência a esses fármacos têm comprometido o tratamento e o controle da doença. Estudos sobre a resposta inflamatória inicial induzida por cepas com perfil de resistência são importantes para entender como estes parasitos evadem da resposta protetora do hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi comparar a resposta imunológica de macrófagos infectados por cepas de *Leishmania braziliensis* resistente (LbR) e suscetível (LbS) ao antimonialis de meglumina *in vitro*. Para tanto, macrófagos J774 (MJ774) foram infectados com cepas LbR ou LbS e após 24, 48 e 72h foram avaliados: carga parasitária, produção de citocinas (fator de necrose tumoral [TNF- α], interleucina 12 [IL-12], interleucina 4 [IL-4] e interleucina 10 [IL-10]), bem como mediadores do estresse oxidativo (óxido nítrico [NO], malondialdeído [MDA], catalase [CAT], superóxido dismutase [SOD] e glutathiona reduzida [GSH]). Os resultados mostraram que MJ774 infectados por LbR apresentaram aumento significativo na carga parasitária com 48 e 72h, quando comparados com MJ774 infectados por LbS, que por sua vez, apresentaram significativa queda na carga parasitária em relação aos tempos de infecção analisados. Com 24h de infecção, LbR induziu um ambiente com níveis maiores de TNF- α , IL-12, IL-4 e catalase, do que o induzido por LbS, que mostrou níveis maiores apenas de IL-10. Com 48h de estímulo, ocorreu também uma inversão no ambiente com LbR, com níveis mais baixos de TNF- α e IL-12 e níveis mais altos de IL-4, IL-10 e catalase, diferente do ambiente com LbS, que mostrou perfil mais inflamatório, com níveis mais altos de IL-12, TNF- α , NO e mais baixos de IL-4, IL-10 e catalase. Este perfil de resposta continuou sendo observado com 72h para ambas as cepas, com exceção dos níveis de SOD e NO que permaneceram com níveis mais altos no ambiente com a cepa LbS. Em suma, os dados deste trabalho sugerem que a cepa de *L. braziliensis* resistente induz precocemente um ambiente com perfil mais inflamatório do que a cepa suscetível, e mais tarde consegue reverter para um ambiente imunologicamente mais permissivo à sua sobrevivência, mantendo carga parasitária maior do que a da cepa suscetível e suportando melhor a pressão do ambiente microbicida, o que pode dificultar o tratamento, levar à persistência da doença por mais tempo e dificultando.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*. Leishmaniose tegumentar. Resistência ao antimônio.

ABSTRACT

Leishmania braziliensis is the main etiological agent of cutaneous leishmaniasis (CL) in Brazil. Antimonials are the first-choice drugs for CL treatment; however, emerging reports of drug resistance have compromised the treatment and disease control. Studies on the initial inflammatory response induced by strains with a resistant profile are important to understand how these parasites evade the host's protective response. The objective of this study was to compare the immune response of macrophages infected with strains of *Leishmania braziliensis* resistant (LbR) and susceptible (LbS) to meglumine antimoniate *in vitro*. Macrophages J774 (MJ774) were infected with LbR or LbS strains, and after 24, 48, and 72h, parasitic load, cytokine production (tumor necrosis factor [TNF- α], interleukin 12 [IL-12], interleukin 4 [IL-4] and interleukin 10 [IL-10]), as well as mediators of oxidative stress (nitric oxide [NO], malondialdehyde [MDA], catalase [CAT], superoxide dismutase [SOD] and reduced glutathione [GSH]) were evaluated. The results showed that MJ774 infected with LbR presented a significant increase in parasitic load at 48 and 72h compared to MJ774 infected with LbS, which, in turn, showed a significant decrease in parasitic load over time. At 24h post-infection, LbR induced an environment with higher levels of TNF- α , IL-12, IL-4, and CAT than that induced by LbS, which showed higher levels of only IL-10. At 48h post-infection, there was a shift of the environment with LbR infection, with lower levels of TNF- α and IL-12 and higher levels of IL-4, IL-10, and CAT. This is different from the environment with LbS, that showed a more inflammatory profile, with higher levels of IL-12, TNF- α , NO, and lower levels of IL-4, IL-10, and CAT. These inflammatory were environment still observed at 72h for both strains, except for SOD and NO levels which remained higher in the environment with LbS strain infection. In summary, the data from this study suggest that the resistant strain of *L. braziliensis* early on induces a more inflammatory environment than the susceptible strain. Later, it can transition to an immunologically permissive environment for its survival, maintaining a higher parasite load compared to the susceptible strain, and better withstanding the pressure of the microbicidal environment. This could hinder treatment efficacy, leading to prolonged disease persistence.

Keywords: *Leishmania braziliensis*. Cutaneous leishmaniasis. Inflammatory reaction. Antimony resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição da Leishmaniose tegumentar no mundo	16
Figura 2 – Distribuição do número de casos de LTA por Superintendência Regional, Ceará, 2019 e 2020.	17
Figura 3 – Formas da <i>Leishmania spp.</i> promastigota (A) e amastigota (B).	19
Figura 4 – Ciclo de vida do protozoário <i>Leishmania spp.</i>	20
Figura 5 – Células dendríticas e macrófagos regulando o resultado da infecção por <i>Leishmania spp.</i>	27
Figura 6 – Carga parasitária em macrófagos J774 infectados.	36
Figura 7 – Marcadores antioxidantes	38
Figura 8 – Marcadores de oxidação	39
Figura 9 – Quantificação da produção de TNF- α e IL-12 por macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> resistente e suscetível, após 24, 48 e 72 horas dos estímulos.	40
Figura 10 – Quantificação da produção de IL-4 e IL-10 por macrófagos infectados com <i>L.</i> <i>braziliensis</i> resistente e suscetível, após 24, 48 e 72 horas dos estímulos. . .	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
LC	Leishmaniose cutânea
LV	Leishmaniose visceral
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose disseminada
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LM	Leishmaniose mucosa
APC	células apresentadoras de antígenos
DC	células dendríticas
NET	" <i>neutrophil extracellular traps</i> " – armadilha extracelular de neutrófilos
NK	" <i>natural killer</i> " - exterminadoras naturais
SBF	Soro fetal bovino
PBS	Tampão fosfato-salino
BSA	Albumina sérica bovina
NBT	Azul de nitrotetrazólio
SOD	Super óxido dismutase
GSH	Glutathiona reduzida
MDA	Malondialdeído
LbR	<i>Leishmania braziliensis</i> resistente
LbS	<i>Leishmania braziliensis</i> suscetível

LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Epidemiologia	15
1.2	Leishmaniose tegumentar americana	17
1.3	Ciclo biológico e transmissão	18
1.4	Resposta imunológica na leishmaniose tegumentar americana	20
1.5	Tratamento das leishmanioses	27
2	JUSTIFICATIVA	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Parasitas	31
4.2	Cultura e infecção de macrófagos J774	31
4.3	Determinação da taxa de infecção de macrófagos	32
4.4	Dosagem de citocinas	32
4.5	Quantificação de Proteínas Totais	33
4.6	Ensaio enzimático da catalase	33
4.7	Dosagem de óxido nítrico (NO)	33
4.8	Ensaio enzimático da superóxido dismutase (SOD)	34
4.9	Determinação dos níveis de glutathiona reduzida(GSH)	34
4.10	Determinação dos níveis de malondialdeído	34
4.11	Análise estatística	35
5	RESULTADOS	36
5.1	Avaliação da carga parasitária em macrófagos J774 após infecção por <i>Leishmania braziliensis</i> resistente e suscetível a antimônio.	36
5.2	Produção de mediadores do estresse oxidativo por macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> resistente e suscetível	37
5.3	Quantificação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> resistente e suscetível	40

5.4	Quantificação de citocinas anti-inflamatórias por macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> resistente e suscetível	41
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

Leishmaniose representa um complexo de doenças do tipo antropozoonótica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a leishmaniose como uma Doença Tropical Negligenciada, sendo considerada endêmica em vários países, onde são relatados mais de 1 milhão de novos casos a cada ano (SCORZA *et al.*, 2017; WHO, 2021).

Essa doença pode se manifestar através das duas formas clínicas principais: a Leishmaniose cutânea (LC), conhecida também como tegumentar nas Américas, (LTA) que afeta pele e mucosas e a Leishmaniose visceral (LV) ou calazar, que afeta órgãos internos. A LC é capaz de acometer a pele e os linfonodos, causando úlceras, enquanto a LV pode comprometer fígado, baço e medula óssea, levando a morte indivíduos não tratados (CUTOLO *et al.*, 2021; WHO, 2021).

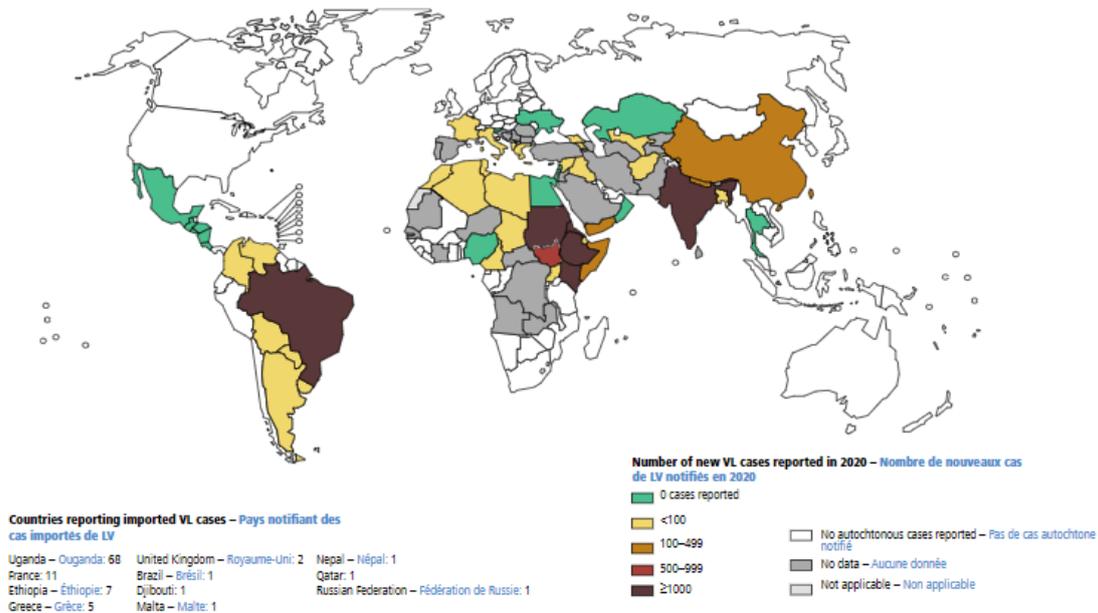
A leishmaniose representa um problema de saúde pública em quatro regiões eco-epidemiológicas do mundo: Américas, Leste e Norte da África, Oeste e Sudeste Asiático. A doença pode ocorrer de diversas maneiras, dependendo do lugar e do tempo, principalmente, quando se considera a invasão dos seres humanos no ciclo silvestre do parasita. Em outros casos, a transmissão da doença ocorre de forma antroponótica, onde o ser humano é a única fonte de infecção para o vetor, como é comum na Índia e durante a propagação da epidemia na África Oriental (SUNDAR *et al.*, 2012). No Novo e Velho Mundo, a transmissão geralmente acontece de forma doméstica e peridoméstica (RUIZ-POSTIGO *et al.*, 2021).

Fatores considerados essenciais para a manutenção do controle epidemiológico da leishmaniose são ações voltadas ao saneamento básico, dentre estas, podemos citar o abastecimento de água, esgotamento sanitário, limpeza pública, drenagem pluvial e o controle de vetores (RIBEIRO *et al.*, 2017). Assim, a leishmaniose afeta principalmente os países mais pobres, sobretudo regiões na África, Ásia e América Latina, cuja população está mais associada a problemas de cunho social, como condições precárias de habitação com presença de animais reservatórios, desnutrição e falta de acesso a saneamento básico e serviços de saúde (SANTOS *et al.*, 2000; TEODORO *et al.*, 2007). As mudanças climáticas ocasionadas pelo processo de aquecimento global associado a fatores como falta de saneamento básico contribuem para o aumento da distribuição geográfica e a sazonalidade da leishmaniose (MENDES *et al.*, 2016).

Segundo a OMS (WHO, 2021), 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas,

bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central (Figura 1). No continente americano, a Leishmaniose tegumentar americana (LTA) tem distribuição do norte da Argentina até o sul dos EUA.

Figura 1 – Distribuição da Leishmaniose tegumentar no mundo



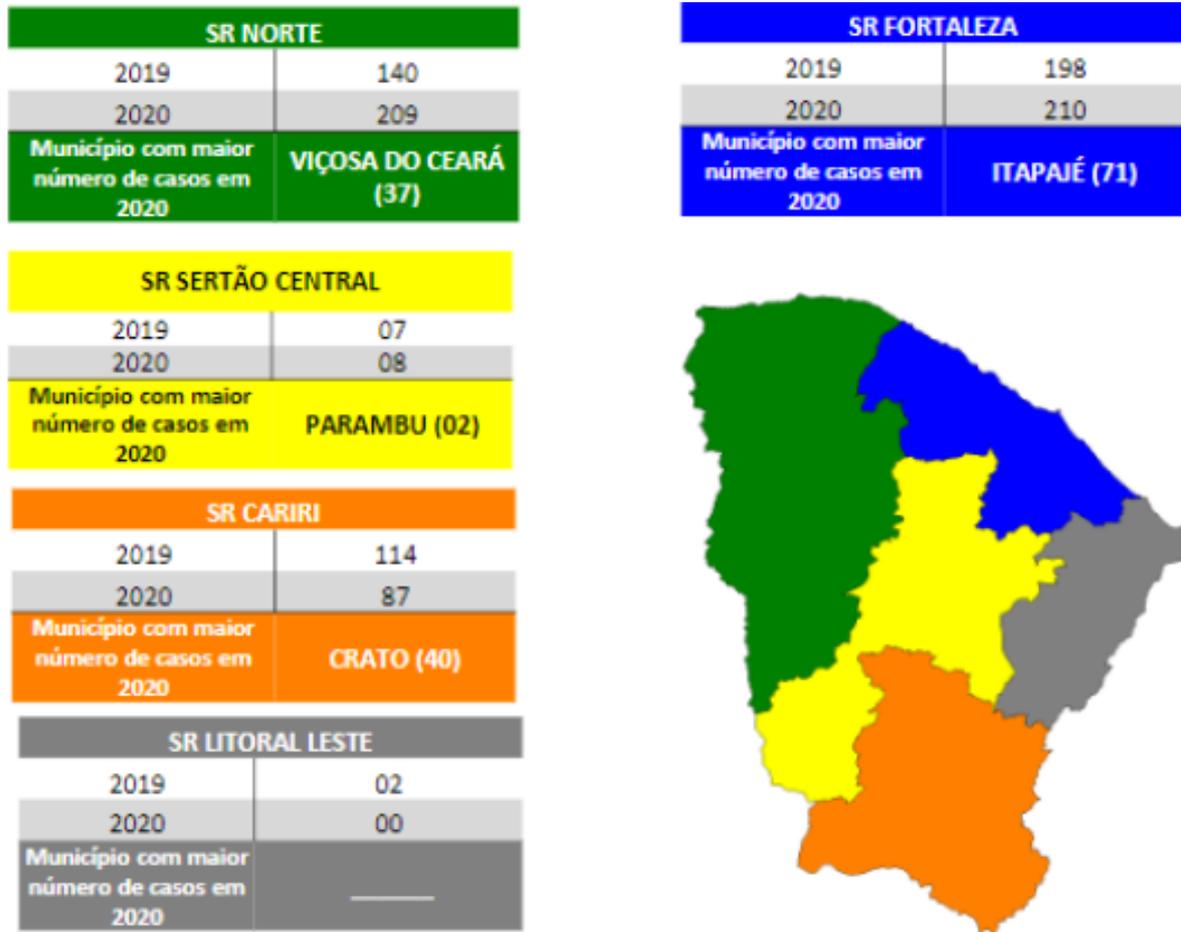
Fonte: WHO (2021).

No território brasileiro, a LTA sofreu um processo de expansão desde a década de 1980, quando sua predominância ocorria na região nordeste do país, gerando, assim, um processo de urbanização do vetor (PRADELLA *et al.*, 2021). As ocorrências de LTA continuam crescentes, sendo registradas, nos últimos 5 anos, em média, 21.000 casos/ano, com coeficiente de incidência de 8,6 casos/100.000 habitantes. Entre as regiões brasileiras, a região Norte apresentou, no último ano, o maior coeficiente, cerca de 46,4 casos/100.000 habitantes, seguida das regiões Centro-Oeste, com 17,2 casos/10.000 habitantes, e Nordeste, com 8 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2021).

Na região Nordeste, a LTA ocorre com maior frequência no estado do Ceará. De janeiro de 2007 a dezembro de 2020, foram relatados 9224 casos, resultando numa média de 659 casos por ano. Em uma análise temporal realizada pela Superintendência Regional (SR), houve um aumento de casos observados de LTA na SR Norte e SR Fortaleza em 2020 quando comparado ao ano de 2019, com exceção da SR Cariri, onde ocorreu uma redução de 23,68%. Não foram registrados casos na SR Litoral Leste no ano de 2020 (Figura 2).

No período compreendido entre 2007 e 2020, ocorreram 17 mortes relacionadas

Figura 2 – Distribuição do número de casos de LTA por Superintendência Regional, Ceará, 2019 e 2020.



Fonte: Ceará (2021).

à Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no estado do Ceará, de acordo com registros do Sinan. Observou-se uma taxa de letalidade relativamente baixa, correspondente somente a 0,18%. É importante ressaltar que não foram registrados óbitos em 2015 e 2018. O ano de 2013 apresentou o maior número de mortes, com três casos, e a taxa de letalidade mais elevada, correspondente a 0,61% (CEARÁ, 2021).

1.2 Leishmaniose tegumentar americana

A LTA é considerada uma doença infecciosa, mas não contagiosa e geralmente é indolor e de caráter crônico (SANTANA *et al.*, 2021). A doença é causada por seu agente etiológico, o protozoário intracelular digenético pertencente à família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*, que reúne mais de 30 espécies, sendo 11 delas de interesse clínico (CECILIO *et al.*, 2014). No território brasileiro, existem várias espécies de leishmânias causadores da LTA. Entretanto, entre as mais prevalentes, podem ser citadas: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*,

L. (Viannia) guyanensis e *L.(V.) braziliensis*. Dentre estas três espécies citadas, a *L. braziliensis* é a predominante no Brasil, tanto em número de casos quanto em distribuição (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014).

A LTA apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, denominadas Leishmaniose cutânea localizada (LCL), Leishmaniose disseminada (LD), Leishmaniose cutânea difusa (LCD) e Leishmaniose mucocutânea (LMC) (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2017). Entre estas manifestações, a *L. braziliensis* pode causar LCL, LD e LMC.

A Leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma mais prevalente do espectro, com aparecimento de lesões ulcerativas únicas, isoladas no local da picada do inseto vetor, apresentando fundo necrótico e bordas elevadas, podendo ou não terem cura espontânea (GOTO; LINDOSO, 2010). A Leishmaniose disseminada (LD) é uma forma rara e emergente, caracterizada por expressar múltiplas lesões pleomórficas, em duas ou mais regiões distintas do corpo e que afeta indivíduos imunossuprimidos, possibilitando o aparecimento de infecções bacterianas secundárias (SOUSA *et al.*, 2016; SCORZA *et al.*, 2017).

A Leishmaniose cutânea difusa (LCD) é a forma incomum e grave, podendo ser identificada pela ocorrência de múltiplas lesões satélites que tendem a se fundir formando placas que cobrem grandes áreas da pele. As lesões apresentam predominantemente características nodulares ou papulares, contendo uma quantidade significativa de amastigotas, mas não ulceram (GOTO; LINDOSO, 2010; SCORZA *et al.*, 2017). A Leishmaniose mucosa (LM) é caracterizada por uma resposta inflamatória exacerbada na região da orofaringe, onde o indivíduo apresenta lesão extensiva interna e externa, podendo perder estruturas estéticas e funcionais, como nariz e lábios, gerando úlceras altamente destrutivas (BACELLAR *et al.*, 2002; SCORZA *et al.*, 2017).

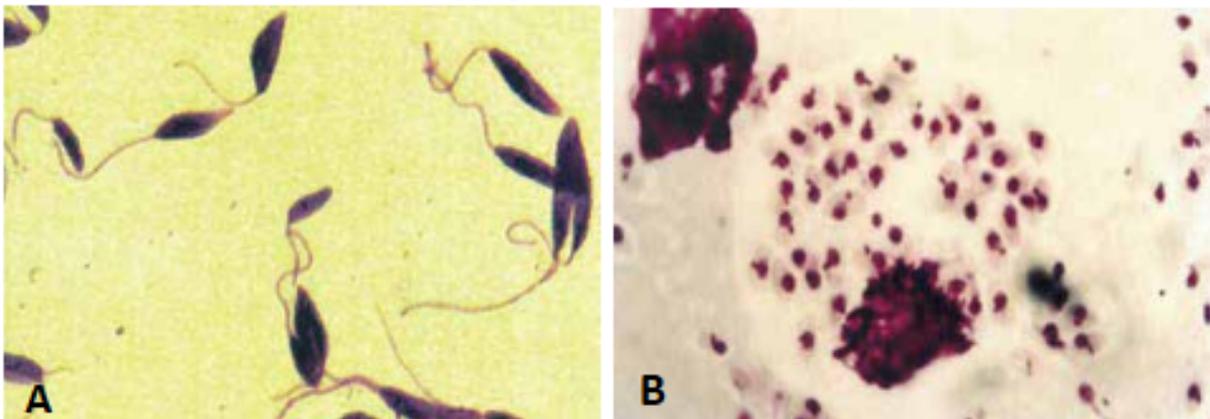
1.3 Ciclo biológico e transmissão

Os parasitos que causam as leishmanioses podem ser transmitidos aos seres humanos ou outros mamíferos por insetos vetores fêmeas hematófagas do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, nas Américas, sendo capazes de se disseminarem para áreas domiciliares urbanas e rurais (AISSAOUI *et al.*, 2021). Esses insetos são mais ativos no período crepuscular e noturno. Durante o dia, costumam habitar lugares mais sombrios e úmidos, protegidos do vento, como em fendas e habitações humanas (VIEIRA *et al.*, 2015). Entre os animais silvestres, podem ser destacadas algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres

(LAURENTI *et al.*, 2013; ELMAHALLAWY *et al.*, 2014).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear e possuem a característica de serem digenéticos, na qual necessitam de, pelo menos, dois hospedeiros para completarem seu ciclo. Esses parasitas apresentam as seguintes formas evolutivas durante o seu ciclo de vida: a forma promastigota, de caráter infectante, que são extracelulares e podem ser encontradas no tubo digestivo do vetor, e a forma amastigota, que não possuem flagelo exteriorizado, apenas interno, são intracelulares obrigatórios e estão presentes nos tecidos dos hospedeiros vertebrados.(Figura3) (BRASIL, 2017).

Figura 3 – Formas da *Leishmania spp.* promastigota (A) e amastigota (B).

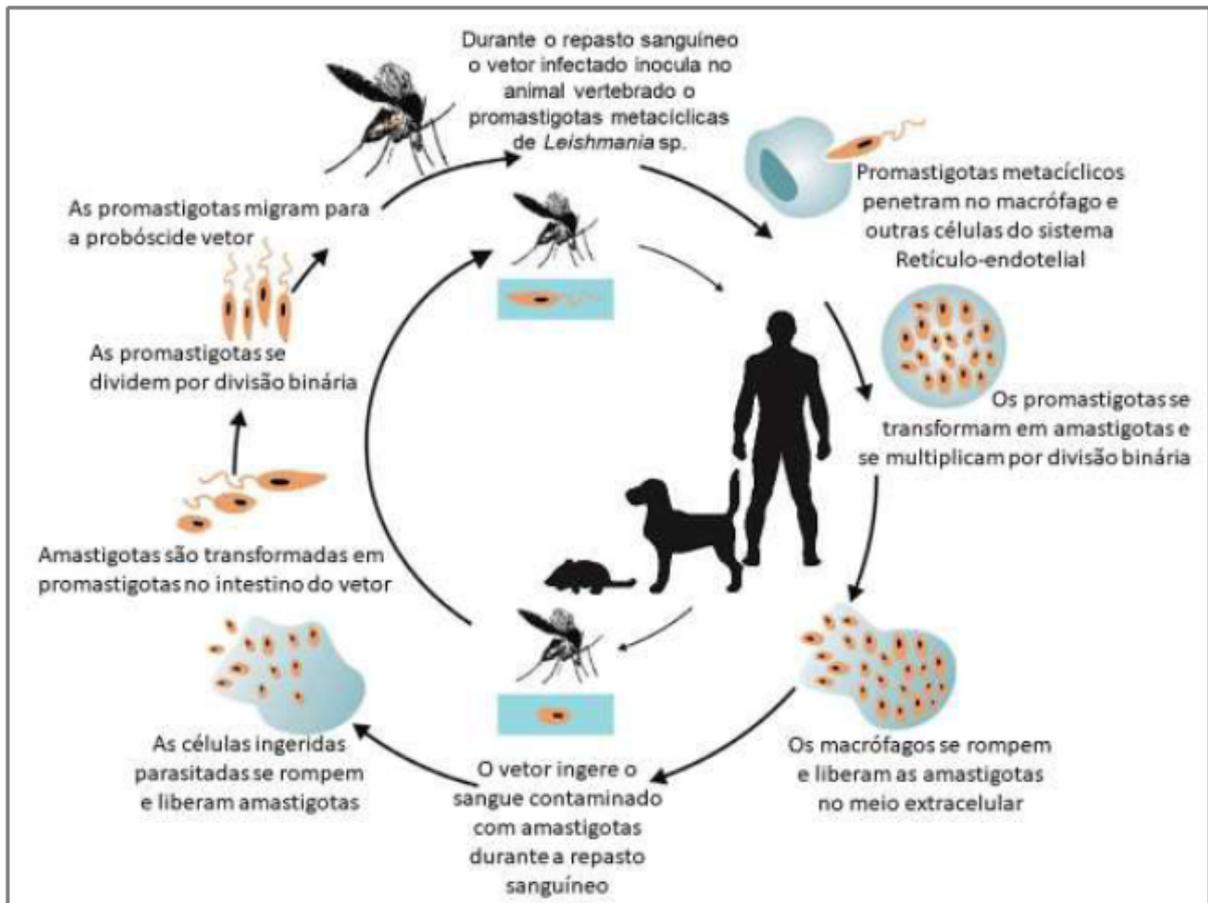


Fonte: Brasil (2017).

O contato do parasita com o vetor se inicia quando a fêmea do flebotomíneo está apta a se alimentar do sangue para o desenvolvimento de seus óvulos. Ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, a fêmea do vetor pode ingerir a forma amastigota da *Leishmania*, seja livre no tecido ou dentro de macrófagos infectados. Assim que chegam ao trato digestivo do inseto, as amastigotas se diferenciam para a forma promastigota procíclica e se fixam na parede intestinal. Após passarem por processos de maturação e metaciclogênese, elas se transformam em promastigotas metacíclicas, que são a forma infectante para os vertebrados, migrando para a parte anterior do intestino do flebotomíneo. Quando o inseto realiza um novo repasto sanguíneo, ocorre a regurgitação na derme do hospedeiro vertebrado da forma promastigota metacíclica, juntamente com substâncias presentes na saliva do vetor, como anticoagulantes, vasodilatadores, inibidores de plaquetas, imunomoduladores e anti-inflamatórios. (Figura 4) (CHAWLA; MADHUBALA, 2010; MONTALVO *et al.*, 2012).

Após adentrarem a derme, as células do sistema fagocítico mononuclear fagocitam o

Figura 4 – Ciclo de vida do protozoário *Leishmania spp.*.



Fonte: Adaptado de Montalvo *et al.* (2012).

parasita, formando o vacúolo parasitóforo, ou fagolisossomo, uma estrutura rica em enzimas, na qual as formas promastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas. Estas, sofrem processos de replicação no interior dos vacúolos até que ocorra a lise membranar dos macrófagos e, assim, a forma amastigota fica livre no meio extracelular, estando apta para ser novamente fagocitada por uma célula do sistema fagocítico mononuclear e continuar o processo de proliferação do parasita. O ciclo terá continuidade quando ocorrer um novo repasto sanguíneo pelo inseto flebotomíneo e este ingerir a forma amastigota livre ou em macrófagos infectados (BURZA *et al.*, 2018; SHEIKH *et al.*, 2020b).

1.4 Resposta imunológica na leishmaniose tegumentar americana

A resposta imunológica do hospedeiro à *Leishmania spp.* é complexa e está envolvida tanto com a resolução quanto com a própria patogenia da doença. Em alguns casos, essa resposta pode evoluir para uma cura espontânea ou para uma resposta inflamatória acentuada, caracterizando uma resistência ou susceptibilidade à doença pelo hospedeiro. Após a inoculação

do parasita, o sistema imune do hospedeiro age, inicialmente, através das células da imunidade inata, como, por exemplo, os neutrófilos e as células apresentadoras de antígenos (APC): macrófagos e células dendríticas (DC), que possuem a finalidade de fagocitar e eliminar o parasita (CRUVINEL *et al.*, 2010). Assim, embora os macrófagos sejam as células hospedeiras primárias para o parasita, os monócitos, DC e neutrófilos são recrutados para o local da infecção, podendo ser infectados e apresentarem um importante papel na resposta a infecção (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2014).

Os neutrófilos estão entre as primeiras células a serem recrutadas para o local da infecção e apresentam um papel crucial na imunopatogênese da leishmaniose, pois conseguem expressar receptores do tipo Toll (TLR) e interagir com padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) na superfície da *Leishmania*. Entretanto, dependendo do hospedeiro e da espécie do parasita, os neutrófilos podem provocar a morte ou abrigar os parasitos (HEINZEL *et al.*, 1993; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; SCORZA *et al.*, 2017).

Os neutrófilos podem fagocitar os parasitas e durante este processo ocorre a fusão dos grânulos celulares com o fagossoma, garantindo a ativação da NADPH oxidase, enzima fundamental ao metabolismo oxidativo (NORDENFELT; TAPPER, 2011). Essa enzima pode produzir o ânion superóxido, representando uma espécie reativas de oxigênio (EROS) que, juntamente com a presença de proteases, hidrolases ácidas, óxido nítrico (NO) e a liberação de grânulos tóxicos por parte dos neutrófilos, podem levar a formação de um ambiente com forte ação microbicida (SEGAL, 2005).

Embora ocorra a morte de parasitos pelos neutrófilos, alguns conseguem sobreviver dentro dos fagossomos, até estas células de defesa sofrerem apoptose. Durante esse mesmo período, os macrófagos chegam ao local da infecção e fagocitam os neutrófilos apoptóticos, reconhecendo a presença de fosfatidilserina em sua membrana externa. A captura de neutrófilos infectados que estão sofrendo apoptose por macrófagos não desencadeia uma resposta inflamatória, facilitando a entrada silenciosa dos parasitas nos macrófagos, com a sinalização por receptores Mertirosina quinase (MERTK) e aumento da liberação de TGF- β promovendo, assim, um estado anti-inflamatório destas células de defesa e uma maior replicação intracelular dos parasitos. Desse modo, os neutrófilos têm a capacidade de atuar como hospedeiros temporários para a *Leishmania*, permitindo que a entrada ocorra por meio de dois mecanismos distintos chamados "cavalo de Troia" e "coelho de Troia". (ZANDBERGEN *et al.*, 2004; PETERS *et al.*, 2008; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2015).

Os mecanismos conhecidos como "cavalo de Troia" e "coelho de Troia" na infecção por *Leishmania spp.* são duas formas distintas de invasão das células hospedeiras pelos parasitas. No caso do mecanismo "cavalo de Troia", as promastigotas de *Leishmania* são fagocitadas por macrófagos. Uma vez dentro dessas células, as promastigotas sofrem uma transformação em amastigotas e passam a se reproduzir, resultando na destruição da célula hospedeira e na liberação de novos parasitas capazes de infectar outras células. No caso do mecanismo "coelho de Troia", as promastigotas saíam dos neutrófilos pouco antes de serem fagocitadas pelos macrófagos. Em ambos os casos, as promastigotas aproveitam os neutrófilos como hospedeiros temporários até a chegada dos macrófagos, que são seus hospedeiros definitivos (ZANDBERGEN *et al.*, 2004; PETERS *et al.*, 2008).

Com isso, as respostas microbidas são suprimidas durante a infecção dos macrófagos e células dendríticas. É importante ressaltar que, nas células dendríticas, temos uma redução na capacidade de apresentação de antígenos às células T, pois essas células infectadas reduzem a expressão dos receptores co-estimuladores CD40 e CD80 (ZANDBERGEN *et al.*, 2004; PETERS *et al.*, 2008; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2015; CONCEICAO *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, foi descoberta uma nova estratégia utilizada pelos neutrófilos, denominada "*neutrophil extracellular traps*" – armadilha extracelular de neutrófilos (NET). Netose é o termo utilizado para descrever a morte do neutrófilo para a formação de NETs. A netose é uma categoria de morte celular, pois o conteúdo presente no interior da célula, como DNA e proteínas, são liberados em forma de rede para o meio extracelular onde os microorganismos são capturados ficando presos a esta. Com isso, essa estrutura em forma de rede consegue concentrar moléculas antimicrobianas. Esse mecanismo de morte difere da necrose e apoptose, pois não ocorre exposição de fosfatidilserina na membrana externa da célula e nem fragmentação do DNA. Além disso, foi demonstrado que o tratamento dos neutrófilos com inibidores de caspases e de necrose não interferiram no processo de netose, mostrando que essas vias tem formas independentes e objetivam impedir a disseminação do agente infeccioso (GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2009; ROCHAEL *et al.*, 2015; BARROS, 2016).

Além dos neutrófilos, os macrófagos e as células dendríticas, recrutados para o combate ao parasita, podem ser infectados e terem importantes e distintos papéis na imunopatogênese da doença. Monócitos inflamatórios e uma resposta de célula T auxiliar (CD4+) do tipo 1 (Th1) são críticos para controlar a infecção, enquanto a gravidade e a cronicidade da doença podem ser exacerbadas por neutrófilos, produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β ,

IL-2, IL-8, IFN- γ e TNF- α , ou respostas dominadas por células T citotóxicas (CD8+) ou CD4+ do tipo 2 (Th2) (CRUVINEL *et al.*, 2010; CECILIO *et al.*, 2014; SCOTT; NOVAIS, 2016; KUPANI *et al.*, 2021).

Parasitas resistentes aos mecanismos imunológicos não específicos serão reconhecidos e processados por células apresentadoras de antígenos (APC). As células dendríticas são as APCs mais importantes, pois fazem uma ponte ligando a imunidade inata à adaptativa. As APCs podem desempenhar funções diretas e diversas sobre a resposta imunológica, levando à ativação, assim como tolerância e anergia (FEIJÓ *et al.*, 2016). As DC infectadas são as principais células responsáveis pelo início da resposta imune adaptativa, sendo a principal fonte de IL-12 (LEÓN *et al.*, 2007). A maioria das DC são derivadas de monócitos recrutados para o sítio de inflamação onde está presente o parasita. Assim, estas se diferenciam em DC e migram para os linfonodos, onde as células "*natural killer*" - exterminadoras naturais (NK), ativadas pela infecção com o parasita, são recrutadas para o paracórtex dos linfonodos e produzem IFN- γ , estimulando, assim, a síntese de IL-12 pela DC (Figura 5) (BAJÉNOFF *et al.*, 2006).

Na imunidade inata, os macrófagos são responsáveis principalmente pelo controle de patógenos, enquanto na imunidade adaptativa, essas células participam do reconhecimento, processamento e apresentação de antígenos às células T (CARVALHO *et al.*, 2022). Os macrófagos desempenham um papel duplamente importante no controle da infecção por *Leishmania*, conseguem matar os parasitos, mas também podem oferecer um ambiente propício para a sua sobrevivência. Os macrófagos interagem com células T, além de produzirem moléculas e mediadores para participar da resposta inflamatória e reparo tecidual (MURRAY; WYNN, 2011).

Os macrófagos são células do sistema mononuclear fagocítico (SMF) presentes em tecidos, diferenciados dos monócitos, e apresentam dois fenótipos, M1 e M2, com o segundo subdividido em M2a, M2b e M2c. A polarização dos macrófagos nos fenótipos M1 e M2 depende dos sinais fornecidos pelo microambiente (PARISI *et al.*, 2018). Os macrófagos M1 e M2 são classificados com base em suas características fenotípicas e funções. O perfil M1 (classicamente ativado) possui ação fagocítica e pró-inflamatória, e ao serem ativados, produzem citocinas como IL-12 e IFN- γ , que originam substâncias tóxicas para os patógenos, como radicais livres de oxigênio e Óxido Nítrico (MOSSER; EDWARDS, 2008; JAYARAMAN *et al.*, 2022). O perfil M2a (alternativamente ativado) é anti-inflamatório e atua no reparo de tecidos, conseguindo depositar matriz extracelular e expressar TGF- β , inibindo também expressão de citocinas inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , enquanto M2b e M2c são reguladores, expressam

IL-10, limitando a progressão da inflamação (ROJAS *et al.*, 2015).

Após a infecção, os macrófagos e as DC são capazes de fagocitar a *Leishmania*. Mas são os macrófagos presentes no sítio da infecção e os recrutados que albergam o maior número de parasitos (PETERS *et al.*, 2008; HSIAO *et al.*, 2011). No processo de fagocitose, teremos a ação de citocinas como IFN- γ , IL-1 e TNF- α que conseguem estimular os macrófagos, causando uma atividade microbicida, com a formação de EROS, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, gerados pela explosão respiratória que ocorre durante a fagocitose e a montagem de NADPH oxidase, assim como espécies reativas de nitrogênio, geradas pela NO sintase induzível (iNOS), sendo, todos estes, importantes mediadores que promovem a morte intracelular dos parasitos (UENO; WILSON, 2012; OLEKHNOVITCH *et al.*, 2014; RAI *et al.*, 2018; LIBURKIN-DAN *et al.*, 2018).

As células T são outros componentes muito importantes na resposta imunológica a patógenos. Os eventos imunológicos iniciais, num período de 24 a 48 horas pós-infecção, são críticos para determinar o perfil de resposta do linfócito T auxiliar (CD4+) na leishmaniose. As células T são compostas por dois subtipos importantes que conseguem modular o seguimento da resposta imune. As células T auxiliar (CD4+) do tipo 1 (Th1) são as principais produtoras de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ . As células T CD4 + do tipo 2 (Th2) produzem citocinas anti-inflamatórias, como as interleucinas IL-4 e IL-10 (SCOTT *et al.*, 1988; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; SCOTT; NOVAIS, 2016).

A presença de um microambiente rico em IL-12 faz com que as células T CD4 se desenvolvam para o perfil Th1, produzindo mais IFN- γ , que com IL-12, atuam nos macrófagos infectados, levando à sua ativação pela via clássica e promovendo o seu desenvolvimento para o perfil M1. A retroalimentação entre macrófagos M1 e a subpopulação de linfócitos Th1 é crucial para a eliminação de patógeno intracelular (UZONNA *et al.*, 2004; SCOTT; NOVAIS, 2016). Os macrófagos M1 vão apresentar atividade microbicida e levam ao desencadeamento de uma explosão oxidativa, sendo a principal fonte de IFN- γ na cronicidade da doença. Os macrófagos ativados produzem e liberam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, L-6 e TNF- α (LIU; UZONNA, 2012; ROJAS *et al.*, 2015).

Por outro lado, a produção de IL-4 por células dendríticas deixa o microambiente rico com estas citocinas, fazendo com que os linfócitos T CD4 se desenvolvam para o perfil Th2. As células Th2 produzem as citocinas IL-4 e IL-13 que promovem a ativação por via alternativa dos macrófagos, proporcionando o desenvolvimento para o perfil M2, levando produção de

citocinas anti-inflamatórias, como o IL-10, regulação positiva da atividade da arginase e produção de poliaminas, que vão favorecer a proliferação intracelular de parasitos (MUXEL *et al.*, 2017).

Os parasitos são capazes de inibir produção de IL-12, além de aumentar a expressão de IL-10 e TGF- β , características do fenótipo M2a e M2b, ideais para a proteção contra o estresse oxidativo e a sobrevivência dos parasitos enquanto a disponibilidade de nutrientes é melhorada. A inibição de IL-12, por si, já é associada à diminuição da produção de IFN- γ por outras células, dificultando mais ainda a ativação de macrófagos para destruição dos parasitos. Além disso, as células T reguladoras de ocorrência natural (Treg) e os macrófagos infectados também produzem algumas citocinas imunorreguladoras, incluindo IL-10 e TGF- β , que contribuem para a redução da atividade microbicida do macrófago, levando a manutenção e o desenvolvimento do parasito no interior dos fagossomos do macrófago. A presença, portanto, de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10, IL-4 e TGF- β , são características de susceptibilidade de macrófagos à proliferação da *Leishmania* e progressão da doença (KAYE; SCOTT, 2011; SANS-FONS *et al.*, 2013; PETRITUS *et al.*, 2012).

Os macrófagos desempenham um papel crucial na destruição do parasito após a fagocitose. Para isso, existem diversos mecanismos utilizados por essas células de defesa para eliminar a *Leishmania* intracelular, como a ação de um poderoso sistema oxidante, incluindo o NADPH, que está envolvido na produção de intermediários oxigenados tóxicos, como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. Além disso, os macrófagos também produzem radicais nitrogenados, como o óxido nítrico (NO), originados pelo perfil pró-inflamatório M1 quando estimulados pelo IFN- γ . Esse radical é biossintetizado a partir da L-arginina pela enzima iNOS. Essas espécies intermediárias são tóxicas individualmente e, pelas suas características químicas, são altamente reativas, levando à formação de outros radicais ou moléculas com toxicidade potencializada, como a formação do peroxinitrito (STAMLER *et al.*, 1992; LIU; UZONNA, 2012; ROJAS *et al.*, 2015).

Entretanto, os parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* empregaram várias estratégias para evadir o sistema imunológico do hospedeiro, sendo que alguns aspectos são fundamentais para promover essa evasão. Uma vez dentro dos vacúolos do compartimento endossomal, o óxido nítrico (NO) é um dos principais componentes tóxicos presente nos fagossomos, juntamente com outros compostos oxigenados. A forma amastigota desse parasito demonstra uma habilidade específica para sobreviver em seus hospedeiros, seja suprimindo a produção de NO, resistindo à sua ação direta ou até mesmo produzindo seu próprio NO (KIMA,

2007). Além disso, a *Leishmania* interfere na via metabólica da L-arginina, possivelmente reduzindo a disponibilidade desse substrato para a iNOS na célula hospedeira, através de uma apropriação desse substrato. Essa ação levaria a uma diminuição na produção de NO pela via induzida da NOS. Como resultado, o parasito não apenas reduziria os níveis prejudiciais de NO produzidos por essa via, mas também se beneficiaria do substrato para produzir seu próprio NO (GENESTRA *et al.*, 2003b; GENESTRA *et al.*, 2003a; REGUERA *et al.*, 2009).

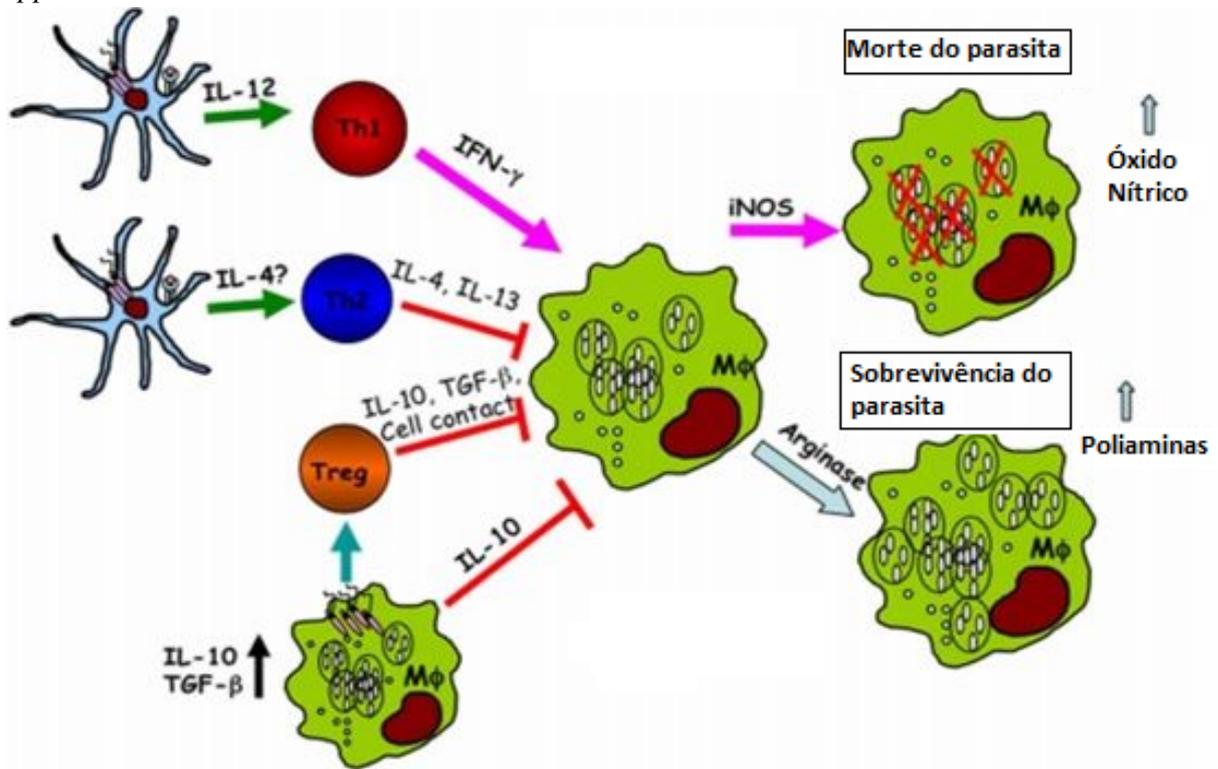
Para a defesa contra as espécies reativas oxigenadas, temos a ação da enzima superóxido dismutase (SOD), que vai converter o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. A SOD pode ser encontrada em todos os organismos eucariotos (JAMES, 1994; FAIRLAMB; CERAMI, 1992).

Tanto a célula hospedeira quanto o parasito também possuem um sistema antioxidante altamente eficaz, responsáveis pela eliminação do peróxido de hidrogênio. Esse sistema é composto pelas enzimas catalase e glutathione na sua forma reduzida (GSH, L-glutamil-L-cisteinil-glicina). Além disso, nos tripanossomatídeos, a neutralização do peróxido de hidrogênio também pode ser realizada pela ação da tripanotiona (T) e da enzima tripanotiona redutase (TR), um sistema de defesa antioxidante semelhante ao da glutathione-redutase presente nos mamíferos. Tais fatos potencializam a sobrevivência do parasito no interior da célula hospedeira. Assim, a formação desses radicais ocorre não somente na célula hospedeira como também nos parasitos, em processos inter-relacionados, que irão definir o estabelecimento ou não de infecção (CASTRO-PINTO *et al.*, 2014; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Estudos demonstram que as formas amastigotas virulentas apresentam uma alta atividade de enzimas capazes de atuarem como detoxificadora de EROS antes que eles causem a lesão celular (BARBOSA *et al.*, 2010). Esta linha de defesa é constituída pela glutathione peroxidase na forma reduzida (GSH) (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Além disso, um complexo de defesa enzimático antioxidante composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase representam um importante mecanismo de defesa contra a ação de macrófagos. O MDA (Malondialdeído), como produto de degradação dos ácidos graxos, pode ser produzido durante o estresse oxidativo gerado pela infecção, podendo atuar como um agente pró-inflamatório e contribuir para a inflamação tecidual durante a infecção por *Leishmania spp.* Desta forma, as amastigotas apresentam atividade enzimática elevada capaz de eliminar as EROs, utilizando SOD, GSH e catalase (DEREURE *et al.*, 2003; BENALI *et al.*, 2015; DEREURE *et al.*, 2003).

Figura 5 – Células dendríticas e macrófagos regulando o resultado da infecção por *Leishmania spp.*



Fonte: Dubie e Mohammed (2020), com adaptações.

1.5 Tratamento das leishmanioses

Apesar de décadas de pesquisa, não existe ainda vacina eficaz contra as leishmanioses aprovada para uso humano, parcialmente devido ao fato de que há relatos claros de falta de proteção. São vários os fatores que influenciam no tratamento adequado. Entre eles, pode-se destacar: a espécie do parasito, a localização geográfica, comorbidades e a manifestação clínica da doença. A quimioterapia dessas doenças tem sido baseada no uso de componentes de antimônio, antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam®), ambos administrados por via intramuscular ou intravenosa.

Embora essas medicações sejam consideradas eficazes, são inúmeros os relatos de efeitos colaterais em pacientes cardiopatas, causando cardiotoxicidade. Além disso, os antimoniais pentavalentes também provocam: intervalo cardiopulmonar prolongado, arritmia cardíaca, nefrotoxicidade ventricular, arritmia cardíaca, hepatotoxicidade e níveis elevados de enzimas pancreáticas. Assim, a administração desses medicamentos requerem a supervisão clínica ou hospitalização durante o tratamento por causa dos efeitos colaterais e toxicidade (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; MENEZES *et al.*, 2015; SHEIKH *et al.*, 2020a).

Os estudos sugerem, como mecanismo de ação, que os antimoniais pentavalentes, após penetrarem o organismo, passam por biotransformação para antimoniato trivalente, mais tóxico e letal para o parasito, ligando-se a polipeptídios, inibindo as enzimas da via glicolítica, da beta-oxidação e a DNA topoisomerase, provocando o efluxo de tripanotona e glutatona, sendo as promastigotas menos sensíveis que as amastigotas (AMATO *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2010b), além de determinar alterações na membrana plasmática parasitária, observadas por microscopia eletrônica (HALDAR *et al.*, 2011). Também foi mostrado que o tratamento com antimoniato de meglumina aumenta a fagocitose, induzir a produção de ânion superóxido, TNF- α e, conseqüentemente, NO por células do SMF, apresentando, desta forma, efeito imunomodulador (MUNIZ-JUNQUEIRA; PAULA-COELHO, 2008; SALDANHA *et al.*, 2012; PETRITUS *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2021).

Entre os motivos pelos quais o tratamento com antimonial falha, estão as sub doses, tratamento irregular e/ou abandono e, na LTA, a quantidade de lesões (RODRIGUES *et al.*, 2006). A não utilização correta dos antimoniais, principalmente devido a tratamentos irregulares e incompletos, expõe os parasitos a pressões seletivas que guiam a evolução de resistência, sendo o maior problema que delinea o tratamento com os antimoniais na atualidade. Os mecanismos pelos quais ocorrem resistência aos antimoniais são diversos, como diminuição da redução da forma pentavalente para a trivalente, aumento de enzimas e precursores de glutatona e tripanotona, ou sequestro e acúmulo do antimonial em vacúolos. Também foi demonstrado em cepa resistente *L. amazonensis* que não ocorre diminuição da absorção de antimonial (BERMAN *et al.*, 1989; BLUM *et al.*, 2004; CROFT *et al.*, 2006).

Os emergentes relatos da resistência ao antimônio em pacientes com leishmaniose em várias partes do mundo tem comprometido severamente a habilidade de controlar a doença. Além disso, a resistência aos antimoniais pode significar uma situação alarmante frente ao aumento dos casos de coinfeção com HIV (CROFT *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2010a). Diante deste contexto, este estudo tem o objetivo de avaliar *in vitro* a interação entre macrófagos humanos nos estágios iniciais da infecção com cepa de *Leishmania braziliensis* resistente ou susceptíveis ao tratamento com antimônio. Conseqüentemente, o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas para a leishmaniose pode se beneficiar bastante de estudos que se concentrem na compreensão mais clara de como estas células contribuem para a resposta imune e inflamatória contra parasitos resistentes ou susceptíveis ao tratamento, principalmente para aqueles que já são resistentes aos medicamentos recorrentes.

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a leishmaniose tegumentar representa um importante problema de saúde pública. No Estado do Ceará, a LT tem como agente etiológico a *L. braziliensis* que pode causar lesões autolimitadas ou formas mais graves, como a mucocutânea, que apresenta comprometimento das mucosas da orofaringe, podendo levar a deformidades e/ou morte, ou a disseminada em indivíduos imunossuprimidos.

Na resposta inicial à *Leishmania*, os macrófagos são responsáveis pelo controle do parasito, e mais tarde, participam do reconhecimento, processamento e apresentação de antígenos às células T. Essas células produzem moléculas e mediadores para participar da resposta inflamatória e reparo tecidual. Os macrófagos constituem a primeira linha de defesa contra patógenos intracelulares e induzem o desenvolvimento da resposta Th1 via secreção de IL-12. Os principais mecanismos utilizados por essas células para eliminar *Leishmania* intracelular incluem o sistema NADPH, através de EROs e a produção de óxido nítrico (NO), sob estimulação de IFN- γ .

Os fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, que apesar de eficazes, geralmente, apresentam efeitos colaterais graves e várias inconveniências, entre elas, o surgimento de cepas resistentes, acarretando mais dificuldades para o tratamento.

Estudos para determinar se os macrófagos respondem de maneira diferente às cepas de *Leishmania* resistentes ou susceptíveis ao tratamento com o antimônio, são de grande relevância porque podem trazer benefícios para estratégias não convencionais que foquem em amplificar as funções da resposta imune inata, particularmente aquelas funções que podem exercer direta atividade leishmanicida.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar a resposta imune de macrófagos infectados por cepas de *Leishmania braziliensis* resistente e suscetível ao antimoníato de meglumina

3.2 Objetivos específicos

1-Avaliar carga parasitária em macrófagos, após a infecção por cepas de *L.braziliensis* resistente e suscetível ao antimoníato de meglumina;

2-Determinar a atividade dos mediadores inflamatórios catalase, SOD, GSH, MDA e NO por macrófagos infectados por cepas de *L. braziliensis* resistente e suscetível ao antimoníato de meglumina;

3-Determinar o perfil da atividade de citocinas (TNF- α , IL-12, IL-4 e IL-10) por macrófagos infectados por cepas de *L. braziliensis* resistente e suscetível ao antimoníato de meglumina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Parasitos

As cepas de *L. braziliensis* utilizadas no estudo foram: Thor (MCAN/BR/98/R619), atenciosamente disponibilizada pela Dra. Alda Cruz, FIOCRUZ-RJ, reconhecida por ser suscetível ao tratamento com antimônio; e LTCP393, gentilmente fornecida pelo Prof. Roque Pacheco Almeida, da Universidade Federal de Sergipe.

A cepa Thor foi isolada de um cão da raça dinamarquês com LTC, proveniente do bairro Itaipuaçu, município de Maricá –RJ. O isolado foi caracterizado por isoenzimas apresentando padrão típico de *L. braziliensis* (SERRA *et al.*, 2003).

A cepa LTCP393 foi isolada de um paciente masculino com 26 anos que apresentava diversas lesões de pele que variavam em tamanho e com a presença de doença mucosa. O paciente foi tratado com diversos cursos de antimônio, pentoxifilina e anfotericina B ao longo de 20 anos antes de ser considerado curado. Após testes *in vitro*, a LTCP393 foi referenciada como parasito resistente ao antimônio e NO (COSTA *et al.*, 2011).

Os parasitos foram cultivados *in vitro* a 25°C em tubos de ensaio com meio Neal, Novy, e MacNeal (N.N.N.), contendo Schneider suplementado com 20% de Soro fetal bovino (SBF) inativo, 2% de urina humana estéril, 100 U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich). Para os experimentos, foram utilizadas promastigotas até a 5.^a passagem de cultivo. As promastigotas foram submetidas a três ciclos de lavagem com salina estéril gelada, com centrifugação a 3.000 rpm, por 15 min a 4°C e ajustadas com meio RPMI para as concentrações desejadas em cada experimento. A viabilidade dos parasitos foi analisada ao microscópio óptico.

4.2 Cultura e infecção de macrófagos J774

Macrófagos da linhagem J774 foram cultivados em meio RPMI 1640, suplementado com 20% de SBF, 50 µM/ de 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina, e antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina) e mantidos em estufa de CO₂ a 5%, 95% de umidade, à 37°C. Após crescimento das células, a cultura foi centrifugada a 1500 rpm, por 10 minutos a 4°C, e, em seguida, o precipitado de células foi ressuscitado em meio RPMI suplementado. Os macrófagos foram distribuídos em placas de 24 poços, de fundo chato, contendo lamínulas

redondas de vidro (23 mm), e incubados durante 24 horas para aderirem à superfície da lamínula, com concentração de 10^6 macrófagos/mL. Para a infecção dos macrófagos com *L. braziliensis*, a cultura dos parasitos foi centrifugada a 3000 rpm, por 15 minutos a 4°C e, em seguida, foram contados em câmara de Neubauer e diluídos em meio RPMI suplementado na concentração de 10^7 parasitos/mL. A taxa de infecção dos macrófagos foi mantida de 1 macrófago para cada 10 parasitos. Os macrófagos infectados foram incubados em estufa 5% de CO₂ a 37°C e 95% de umidade por 24, 48 e 72 horas. Após esse tempo, os sobrenadantes foram retirados dos poços e armazenados em freezer -20°C para posterior análise dos mediadores inflamatórios.

4.3 Determinação da taxa de infecção de macrófagos

Para quantificar o nível de infecção dos macrófagos, as lamínulas contendo as células foram lavadas com salina, e em seguida, fixadas e coradas com corante Giemsa (Sigma-Aldrich). As lamínulas coradas foram montadas em lâminas de vidro e examinadas em microscopia óptica. Áreas de 50 células foram examinadas e o número de amastigotas/ 50 células foi determinado.

4.4 Dosagem de citocinas

O nível das citocinas TNF- α , IL-12, IL-4 e IL-10 nos sobrenadantes obtidos da cultura de macrófagos infectados foi determinada utilizando-se a técnica ELISA, como recomendado pelo fabricante dos kits (BD Biosciences, San José, CA, USA). Brevemente, placas de 96 poços, foram sensibilizadas por 12 a 18h com o anticorpo de captura anti-citocina purificado na concentração determinada, a 4°C. A placa foi lavada, utilizando-se solução de lavagem (Tampão fosfato-salino (PBS) com Tween 20 a 0,05%), e em seguida foi realizado bloqueio com PBS e SBF a 10%, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS + Tween 20, foram adicionados o padrão e as amostras em duplicata e, em seguida, a placa foi incubada novamente por 2h. Após lavagem com PBS + Tween 20, a placa foi incubada por 1h com o anticorpo de detecção conjugado à enzima peroxidase. Após nova lavagem, o substrato foi adicionado. A placa foi incubada por 30 min, à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi finalizada com ácido fosfórico (1:20) e a leitura realizada em leitor de microplacas ELISA (Molecular Devices Corp.; Sunnyvale, CA, USA), usando filtro de 450nm. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Softmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

4.5 Quantificação de Proteínas Totais

A determinação da quantidade de proteínas totais foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais, da Universidade Federal do Ceará, cujo grupo de pesquisa é liderado pela Dra. Flávia Almeida Santos. Para essa quantificação, foi utilizado o método colorimétrico proposto por Lowry *et al.* (1951), com o kit DC Protein Assay (BioRad Laboratories), seguindo as instruções do fabricante. Para calibrar o método, foi preparada uma curva padrão de Albumina sérica bovina (BSA) diluída em tampão fosfato de potássio (pH 7,4) com concentrações variando de 0,25 a 2,5 mg/ml. Em seguida, 5 μ l de cada amostra ou BSA diluída foram pipetados em triplicata em uma placa de 96 poços. Adicionou-se 25 μ l da solução A (20 μ l de reagente S mais 1 ml de reagente A) e 200 μ l do reagente B. A placa foi coberta com papel alumínio e incubada no escuro, sob agitação leve, por 10 min. A leitura da absorbância foi feita em um espectrofotômetro a 750 nm. A concentração de proteína em cada amostra foi calculada a partir da curva padrão gerada com o BSA, plotando-se um gráfico da absorbância em função da quantidade de proteína. Essa curva foi obtida por regressão linear e os valores de absorbância medidos para cada amostra foram substituídos na equação da curva para determinar as respectivas concentrações de proteína, utilizando o software GraphPad Prism 7.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.6 Ensaio enzimático da catalase

Para avaliar a atividade da enzima catalase, foi utilizada a metodologia descrita por Beers e Sizer (1952). Para tanto, foi preparada uma solução de peróxido de hidrogênio (0,059 M) com uma solução tampão fosfato de potássio gelado (0,05 M, pH 7,4), que foi utilizada como substrato para o ensaio. Em uma cubeta de quartzo, adicionou-se 10 μ l do sobrenadante da amostra e 2 ml da solução tampão/peróxido de hidrogênio (0,059 M). A absorbância foi medida em um espectrofotômetro a 240 nm e a variação da absorbância entre o primeiro e o sexto minuto foi registrada. Os resultados foram expressos em mmol de catalase por minuto por grama de proteína (mmol/min/g de proteína).

4.7 Dosagem de óxido nítrico (NO)

Foi realizada nos sobrenadantes da cultura de macrófagos para detectar os níveis de nitrito (NO₂), por meio da reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Os sobrenadantes foram

incubados em duplicata com o reagente de Griess (1:1 v/v), durante 10 min à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro a 540 nm, e a concentração de NO_2 foi determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio e expressa como $\mu\text{mol/mL}$. Para evitar possíveis interferências de NO_2 presentes no meio, foi adicionado um branco para cada experimento, utilizando RPMI suplementado, o qual é o meio utilizado na cultura das células.

4.8 Ensaio enzimático da superóxido dismutase (SOD)

Em uma câmara escura, misturaram-se 10 μl do sobrenadante das amostras, 1 mL do meio de reação (tampão fosfato de potássio 50 μM , EDTA 100 nM e L-metionina 13 mM pH 7,8), 150 μl de NBT (Azul de nitrotetrazólio (NBT), 750 μM) e 300 μl de riboflavina (2 μM) em tubos de vidro. A mistura foi exposta à lâmpada fluorescente (15 W) por 15 min e, em seguida, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 560 nm (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

Os resultados foram expressos em unidades de enzima, representando a quantidade de Super óxido dismutase (SOD) necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50% por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

4.9 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida(GSH)

A quantidade de Glutathiona reduzida (GSH) foi medida usando o reagente de Ellman (DTNB), seguindo o protocolo descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Para isso, 40 μl do sobrenadante foram misturados com 50 μl de água destilada e 10 μl de ácido tricloroacético (TCA, 50%), em seguida, foram centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços contendo tampão Trizma base (0,4 M) com EDTA (0,02 M, pH 8,9) e DTNB (0,01 M). A absorbância foi lida em um leitor de microplaca a 412 nm dentro de 5 min após a adição de DTNB. As absorbâncias foram convertidas para μmol de GSH por grama de proteína usando uma curva padrão de glutathiona e os resultados foram expressos como $\mu\text{mol/g}$ de proteína.

4.10 Determinação dos níveis de malondialdeído

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da mensuração do Malondialdeído (MDA), de acordo com o método descrito por Agar et al. (1999), com modificações. Para

tanto, alíquotas de 100 μ l dos sobrenadantes da cultura foram misturadas com ácido acético 20% e ácido 2-tiobarbitúrico 0,5% (diluído em ácido acético 20%, pH 2,4-2,6). A mistura foi incubada em banho-maria a 95°C por 1 h e, em seguida, transferida para um banho de gelo por 30 min. Em seguida, dodecil sulfato de sódio (SDS, 8,1%) foi adicionado e a mistura foi centrifugada a 12000 rpm por 15 min, a 25°C. A leitura da amostra foi realizada em um espectrofotômetro com comprimento de onda em 532 nm. A curva padrão foi obtida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão. Os resultados foram expressos em mmols de MDA por grama de proteína (mmol/g de proteína).

4.11 Análise estatística

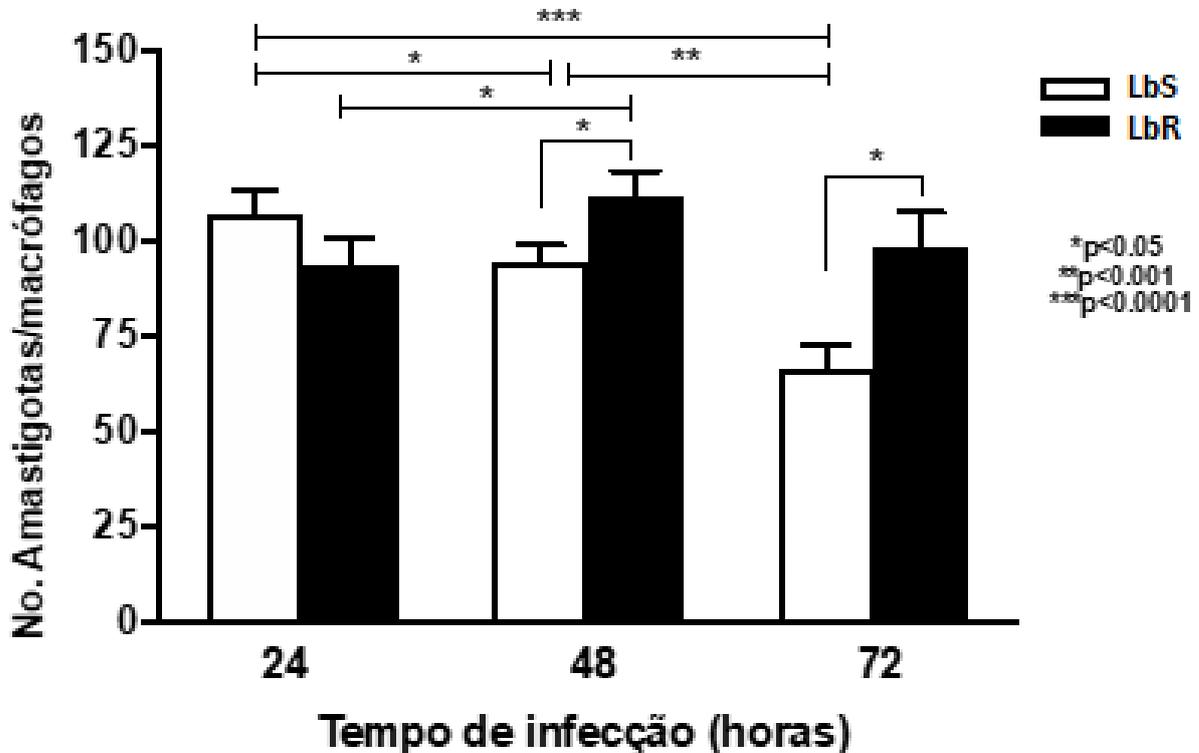
Todos os testes foram realizados usando o GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (SEM). Os dados foram analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a distribuição normal. Para a comparação entre múltiplos grupos, foi realizado o teste one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Um nível de significância mínimo de $p < 0,05$ foi adotado em todos os testes.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da carga parasitária em macrófagos J774 após infecção por *Leishmania braziliensis* resistente e suscetível a antimônio.

Para a avaliação da carga parasitária (Fig. 6), foi realizada a contagem de amastigotas presentes em cinquenta macrófagos de linhagem J774 contados por campo. A contagem foi realizada em macrófagos infectados com a cepa suscetível Thor (LbS) e a resistente LTCP393 (LbR), nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Figura 6 – Carga parasitária em macrófagos J774 infectados.



Fonte: Elaborado pelo autor. A contagem da carga parasitária em macrófagos após a infecção com *L. braziliensis* resistente e suscetível foi realizada nos tempos de 24, 48 e 72 h com auxílio de microscopia óptica. Os valores representam média aritmética \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. Legenda: *Leishmania braziliensis* resistente (LbR); *Leishmania braziliensis* suscetível (LbS).

Ao se analisar o tempo de 24 horas após a infecção, foi observado que não houve uma alteração significativa ao se comparar a carga parasitária de macrófagos infectados com a cepa resistente (valor + EPM) com aqueles infectados com a cepa suscetível (valor + EPM). Entretanto, a cepa LbR aumentou significativamente a sua carga parasitária nos macrófagos ao se comparar o tempo de 48 horas ($112,20 \pm 6,2$ amastigotas) com o tempo de 24 horas ($94,00 \pm 7,0$ amastigotas), e permaneceu mais alta com 72h, em relação à LbS.

Diferentemente da cepa resistente, a cepa suscetível reduziu a sua carga parasitária nos macrófagos ao longo do tempo. Foi observado que a carga parasitária dos macrófagos infectados com a cepa LbS apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) quando comparados os dados dos tempos de 24 horas ($107,00 \pm 6,6$ amastigotas), 48 horas ($94,67 \pm 4,6$ amastigotas) e 72 horas ($66,44 \pm 6,3$ amastigotas). Notavelmente, o tempo de 72 horas mostrou uma redução significativa ($p < 0,001$).

Após 48 horas da infecção, foi observado que a carga parasitária de macrófagos infectados com a cepa LbR ($112,20 \pm 6,2$ amastigotas) apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aqueles infectados com a cepa LbS ($94,67 \pm 4,6$ amastigotas). Entretanto, foi observado que os macrófagos infectados com a cepa suscetível tiveram uma redução da carga parasitária ao serem comparados com 72 horas pós-infecção. Dessa forma, a carga parasitária de macrófagos infectados com a cepa LbS com 48 horas é maior ($94,67 \pm 4,6$ amastigotas) do que com 72 horas ($66,44 \pm 6,3$ amastigotas), e isso foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

Com 72 horas do estímulo inicial, foi observado que a carga parasitária de macrófagos infectados com a cepa resistente ($98,67 \pm 9,2$ amastigotas) teve um aumento significativo ($p < 0,05$) quando comparada com a daqueles infectados com a cepa suscetível ($66,44 \pm 6,3$ amastigotas).

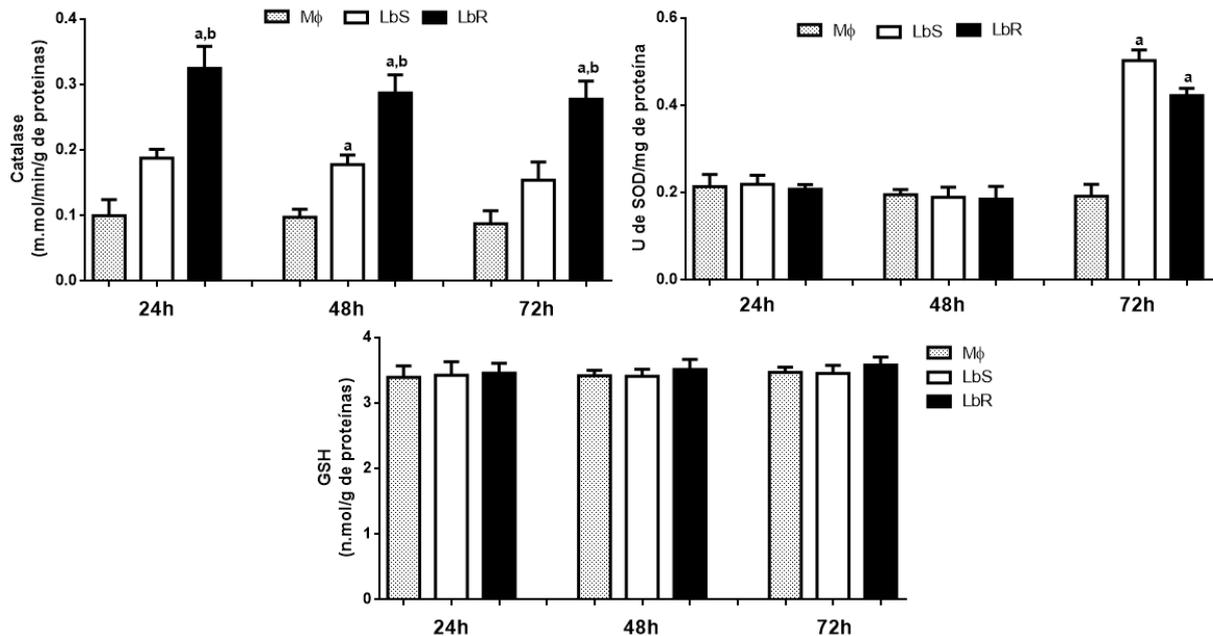
5.2 Produção de mediadores do estresse oxidativo por macrófagos infectados com *L. braziliensis* resistente e suscetível

A atividade dos marcadores antioxidantes, representados pelas enzimas catalase, SOD e GSH, foram analisadas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados e do controle, referentes aos tempos de 24, 48 e 72 horas após a infecção de macrófagos com cepas de LbR ou LbS, conforme figura 7.

Para a atividade da enzima catalase, foi observado que, no tempo referente a 24 horas, a cepa resistente induziu a produção de catalase em maiores níveis ($0,32 \pm 0,03$ mmol/min/g de proteína), e estatisticamente significativo ($p < 0,05$), em relação aos induzidos pela cepa suscetível ($0,18 \pm 0,01$ mmol/min/g de proteína) e o grupo controle ($0,10 \pm 0,02$ mmol/min/g de proteína) (Figura 7).

Após 48 horas, foi observado que a cepa resistente permaneceu induzindo uma produção de catalase em maiores níveis ($0,28 \pm 0,02$ mmol/min/g de proteína), e estatisticamente significativo ($p < 0,05$), em relação aos induzidos pela cepa suscetível ($0,17 \pm 0,01$ mmol/min/g

Figura 7 – Marcadores antioxidantes



Fonte: Elaborado pelo autor. A produção de marcadores antioxidantes (catalase, SOD e GSH) por macrófagos infectados com *L. braziliensis* resistente e suscetível foi analisada nos tempos de 24, 48 e 72 h após os estímulos. Os valores representam média aritmética \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. Legenda: SOD = Superóxido Dismutase; GSH = Glutathiona reduzida; M Φ = Macrófagos não infectados; *Leishmania braziliensis* resistente (LbR); *Leishmania braziliensis* suscetível (LbS); a = grupo controle; b = LbS.

de proteína) e o grupo controle ($0,09 \pm 0,01$ mmol/min/g de proteína). Entretanto, neste tempo analisado, foi constatado também que a cepa LbS induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) na produção de catalase em relação ao grupo controle.

Na análise do tempo correspondente a 72 horas após a infecção, foi observado que a cepa LbR ($0,27 \pm 0,02$ mmol/min/g de proteína) induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de catalase, tanto em relação aos valores induzidos pela cepa LbS ($0,15 \pm 0,02$ mmol/min/g de proteína) quanto ao grupo controle ($0,08 \pm 0,01$ mmol/min/g de proteína).

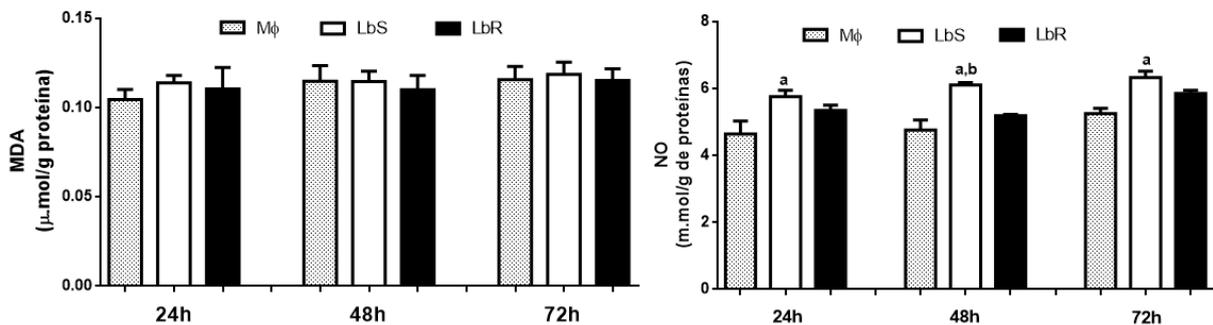
Na análise da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), referentes aos tempos de 24 e 48h após a infecção, não foram observados aumentos relevantes nos níveis dessa enzima induzidos por ambas as cepas, e nem destas em relação ao grupo controle. Entretanto, após 72h da infecção, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) induzidos pelas cepas LbR ($0,42 \pm 0,01$ U/mg de proteína) e LbS ($0,50 \pm 0,02$ U/mg de proteína) em relação ao grupo controle ($0,19 \pm 0,02$ U/mg de proteína). Não foi observado um aumento significativo entre os níveis induzidos pelas duas cepas nesse tempo analisado (Figura 7).

Ao se analisar o GSH, foi observado que as cepas LbR e LbS não induziram aumentos significativos entre elas e nem destas em relação ao grupo controle nos três tempos avaliados (Figura 7).

A atividade dos marcadores de oxidação, representados pelo MDA e NO, foram analisadas nos sobrenadantes das culturas, referentes aos tempos de 24, 48 e 72 horas após a infecção de macrófagos com cepas de LbR ou LbS, conforme figura 8.

Para o MDA, não foram observadas alterações significantes nos níveis induzidos entre as cepas LbR e LbS e nem destas em relação ao grupo controle nos tempos analisados (Figura 8).

Figura 8 – Marcadores de oxidação



Fonte: Elaborado pelo autor. A produção de marcadores de oxidação (MDA e NO) por macrófagos infectados com *L. braziliensis* resistente e suscetível foram analisados nos tempos de 24, 48 e 72 h após os estímulos. Os valores representam média aritmética \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. Legenda: MDA = malondialdeído; NO = Óxido Nítrico; M Φ = Macrófagos não infectados; *Leishmania braziliensis* resistente (LbR); *Leishmania braziliensis* suscetível (LbS); a = grupo controle; b = LbR.

Na avaliação dos níveis de óxido nítrico, foi observado, no tempo referente a 24 horas após a infecção, que não houve alterações significantes ao se comparar os níveis induzidos entre as cepas LbR e LbS e nem da cepa resistente em relação ao grupo controle. Entretanto, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de NO induzidos pela cepa suscetível ($5,75 \pm 0,19$ mmol/g de proteína) em relação apenas ao grupo controle ($4,64 \pm 0,39$ mmol/g de proteína) (Figura 8).

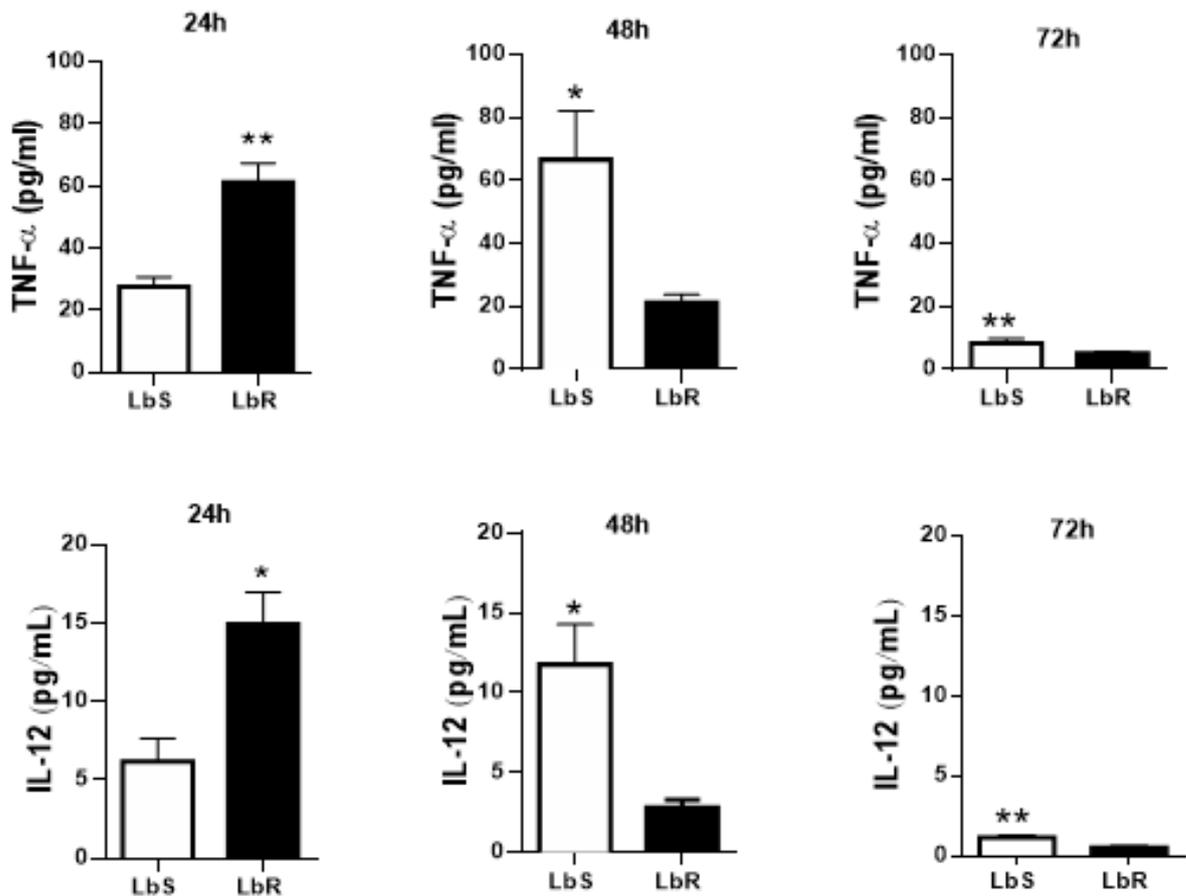
Com 48 horas após a infecção, não foram observadas alterações significantes entre os níveis de NO, induzidos pela cepa LbR em relação ao grupo controle. Contudo, a cepa LbS ($6,10 \pm 0,07$ mmol/g de proteína) induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de NO, tanto em relação à cepa LbR ($5,18 \pm 0,04$ mmol/g de proteína) quanto ao grupo controle ($4,76 \pm 0,29$ mmol/g de proteína).

Após 72h da infecção, foi observado que a cepa LbS ($6,33 \pm 0,19$ mmol/g de proteína) induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) apenas em relação ao grupo controle ($5,25 \pm 0,15$ mmol/g de proteína). Não foram observados aumentos significantes entre os níveis de NO induzidos entre as cepas LbR e LbS.

5.3 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos infectados com *L. braziliensis* resistente e suscetível

As citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12 foram mensuradas nos tempos de 24, 48 e 72 horas e podem ser observadas no gráfico representado pela figura 9.

Figura 9 – Quantificação da produção de TNF- α e IL-12 por macrófagos infectados com *L. braziliensis* resistente e suscetível, após 24, 48 e 72 horas dos estímulos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os sobrenadantes resultantes da infecção de macrófagos por *L. braziliensis* resistente e suscetível foram coletados após 24, 48 e 72 horas de estímulos e utilizados para a dosagem de TNF- α e IL-12. Os valores representam média aritmética \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. Legenda: TNF- α = Fator de Necrose Tumoral alfa; IL-12: Interleucina 12; *Leishmania braziliensis* resistente (LbR); *Leishmania braziliensis* suscetível (LbS)

A figura 9 demonstra que, no tempo de 24 horas, a produção de TNF- α induzida pela cepa LbR ($61,37 \pm 6,09$ pg/ml) apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos valores induzidos pela cepa LbS ($27,61 \pm 3,19$ pg/mL).

Após 48 horas, a cepa LbS ($66,62 \pm 15,39$ pg/mL) induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) na produção de TNF- α em relação aos níveis induzidos pela cepa LbR ($21,23 \pm 2,53$ pg/mL).

Nas 72 horas posteriores a infecção, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de TNF- α induzidos pela cepa LbS ($8,37 \pm 0,68$ pg/mL) em comparação aos induzidos pela cepa LbR ($5,24 \pm 0,22$ pg/mL).

Quando analisado os dados da quantificação da citocina IL-12, no tempo de 24h, foi verificado que esta citocina apresentou o mesmo comportamento de TNF-a, com aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis induzidos pela cepa LbR ($14,95 \pm 2,00$ pg/mL) em relação aos níveis induzidos pela cepa LbS ($6,18 \pm 1,48$ pg/mL).

Para o tempo de 48 horas, foi observada a inversão com um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de IL-12 induzidos pela cepa LbS ($11,77 \pm 2,51$ pg/mL) em relação aos valores induzidos pela cepa LbR ($2,81 \pm 0,48$ pg/mL).

Após 72 horas, ocorreu redução apenas nos níveis de IL-12, tanto em relação aos induzidos pela cepa resistente quanto em relação aos induzidos pela cepa suscetível. Entretanto, foi constatado que os níveis de IL-12 induzidos pela cepa LbS ($1,15 \pm 0,15$ pg/mL) apresentaram níveis mais altos e significativos ($p < 0,05$) em comparação aos níveis induzidos pela cepa LbR ($0,51 \pm 0,10$ pg/mL).

5.4 Quantificação de citocinas anti-inflamatórias por macrófagos infectados com *L. braziliensis* resistente e suscetível

Foram mensuradas as citocinas IL-4 e IL-10 nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a infecção e o resultado pode ser observado nos gráficos presentes na figura 10.

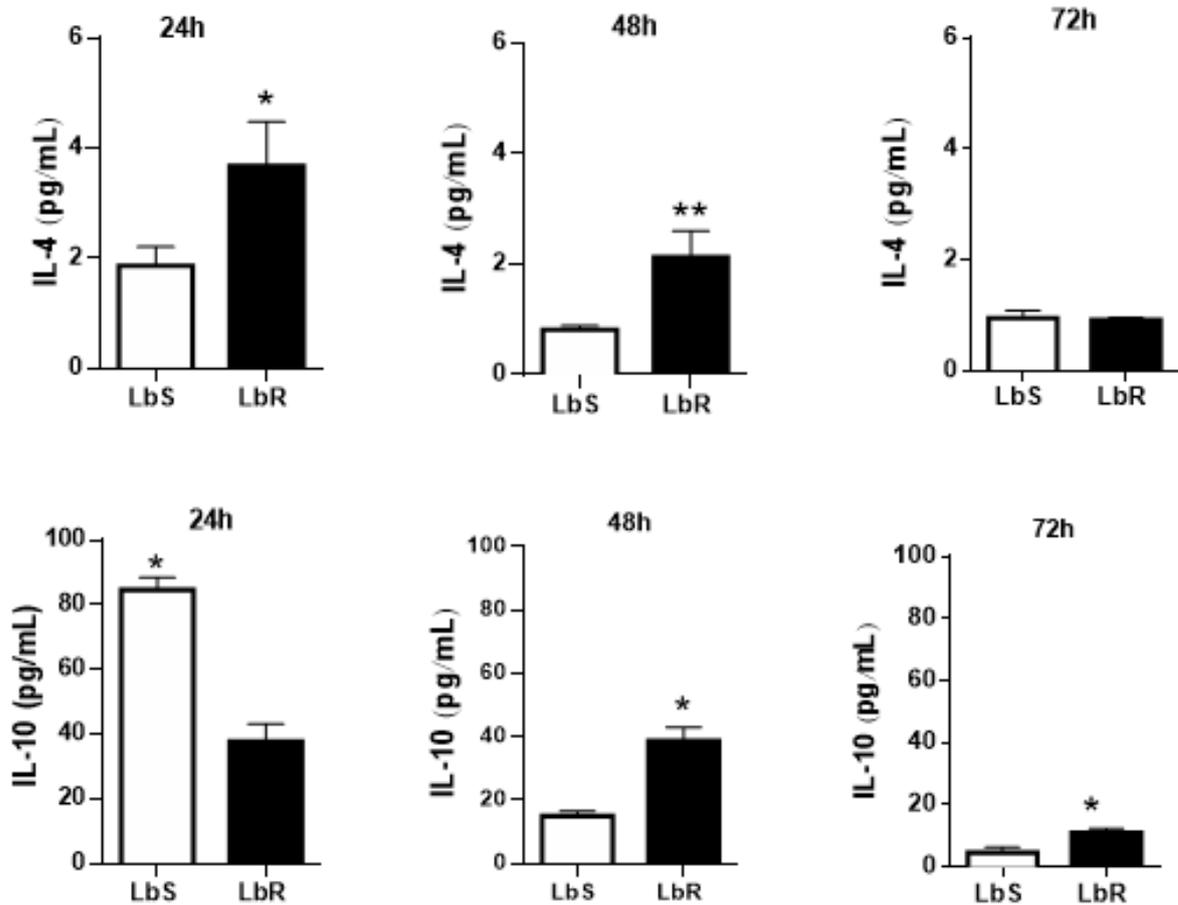
Com 24 horas após a infecção, foi observado que a citocina IL-4 apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis induzidos pela cepa LbR ($3,67 \pm 0,80$ pg/mL) em relação aos induzidos pela cepa LbS ($1,86 \pm 0,34$ pg/mL).

Após 48 horas de infecção, foi constatado aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis induzidos pela cepa LbR ($2,13 \pm 0,47$ pg/mL) em relação aos induzidos pela cepa LbS ($0,81 \pm 0,07$ pg/mL).

Com 72 horas após a infecção, não foram observados aumentos significativos nos níveis induzidos pelas cepas LbR e LbS. Quando analisado os dados da citocina IL-10, foi observado que a cepa LbS ($84,59 \pm 3,88$ pg/mL) induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos valores induzidos pela cepa LbR ($37,78 \pm 5,41$ pg/mL).

Após 48 horas, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores induzidos pela cepa LbR ($38,71 \pm 4,26$ pg/mL) em relação aos níveis induzidos pela cepa LbS

Figura 10 – Quantificação da produção de IL-4 e IL-10 por macrófagos infectados com *L. braziliensis* resistente e suscetível, após 24, 48 e 72 horas dos estímulos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os sobrenadantes resultantes da infecção de macrófagos por *L. braziliensis* resistente e suscetível foram coletados após 24, 48 e 72 horas de estímulos e utilizados para a dosagem de IL-4 e IL-10. Os valores representam média aritmética \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. Legenda: IL-4 = Interleucina 4; IL-12 = Interleucina 12; *Leishmania braziliensis* resistente (LbR); *Leishmania braziliensis* suscetível (LbS).

(14,93 \pm 1,49 pg/mL).

Com 72 horas após a infecção, foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) nos níveis de IL-10 induzidos pela cepa LbR (10,99 \pm 1,45 pg/mL) em relação aos valores induzidos pela cepa LbS (4,66 \pm 1,63 pg/mL).

6 DISCUSSÃO

A resposta imune é crucial para controlar a infecção por leishmaniose e evitar que a doença evolua para uma forma crônica. A intensidade da resposta imune e a capacidade do organismo de controlar a infecção podem ser influenciadas pelos eventos iniciais. O objetivo deste trabalho foi comparar a resposta imune, através da análise da carga parasitária, produção de mediadores do estresse oxidativo e o perfil de citocinas em macrófagos após a infecção por cepa de *L. braziliensis* resistente e suscetível ao antimoniato de meglumina nas primeiras horas da infecção.

Foi avaliada inicialmente a carga parasitária de macrófagos, após infecção pelas cepas de *L. braziliensis* resistente e suscetível, nos tempos de 24, 48 e 72h. Os resultados mostraram que após 24 horas de infecção, não houve diferença significativa entre a carga parasitária dos macrófagos infectados com as cepas resistente ou suscetível, indicando que ambas cepas conseguiram resistir e sobreviver nas primeiras horas da infecção, o que sugere um mecanismo de evasão do parasita, tornando a infecção inicial “silenciosa” e, portanto, evitando que os parasitas fossem alvos mais fáceis para a célula hospedeira. Entretanto, isso mudou com o tempo, uma vez que com 48 e 72h pós-infecção, a carga parasitária da cepa resistente apresentou aumento significativo em relação à da cepa suscetível. O oposto foi observado com a cepa suscetível, que apresentou redução significativa na sua carga parasitária na linha dos tempos analisados.

Apesar deste trabalho ter utilizado um modelo *in vitro*, tendo apenas a célula hospedeira e o parasito no ambiente trabalhado, os resultados deste estudo corroboram com dados já descritos na literatura que sugerem que os mecanismos desencadeados no início da infecção por *Leishmania*, caracterizada como “fase silenciosa”, parecem ser decisivos na progressão da doença, uma vez que os parasitas ao serem menos detectados, teriam mais chance de serem bem sucedidos no estabelecimento da infecção. Sugere-se também que existe um limite de infecção dos macrófagos ou de parasitos liberados no meio extracelular para desencadear a resposta imunológica e o surgimento da úlcera (BELKAID *et al.*, 2000).

Como os dados iniciais com a carga parasitária poderiam estar relacionados a um conjunto de fatores que envolvem o equilíbrio entre a indução de um ambiente rico em citocinas com características pró ou anti-inflamatórias e a mediadores do estresse oxidativo, que são normalmente produzidos por macrófagos, após infecção por *Leishmania*, o segundo e terceiro passos do trabalho foi avaliar o perfil de citocinas inflamatórias e pró-inflamatórias e os marcadores de

oxidação e antioxidantes.

Foi observado que com 24 horas após a infecção, a cepa resistente induziu um ambiente com aumento significativo nos níveis de TNF- α , IL-12, IL-4 e catalase em comparação com a cepa suscetível, que por sua vez, induziu um ambiente com níveis significativamente mais elevados de IL-10 e NO, quando comparada à cepa resistente. As citocinas TNF- α e IL-12 são descritas na literatura como apresentando características pró-inflamatórias. O TNF- α é produzido por macrófagos e linfócitos. A produção das citocinas TNF- α e IFN- γ , por células Th1, favorece o recrutamento e a ativação de macrófagos para o perfil de macrófagos M1. A IL-12, por sua vez, é capaz de atuar na promoção da atividade das células Th1, podendo também desempenhar um papel importante na ativação de macrófagos, o que é crucial para o controle da infecção por *Leishmania* (LIU; UZONNA, 2012; SANTOS *et al.*, 2017).

Sabe-se que tanto a fagocitose quanto as citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-1 conseguem estimular os macrófagos, causando um ambiente microbicida e pró-inflamatório, com síntese de EROS e NO, promovendo uma explosão oxidativa, o que é tóxico para o parasita, podendo promover a sua morte e reduzir a carga parasitária (UZONNA *et al.*, 2004; BRONTE; MURRAY, 2015). Entretanto, esse comportamento não foi observado na análise da cepa resistente. Embora tenha induzido um ambiente com níveis mais altos de citocinas pró-inflamatórias, a cepa resistente não apresentou diferença significativa na carga parasitária em comparação à cepa suscetível. Mas surgem dois outros eventos nas primeiras 24 horas da infecção nos ambientes com a cepa resistente e suscetível que foram os significativos níveis de IL-4 no ambiente com a cepa resistente e IL-10 no ambiente com a cepa suscetível.

A IL-10 é descrita como uma das principais citocinas reguladoras na leishmaniose humana (CARVALHO *et al.*, 1994; BACELLAR *et al.*, 2002; GAUTAM *et al.*, 2011). Embora a IL-10 esteja relacionada à persistência e disseminação do parasito (BOMFIM *et al.*, 1996; ANDERSON *et al.*, 2008), esta citocina também desempenha um papel importante na regulação da resposta inflamatória associada à patologia (COSTA *et al.*, 2009; GAUTAM *et al.*, 2011). Os macrófagos estão entre as principais fontes de IL-10 após a estimulação com lipopolissacarídeos (LPS) e células T (CD4+) perfil Th2 (WONG *et al.*, 2012). Por tanto, o aumento da expressão de IL-10 dos macrófagos, no presente trabalho, pode ter duas explicações. Como os macrófagos são as principais células responsáveis pela eliminação da *Leishmania*, o aumento dos níveis de IL-10 pode ser um mecanismo de escape do parasito à defesa da célula hospedeira, uma vez que IL-10 inibe a explosão respiratória e a produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- α ,

pelos macrófagos.

Alternativamente, a produção de IL-10 pode representar uma tentativa dos macrófagos de reduzir os danos patológicos ocasionados pela resposta inflamatória (CYKTOR; TURNER, 2011; POLARI *et al.*, 2019). Além disso, o fato de IL-10 induzir uma diminuição na produção de IL-12 e TNF- α por macrófagos ativados, pode promover um efeito estimulatório, fazendo com que as células T CD4 se desenvolvam para um perfil Th2, reduzindo a atividade microbicida dos macrófagos (SALHI *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2014; ROATT *et al.*, 2022).

A citocina IL-4 tem como uma importante função a capacidade de promover uma resposta Th2, estimulando a produção de outras citocinas de caráter anti-inflamatório, como a IL-10. Com isso, tanto a IL-10 quanto a IL-4 ajudam a controlar as respostas inflamatórias excessivas observadas na infecção por *Leishmania*, prevenindo danos teciduais que poderiam ocorrer durante uma resposta imune intensa. Assim, citocinas anti-inflamatórias vão antagonizar os efeitos promovidos pelas citocinas pró-inflamatórias (ANTONELLI *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2006; SALHI *et al.*, 2008; CARDOSO *et al.*, 2015; HURDAYAL; BROMBACHER, 2017; DOMBROWICZ, 2022).

Além disso, nas primeiras 24h, a cepa suscetível também induziu um aumento significativo de NO em relação ao grupo controle, mas não em relação à cepa resistente, que por sua vez, induziu mais catalase. O NO recebe um destaque na literatura como um relevante composto microbicida com papel reconhecido na imunidade inata, inclusive contra *Leishmania*, sendo considerado por diversos autores, como uma molécula-chave da resposta imune do hospedeiro (CASTRO-PINTO *et al.*, 2014; FONSECA-GEIGEL, 2000; KIMA, 2007).

De acordo com um estudo conduzido por Castro-Pinto *et al.* (2014), foi observado que em condições *in vitro*, formas evolutivas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* apresentaram resistência a altas concentrações de NO. Utilizando uma série de testes com promastigotas e amastigotas expostas a diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP), um doador químico de NO, constatou-se que embora haja toxicidade desses parasitos em resposta às doses crescentes do composto, as formas amastigotas, responsáveis por manter a infecção e enfrentar um ambiente fagossomal hostil dentro da célula hospedeira, são significativamente mais resistentes ao NO do que as promastigotas (FONSECA-GEIGEL, 2000; GENESTRA, 2007).

Além disso, a *Leishmania* é capaz de agir na via metabólica da L-arginina, sendo este um aminoácido essencial para o crescimento do parasito. Experimentos realizados em meios sem

a presença de L-arginina foram incapazes de suportar a multiplicação dos parasitas, indicando uma dependência dessa molécula por esses organismos (CAMARGO *et al.*, 1978; KRASSNER; FLORY, 1971). Desta forma, a L-arginina tem uma função importante na modulação da resposta imune do hospedeiro, pois o parasito é capaz de usar as enzimas óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e arginase para manipular o metabolismo da L-arginina dentro dos macrófagos.

A enzima iNOS atua usando a L-arginina como substrato para produzir óxido nítrico (NO), uma molécula tóxica para a *Leishmania*. Com isso, pode-se considerar a hipótese de que o parasito esteja reduzindo a quantidade de L-arginina disponível para a iNOS da célula hospedeira, uma vez que ocorre uma competição pelo substrato entre a enzima produzida pelo macrófago e o parasito. Essa competição pode levar a uma diminuição na produção de NO pela via induzida da iNOS, o que é benéfico ao parasito, pois ele não apenas diminui os níveis nocivos de NO, mas também se beneficia do substrato para produzir seu próprio NO e gerar guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (PELUFFO *et al.*, 2004).

É importante mencionar também que durante uma infecção por *Leishmania*, a produção de óxido nítrico (NO) pode ser inibida por citocinas de perfil Th2, como o IL-4, e estimular a via bioquímica da arginase. A arginase é capaz de converter a L-arginina em ornitina e ureia, diminuindo assim a quantidade disponível desse aminoácido no ambiente intracelular. Como essa enzima utiliza o mesmo substrato utilizado na síntese do NO (L-arginina), isso pode promover, como resultado de sua ação, uma regulação negativa na produção de NO. Além disso, os produtos metabólitos finais da ação da arginase são poliaminas utilizadas pelo parasito para sua multiplicação e crescimento (PELUFFO *et al.*, 2004; VINCENDEAU *et al.*, 2003). Portanto, a regulação equilibrada entre iNOS e arginase pode ser crucial para o controle adequado da infecção por *Leishmania*.

Nesse sentido, é possível sugerir que os níveis mais altos de IL-4 desencadeada pela infecção pela cepa resistente nos macrófagos, nas primeiras 24h de infecção, pode ter operado como um mecanismo inicial de defesa. Tal resposta imune pode ter estimulado uma expressão mais acentuada de arginase nos macrófagos, aumentando o consumo de L-arginina (substrato essencial para a síntese de NO). Como resultado, os níveis de NO produzidos podem ter se revelado insuficientes para eliminar o parasito. Por outro lado, a arginase também pode ter produzido poliaminas como metabólitos finais, os quais podem ter sido aproveitados pelo parasito para seu desenvolvimento.

Além disso, os níveis mais altos da enzima catalase pela cepa resistente nos 3

tempos avaliados pode representar um fator crucial para sua sobrevivência. Afinal, essa enzima antioxidante é capaz de metabolizar o peróxido de hidrogênio, um intermediário oxigenado tóxico produzido pelos macrófagos, constituindo-se como uma segunda linha de defesa para o parasito (SÁDLOVÁ *et al.*, 2021). Nesse contexto, a catalase produzida no ambiente com a cepa resistente pode ter dificultado, ainda mais, a morte do parasito. Desta forma, isso pode explicar o fato da carga parasitária dos macrófagos infectados com as cepas resistente e suscetível não terem apresentado uma alteração significativa entre elas, nas primeiras 24 horas de infecção.

Com 48h de infecção, foi observado outro cenário, ou seja, um aumento significativo na carga parasitária dos macrófagos infectados com a cepa resistente em comparação com aqueles infectados com a cepa suscetível, e uma inversão do perfil inflamatório inicial, com significantes níveis de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, juntamente com aumento significativo de catalase em comparação com a cepa suscetível e o controle. Em contrapartida, a cepa suscetível induziu significantes níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12, além de maiores níveis de NO quando comparada com a cepa resistente e o controle. A cepa susceptível também induziu um aumento significativo de catalase em relação ao controle.

O fato da cepa resistente permanecer induzindo maiores níveis da enzima catalase e de IL-4 em relação aos induzidos pela cepa suscetível, pode indicar maior proteção da cepa resistente contra os efeitos citotóxicos das células hospedeiras, como a ação oxidativa do peróxido de hidrogênio e da produção de NO, mediadores capazes de ocasionar sua morte. Essa lógica também pôde ser refletida ao se analisar a carga parasitária de macrófagos infectados com a cepa resistente, uma vez que se observou carga parasitária maior nestes macrófagos ao serem comparados com aqueles referentes tanto aos tempos de 24h e 48h de infecção. Isso também corrobora com a proposta de inversão do perfil inflamatório por parte da cepa resistente. Desta forma, a cepa resistente passa a aumentar sua carga parasitária e, conseqüentemente, sua taxa de sobrevivência, já que a pressão ocasionada pelos agentes inflamatórios e leishmanicidas são menores em relação às primeiras 24h de infecção.

Vale ainda ressaltar que a citocina IL-4 manteve seus níveis significativamente mais elevados na infecção pela cepa resistente, independente do tempo. Estes resultados corroboram com os encontrados em um estudo *in vivo*, onde foi mostrado que esta mesma cepa induz altos níveis de IL-4 e isso foi associado também à diminuição da produção de NO no local da lesão (COSTA *et al.*, 2011). IL-4 é um potente ativador da enzima arginase I (Arg I), que compete com iNOS pela L-arginina utilizada para a síntese de NO, em macrófagos. Ao consumir L-arginina,

Arg I diminui a disponibilidade desse substrato para a iNOS, resultando em menor produção de NO e inibição da inflamação (MUNDER, 2009). Além disso, tanto IL-4 como IL-10 também induzem a polarização para macrófagos M2 (PEREIRA, 2018).

Fato oposto aconteceu com a cepa suscetível que, 48 horas após a infecção, passou a induzir um ambiente pró-inflamatório, apresentando um aumento significativo nos níveis das citocinas TNF- α e IL-12 em relação aos induzidos pela cepa resistente. Também foi observado uma redução dos níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 e um aumento significativo de NO, tanto em relação aos induzidos pela cepa resistente quanto aos do controle. Desta forma, o aumento de citocinas pró-inflamatórias associado a elevação dos níveis de NO podem ter contribuído para o desenvolvimento de um ambiente tóxico para a cepa suscetível e isso pode ter prejudicado a sua capacidade de se reproduzir, além de ter reduzido a sua taxa de sobrevivência dentro dos macrófagos.

Com 72 horas do estímulo inicial, foi observado que os macrófagos infectados com a cepa resistente continuaram com sua carga parasitária significativamente maior do que a da cepa suscetível. Fato oposto foi observado nos macrófagos infectados com a cepa suscetível, que apresentavam redução ainda mais significante da sua carga parasitária, tanto em relação ao período de 48h quanto ao de 72h. Além disso, foi observado ainda que com 72h de infecção, o ambiente com características anti-inflamatórias induzido pela cepa resistente permaneceu, mostrando significantes níveis de IL-10 e catalase em relação aos induzidos pela cepa suscetível. Vale destacar ainda que com 72h, os níveis de GSH, MDA e NO, induzidos pela cepa resistente não apresentaram níveis significantes em relação aos induzidos pela cepa suscetível e o controle. Por outro lado, a cepa suscetível manteve-se em um ambiente pró-inflamatório, com aumento significativo nos níveis de TNF-, IL-12 e baixos níveis de IL-10, em comparação à cepa resistente. Observou-se, ainda, aumento significativo nos níveis de SOD e NO, induzidos pela cepa suscetível, mas apenas quando comparados ao controle.

Esses dados podem indicar que a cepa resistente continuou apropriadamente induzindo a persistência de um ambiente anti-inflamatório que seria favorável ao seu crescimento e sobrevivência. Essa hipótese é suportada pela análise da carga parasitária no tempo correspondente a 72h de infecção, na qual foi observado aumento significativo na carga parasitária nos macrófagos infectados com a cepa resistente em relação aqueles infectados com a cepa suscetível.

A cepa suscetível, por sua vez, continuou induzindo um ambiente pró-inflamatório,

caracterizado pela permanência de um aumento nos níveis das citocinas de caráter pró-inflamatório e uma redução dos níveis de IL-10. Desta forma, embora tenha sido observado um aumento significativo da enzima antioxidante SOD em relação apenas ao controle, o ambiente da cepa suscetível continuou desfavorável ao seu crescimento. Este fato foi corroborado ao ser analisado a carga parasitária, que foi decaindo com o tempo de infecção. Esses resultados podem estar associados a dois fatores: em primeiro lugar, a manutenção de níveis elevados de NO em relação ao controle nos três tempos avaliados, e; em segundo lugar, a presença de níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias quando comparadas com os induzidos pela cepa resistente, juntamente com a indução de níveis baixos de IL-10. Isso pode ter contribuído para a redução das chances de sobrevivência da cepa suscetível, uma vez que houve uma impulsão das atividades microbicidas, tornando estes parasitas mais vulneráveis à ação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e radicais livres.

Em conjunto, os resultados deste trabalho sugerem que a cepa resistente ao antimonio de meglumina pode induzir a modulação de citocinas e marcadores do estresse oxidativo, aumentando enzimas antioxidantes e induzindo o decaimento de citocinas pró-inflamatórias e a persistência de IL-4, proporcionando um ambiente mais permissivo à sua sobrevivência e à persistência da doença por mais tempo.

7 CONCLUSÕES

A cepa resistente induziu carga parasitária menor nas primeiras 24 horas do que com 48 e 72 horas de infecção, sugerindo uma evolução mais silenciosa no início, o que pode evitar a contenção da infecção e conseqüentemente, dar mais chance de ser bem-sucedida no estabelecimento da infecção.

Os dados deste trabalho também sugerem que a cepa resistente induziu precocemente um ambiente com citocinas inflamatórias, mas foi amenizado por níveis altos de IL-4, permitindo sua sobrevivência, e mais tarde esse ambiente foi revertido para um ambiente imunologicamente mais regulatório, com níveis altos de IL-4 e IL-10, e, portanto, mais permissivo à sua sobrevivência, além da resistência ao NO, podendo levar à persistência da doença por mais tempo, dificultando assim o tratamento.

Fato oposto foi observado com a cepa suscetível, que inicialmente induziu um ambiente com predomínio da citocina IL-10, de caráter anti-inflamatório, e com o tempo, após a indução da mudança de perfil anti-inflamatório para inflamatório, com aumento das citocinas TNF- α e IL-12, e mediadores como SOD e NO, esta cepa passou a decair seu crescimento intracelular.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, é possível utilizar as informações adquiridas para orientar futuras investigações que envolvam o trabalho direto com macrófagos de perfis M1 e M2 e a infecção com cepas resistentes e susceptíveis de *Leishmania braziliensis*. Essa abordagem permitirá confirmar os resultados do presente trabalho e aprofundar a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imune à infecção por cepas de *Leishmania braziliensis* resistentes, o que pode levar a novas estratégias terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- AISSAOUI, N.; HAMANE, S.; GITS-MUSELLI, M.; PETIT, A.; BENDERDOUCHE, M.; DENIS, B.; ALANIO, A.; DELLIÈRE, S.; BAGOT, M.; BRETAGNE, S. Imported leishmaniasis in travelers: a 7-year retrospective from a parisian hospital in france. **BMC Infectious Diseases**, BioMed Central Ltd, v. 21, 12 2021. ISSN 14712334.
- AMATO, V. S.; TUON, F. F.; BACHA, H. A.; NETO, V. A.; NICODEMO, A. C. Mucosal leishmaniasis: current scenario and prospects for treatment. **Acta tropica**, Elsevier, v. 105, n. 1, p. 1–9, 2008.
- ANDERSON, C. F.; LIRA, R.; KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; WYNN, T. A.; SACKS, D. IL-10 and $\text{tgf-}\beta$ control the establishment of persistent and transmissible infections produced by leishmania tropica in c57bl/6 mice. **The journal of immunology**, American Association of Immunologists, v. 180, n. 6, p. 4090–4097, 2008.
- ANTONELLI, L. R.; DUTRA, W. O.; ALMEIDA, R. P.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M.; GOLLOB, K. J. Activated inflammatory t cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology letters**, Elsevier, v. 101, n. 2, p. 226–230, 2005.
- BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; JESUS, A. R. de; DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J.; CARVALHO, E. M. Up-regulation of th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6734–6740, 12 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.70.12.6734-6740.2002>.
- BAJÉNOFF, M.; BREART, B.; HUANG, A. Y.; QI, H.; CAZARETH, J.; BRAUD, V. M.; GERMAIN, R. N.; GLAICHENHAUS, N. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. **The Journal of experimental medicine**, Rockefeller University Press, v. 203, n. 3, p. 619–631, 2006.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. d. C. G.; PAULA, S. O. D.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, SciELO Brasil, v. 23, p. 629–643, 2010.
- BARROS, M. F. R. d. Parasitas e resposta imunitária: a ação da resposta inata. 2016.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, Elsevier, v. 44, n. 1, p. 276–287, 1971.
- 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**, American Association of Immunologists, v. 165, n. 2, p. 969–977, 2000.
- BENALI, I.; BOUTIBA, Z.; MERABET, A.; CHÈVRE, N. Integrated use of biomarkers and condition indices in mussels (*mytilus galloprovincialis*) for monitoring pollution and development of biomarker index to assess the potential toxic of coastal sites. **Marine Pollution Bulletin**, Elsevier, v. 95, n. 1, p. 385–394, 2015.
- BERMAN, J.; EDWARDS, N.; KING, M.; GROGL, M. Biochemistry of pentostam resistant leishmania. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 40, n. 2, p. 159–164, 1989.

BLUM, J.; DESJEUX, P.; SCHWARTZ, E.; BECK, B.; HATZ, C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford University Press, v. 53, n. 2, p. 158–166, 2004.

BOMFIM, G.; NASCIMENTO, C.; COSTA, J.; CARVALHO, E. M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Experimental parasitology**, Elsevier, v. 84, n. 2, p. 188–194, 1996.

BRASIL, . Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde do. **Leishmaniose Tegumentar (LT)**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-tegumentar-lt>. Acessado em 04/11/2021.

BRASIL, M. d. S. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. [S. l.]: Ministério da Saúde Brasília, 2017.

BRONTE, V.; MURRAY, P. J. Understanding local macrophage phenotypes in disease: modulating macrophage function to treat cancer. **Nature medicine**, Nature Publishing Group, v. 21, n. 2, p. 117–119, 2015.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, Lancet Publishing Group, v. 392, p. 951–970, 9 2018. ISSN 01406736. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673618312042>.

CAMARGO, E. P.; COELHO, J.; MORAES, G.; FIGUEIREDO, E. N. Trypanosoma spp., leishmania spp. and leptomonas spp.: enzymes of ornithine-arginine metabolism. **Experimental Parasitology**, Elsevier, v. 46, n. 2, p. 141–144, 1978.

CARDOSO, T. M.; MACHADO, Á.; COSTA, D. L.; CARVALHO, L. P.; QUEIROZ, A.; MACHADO, P.; SCOTT, P.; CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. Protective and pathological functions of cd8+ t cells in leishmania braziliensis infection. **Infection and immunity**, Am Soc Microbiol, v. 83, n. 3, p. 898–906, 2015.

CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R. L.; REED, S. G. Restoration of ifn-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 152, n. 12, p. 5949–5956, 1994.

CARVALHO, L. M.; GUSMÃO, M. R.; COSTA, A. F. P.; BRITO, R. C. F. de; AGUIAR-SOARES, R. D. de O.; CARDOSO, J. M. de O.; REIS, A. B.; CARNEIRO, C. M.; ROATT, B. M. Immunochemotherapy for visceral leishmaniasis: combinatorial action of miltefosine plus lbsapmpl vaccine improves adaptative th1 immune response with control of splenic parasitism in experimental hamster model. **Parasitology**, Cambridge University Press, v. 149, n. 3, p. 371–379, 2022.

CASTRO-PINTO, D.; FABRINO, D.; LEON, L. A importância de radicais livres durante a infecção por protozoários do gênero leishmania. 1. **Rio de Janeiro, RJ, Brasil: Editora FIOCRUZ**, v. 512, 2014.

CEARÁ, G. d. E. d. C. Secretaria de Saúde do. **Boletim Epidemiológico Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2021. Disponível em: https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2018/06/boletim_epidemiologico_leishmaniose_tegumentar_americana_n1_20212202.pdf. Acessado em 08/11/2021.

- CECILIO, P.; PÉREZ-CABEZAS, B.; SANTARÉM, N.; MACIEL, J.; RODRIGUES, V.; SILVA, A. Cordeiro da. Deception and manipulation: The arms of leishmania, a successful parasite. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 480, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00480>.
- CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Natural product reports**, Royal Society of Chemistry, v. 18, n. 6, p. 674–688, 2001.
- CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in leishmania. **Journal of Parasitic Diseases**, Springer, v. 34, n. 1, p. 1–13, 2010.
- CONCEICAO, J.; DAVIS, R.; CARNEIRO, P. P.; GIUDICE, A.; MUNIZ, A. C.; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. Characterization of neutrophil function in human cutaneous leishmaniasis caused by leishmania braziliensis. **PLoS neglected tropical diseases**, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 10, n. 5, p. e0004715, 2016.
- CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do continente americano**. [S. l.]: Editora Fiocruz, 2014.
- COSTA, D. L.; CARREGARO, V.; LIMA-JÚNIOR, D. S.; SILVA, N. M.; MILANEZI, C. M.; CARDOSO, C. R.; GIUDICE, Â.; JESUS, A. R. de; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P. *et al.* Balb/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of leishmania braziliensis present severe lesions due to il-4 production. **PLoS neglected tropical diseases**, Public Library of Science San Francisco, USA, v. 5, n. 3, p. e965, 2011.
- COSTA, G. C.; ROCHA, M. O. da C.; MOREIRA, P. R.; MENEZES, A. S.; SILVA, M. R.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Functional il-10 gene polymorphism is associated with chagas disease cardiomyopathy. **The Journal of infectious diseases**, The University of Chicago Press, v. 199, n. 3, p. 451–454, 2009.
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, Am Soc Microbiol, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.
- CRUVINEL, W. d. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. d.; SILVA, N. P. d.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário: Parte i. fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, SciELO Brasil, v. 50, p. 434–447, 2010.
- CUTOLO, A. A.; MOTOIE, G.; MENZ, I.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Persistent cutaneous canine leishmaniasis caused by leishmania (viannia) braziliensis in an area with predominance of nyssomyia neivai in the state of são paulo, brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, FapUNIFESP (SciELO), v. 30, 2021. ISSN 0103-846X.
- CYKTOR, J. C.; TURNER, J. Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. **Infection and immunity**, Am Soc Microbiol, v. 79, n. 8, p. 2964–2973, 2011.
- DEREURE, J.; EL-SAFI, S. H.; BUCHETON, B.; BONI, M.; KHEIR, M. M.; DAVOUST, B.; PRATLONG, F.; FEUGIER, E.; LAMBERT, M.; DESSEIN, A. *et al.* Visceral leishmaniasis in eastern sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. **Microbes and infection**, Elsevier, v. 5, n. 12, p. 1103–1108, 2003.

DOMBROWICZ, D. Identification of major human ige-inducing parasite antigens: a path to therapeutic approaches? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Elsevier, v. 150, n. 6, p. 1412–1414, 2022.

DUBIE, T.; MOHAMMED, Y. Review on the role of host immune response in protection and immunopathogenesis during cutaneous leishmaniasis infection. **Journal of Immunology Research**, Hindawi Limited, v. 2020, p. 1–12, 6 2020. ISSN 2314-8861. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2020/2496713/>.

ELMAHALLAWY, E. K.; MARTINEZ, A. S.; RODRIGUEZ-GRANGER, J.; HOYOS-MALLECOT, Y.; AGIL, A.; MARI, J. M. N.; FERNANDEZ, J. G. Diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, Journal of Infection in Developing Countries, v. 8, p. 961–972, 8 2014. ISSN 1972-2680. Disponível em: <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/25116660>.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. **Annual review of microbiology**, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 46, n. 1, p. 695–729, 1992.

FEIJÓ, D.; TIBÚRCIO, R.; AMPUERO, M.; BRODSKYN, C.; TAVARES, N. Dendritic cells and leishmania infection: adding layers of complexity to a complex disease. **Journal of immunology research**, Hindawi, v. 2016, 2016.

FONSECA-GEIGEL, L. A via do oxido nitrico em leishmania amazonensis. **MSci Thesis. Oswaldo Cruz Foundation, Brazil**, 2000.

GAUTAM, S.; KUMAR, R.; MAURYA, R.; NYLÉN, S.; ANSARI, N.; RAI, M.; SUNDAR, S.; SACKS, D. Il-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford University Press, v. 204, n. 7, p. 1134–1137, 2011.

GENESTRA, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Cellular signalling**, Elsevier, v. 19, n. 9, p. 1807–1819, 2007.

GENESTRA, M.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; GUEDES-SILVA, D.; LEON, L. L. Effect of l-arginine analogs and a calcium chelator on nitric oxide (no) production by leishmania sp. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, Taylor & Francis, v. 18, n. 5, p. 445–452, 2003.

GENESTRA, M.; SOUZA, W. J. S. de; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L. L. Comparative analysis of the nitric oxide production by leishmania sp. **Medical microbiology and immunology**, Springer, v. 192, p. 217–223, 2003.

GOMES, C.; AVILA, L.; PINTO, S.; DUARTE, F.; PEREIRA, L.; ABRAHAMSOHN, I.; DORTA, M.; VIEIRA, L.; RIBEIRO-DIAS, F.; OLIVEIRA, M. Leishmania braziliensis amastigotes stimulate production of il-1 β , il-6, il-10 and tgf- β by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residents. **Parasite immunology**, Wiley Online Library, v. 36, n. 5, p. 225–231, 2014.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, Expert Reviews Ltd., v. 8, p. 419–433, 4 2010. ISSN 1478-7210. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eri.10.19>.

- GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15n] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, Elsevier, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.
- GUIMARÃES-COSTA, A. B.; NASCIMENTO, 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**, National Acad Sciences, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 2009.
- HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Molecular biology international**, Hindawi, v. 2011, 2011.
- HEINZEL, F.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R.; ROSSER, L.; GATELY, M. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with leishmania major. **Journal of Experimental Medicine**, The Rockefeller University Press, v. 177, n. 5, p. 1505–1509, 1993.
- HSIAO, C.-H. C.; UENO, N.; SHAO, J. Q.; SCHROEDER, K. R.; MOORE, K. C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of leishmania. **Microbes and infection**, Elsevier, v. 13, n. 12-13, p. 1033–1044, 2011.
- HURDAYAL, R.; BROMBACHER, F. Interleukin-4 receptor alpha: from innate to adaptive immunity in murine models of cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, Frontiers Media SA, v. 8, p. 1354, 2017.
- JAMES, E. Superoxide dismutase. **Parasitology Today**, Elsevier Current Trends, v. 10, n. 12, p. 481–484, 1994.
- JAYARAMAN, A.; SRINIVASAN, S.; KAR, A.; HARISH, B.; RAJA, M. R. C.; UPPULURI, K. B.; MAHAPATRA, S. K. Oceanimonas sp. bpms22-derived protein protease inhibitor induces anti-leishmanial immune responses through macrophage m2 to m1 repolarization. **International Immunopharmacology**, Elsevier, v. 112, p. 109281, 2022.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, Nature Publishing Group, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- KIMA, P. E. The amastigote forms of leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International journal for parasitology**, Elsevier, v. 37, n. 10, p. 1087–1096, 2007.
- KRASSNER, S. M.; FLORY, B. Essential amino acids in the culture of leishmania tarentolae. **The Journal of Parasitology**, JSTOR, p. 917–920, 1971.
- KUPANI, M.; PANDEY, R. K.; MEHROTRA, S. Neutrophils and visceral leishmaniasis: Impact on innate immune response and cross-talks with macrophages and dendritic cells. **Journal of Cellular Physiology**, Wiley-Liss Inc., v. 236, p. 2255–2267, 4 2021. ISSN 0021-9541. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.30029>.
- LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; MATTA, V. L. R. da; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit leishmania (leishmania) infantum chagasi to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 296–300, 9 2013. ISSN 03044017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401713001623>.

- LEÓN, B.; LÓPEZ-BRAVO, M.; ARDAVÍN, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective t helper 1 responses against leishmania. **Immunity**, Elsevier, v. 26, n. 4, p. 519–531, 2007.
- LIBURKIN-DAN, T.; SCHLISSELBERG, D.; FISCHER-WEINBERGER, R.; PESCHER, P.; INBAR, E.; EPHROS, M.; RENTSCH, D.; SPÄTH, G. F.; ZILBERSTEIN, D. Stage-specific expression of the proline-alanine transporter in the human pathogen leishmania. **Molecular and biochemical parasitology**, Elsevier, v. 222, p. 1–5, 2018.
- LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, Frontiers, v. 2, p. 83, 2012.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, Oxford University Press, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.
- MENDES, C. S.; COELHO, A. B.; FÉRES, J. G.; SOUZA, E. C. de; CUNHA, D. A. da. Impacto das mudanças climáticas sobre a leishmaniose no brasil. **Ciência Saúde Coletiva**, Associação Brasileira de Pós - Graduação em Saúde Coletiva, v. 21, p. 263–272, 1 2016. ISSN 1413-8123. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232016000100263&lng=pt&tlng=pt.
- MENEZES, J. P. B. de; GUEDES, C. E. S.; PETERSEN, A. L. d. O. A.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed research international**, Hindawi, v. 2015, 2015.
- MONTALVO, A. M.; FRAGA, J.; MONZOTE, L.; GARCÍA, M.; FONSECA, L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del adn. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, 1999, Editorial Ciencias Médicas, v. 64, n. 2, p. 108–131, 2012.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, Nature Publishing Group UK London, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.
- MUNDER, M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. **British journal of pharmacology**, Wiley Online Library, v. 158, n. 3, p. 638–651, 2009.
- MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; PAULA-COELHO, V. N. de. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and tnf- α production, but only via tnf- α it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. **International immunopharmacology**, Elsevier, v. 8, n. 12, p. 1633–1638, 2008.
- MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews immunology**, Nature Publishing Group, v. 11, n. 11, p. 723–737, 2011.
- MUXEL, S. M.; LARANJEIRA-SILVA, M. F.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M. Leishmania (leishmania) amazonensis induces macrophage mir-294 and mir-721 expression and modulates infection by targeting nos2 and l-arginine metabolism. **Scientific reports**, Nature Publishing Group, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2017.
- NORDENFELT, P.; TAPPER, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. **Journal of leukocyte biology**, Wiley Online Library, v. 90, n. 2, p. 271–284, 2011.

OLEKHNOVITCH, R.; RYFFEL, B.; MÜLLER, A. J.; BOUSSO, P. *et al.* Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during leishmania infection. **The Journal of clinical investigation**, Am Soc Clin Investig, v. 124, n. 4, p. 1711–1722, 2014.

PARISI, L.; GINI, E.; BACI, D.; TREMOLATI, M.; FANULI, M.; BASSANI, B.; FARRONATO, G.; BRUNO, A.; MORTARA, L. Macrophage polarization in chronic inflammatory diseases: killers or builders? **Journal of immunology research**, Hindawi, v. 2018, 2018.

PELUFFO, G.; PIACENZA, L.; IRIGOIN, F.; ALVAREZ, M. N.; RADI, R. L-arginine metabolism during interaction of trypanosoma cruzi with host cells. **Trends in parasitology**, Elsevier, v. 20, n. 8, p. 363–369, 2004.

PEREIRA, M. B.; SYDOR, B. G.; MEMARE, K. G.; SILVEIRA, T. G. V.; ARISTIDES, S. M. A.; DALMARCO, E. M.; TEIXEIRA, J. J. V.; LONARDONI, M. V. C.; DEMARCHI, I. G. In vivo efficacy of meglumine antimoniate-loaded nanoparticles for cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Nanomedicine**, Future Medicine, v. 16, n. 17, p. 1505–1518, 2021.

PEREIRA, N. V. **Macrófagos polarizados M2 na resposta tecidual das lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar americana**. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2018.

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**, American Association for the Advancement of Science, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2008.

PETRITUS, P. M.; ALMEIDA, D. Manzoni-de; GIMBLET, C.; LOMBANA, C. G.; SCOTT, P. Leishmania mexicana induces limited recruitment and activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells early during infection. Public Library of Science San Francisco, USA, 2012.

POLARI, L. P.; CARNEIRO, P. P.; MACEDO, M.; MACHADO, P. R.; SCOTT, P.; CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. Leishmania braziliensis infection enhances toll-like receptors 2 and 4 expression and triggers tnf- α and il-10 production in human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, Frontiers Media SA, v. 9, p. 120, 2019.

PRADELLA, G. D.; DUARTE, C. A.; ESCOBAR, T. A.; ZURAVSKI, L.; GÓSS, G. C.; SKUPIEN, J. A.; LÜBECK, I. Risk and protective factors of leishmaniasis in the rural area of the western border region of rio grande do sul, brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 17, p. 330, 12 2021. ISSN 1746-6148. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-021-03021-6>.

RAI, A. K.; THAKUR, C. P.; KUMAR, P.; SAINI, S.; KUREEL, A. K.; KUMARI, S.; SETH, T.; MITRA, D. K. Decrease in the frequency of circulating cd56+ cd161+ nk cells in human visceral leishmaniasis. **Immunological investigations**, Taylor & Francis, v. 47, n. 2, p. 125–134, 2018.

REGUERA, R. M.; BALAÑA-FOUCE, R.; SHOWALTER, M.; HICKERSON, S.; BEVERLEY, S. M. Leishmania major lacking arginase (arg) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible balb/c mice. **Molecular and biochemical parasitology**, Elsevier, v. 165, n. 1, p. 48–56, 2009.

RIBEIRO-GOMES, F.; ROMANO, A.; LEE, S.; ROFFE, E.; PETERS, N.; DEBRABANT, A.; SACKS, D. Apoptotic cell clearance of leishmania major-infected neutrophils by dendritic cells inhibits cd8+ t-cell priming in vitro by mer tyrosine kinase-dependent signaling. **Cell death & disease**, Nature Publishing Group, v. 6, n. 12, p. e2018–e2018, 2015.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; ROMA, E. H.; CARNEIRO, M. B.; DORIA, N. A.; SACKS, D. L.; PETERS, N. C. Site-dependent recruitment of inflammatory cells determines the effective dose of leishmania major. **Infection and immunity**, Am Soc Microbiol, v. 82, n. 7, p. 2713–2727, 2014.

RIBEIRO, M. D.; FERRAUDO, A. S.; ZAIA, J. E.; ANDRADE, M. Condições de saneamento como indicador epidemiológico para leishmaniose tegumentar americana na amazônia sul ocidental brasileira. **Vigilância Sanitária em Debate**, Vigilancia Sanitaria em Debate: Sociedade, Ciencia y Tecnologia, v. 5, p. 64, 5 2017. ISSN 2317-269X. Disponível em: <https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/912>.

ROATT, B. M.; CARDOSO, J. M. de O.; BRITO, R. C. F. de; REIS, L. E. S.; MOREIRA, G. J. L.; VIEIRA, P. M. de A.; SOUZA, F. M. de; LIMA, W. G. de; AGUIAR-SOARES, R. D. de O.; GIUNCHETTI, R. C. *et al.* Down regulation of il-10 and tgf- β 1 mrna expression associated with reduced inflammatory process correlates with control of parasitism in the liver after treating l. infantum infected dogs with the lbmpl vaccine therapy. **Cytokine**, Elsevier, v. 153, p. 155838, 2022.

ROCHAEL, N. C.; GUIMARÃES-COSTA, A. B.; NASCIMENTO, M. T.; DESOUZA-VIEIRA, T. S.; OLIVEIRA, M. P.; SOUZA, L. F. G. e; OLIVEIRA, M. F.; SARAIVA, E. M. Classical ros-dependent and early/rapid ros-independent release of neutrophil extracellular traps triggered by leishmania parasites. **Scientific reports**, Nature Publishing Group, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2015.

RODRIGUES, A. M.; HUEB, M.; SANTOS, T. A. R. R. d.; FONTES, C. J. F. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, SciELO Brasil, v. 39, p. 139–145, 2006.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, J.; WILKINS-RODRÍGUEZ, A. A.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L. Role of glutathione, ros, and bcl-xl in the inhibition of apoptosis of monocyte-derived dendritic cells by leishmania mexicana promastigotes. **Parasitology research**, Springer, v. 117, p. 1225–1235, 2018.

ROJAS, J.; SALAZAR, J.; MARTÍNEZ, M. S.; PALMAR, J.; BAUTISTA, J.; CHÁVEZ-CASTILLO, M.; GÓMEZ, A.; BERMÚDEZ, V. Macrophage heterogeneity and plasticity: impact of macrophage biomarkers on atherosclerosis. **Scientifica**, Hindawi, v. 2015, 2015.

RUIZ-POSTIGO, J. A.; JAIN, S.; MIKHAILOV, A.; MAIA-ELKHOORY, A. N.; VALADAS, S.; WARUSAVITHANA, S.; OSMAN, M.; LIN, Z.; BESHAN, A.; YAJIMA, A.; GASIMOV, E. **Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/>.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to leishmania major in mice. **Nature Reviews Immunology**, Nature Publishing Group, v. 2, n. 11, p. 845–858, 2002.

SÁDLOVÁ, J.; PODEŠVOVÁ, L.; BEČVÁŘ, T.; BIANCHI, C.; GERASIMOV, E. S.; SAURA, A.; GLANZOVÁ, K.; LEŠTINOVÁ, T.; MATVEEVA, N. S.; CHMELOVÁ, L. *et al.* Catalase

impairs leishmania mexicana development and virulence. **Virulence**, Taylor & Francis, v. 12, n. 1, p. 852–867, 2021.

SALDANHA, R. R. de; MARTINS-PAPA, M. C.; SAMPAIO, R. N. R.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I. Meglumine antimonate treatment enhances phagocytosis and $\text{tnf-}\alpha$ production by monocytes in human cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 106, n. 10, p. 596–603, 2012.

SALHI, A.; JR, V. R.; SANTORO, F.; DESSEIN, H.; ROMANO, A.; CASTELLANO, L. R.; SERTORIO, M.; RAFATI, S.; CHEVILLARD, C.; PRATA, A. *et al.* Immunological and genetic evidence for a crucial role of il-10 in cutaneous lesions in humans infected with leishmania braziliensis. **The Journal of Immunology**, American Association of Immunologists, v. 180, n. 9, p. 6139–6148, 2008.

SANS-FONS, M. G.; YERAMIAN, A.; PEREIRA-LOPES, S.; SANTAMARÍA-BABI, L. F.; MODOLELL, M.; LLOBERAS, J.; CELADA, A. Arginine transport is impaired in c57bl/6 mouse macrophages as a result of a deletion in the promoter of slc7a2 (cat2), and susceptibility to leishmania infection is reduced. **The Journal of infectious diseases**, Oxford University Press, v. 207, n. 11, p. 1684–1693, 2013.

SANTANA, W.; OLIVEIRA, S. S. C.; RAMOS, M. H.; SANTOS, A. L. S.; DOLABELLA, S. S.; SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; JAIN, S. Exploring innovative leishmaniasis treatment: Drug targets from pre-clinical to clinical findings. **Chemistry Biodiversity**, John Wiley and Sons Inc, v. 18, 9 2021. ISSN 1612-1872. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.202100336>.

SANTOS, J. B.; LAUAND, L.; SOUZA, G. S. de; MACÊDO, V. de O. Fatores sócio-econômicos e atitudes em relação à prevenção domiciliar da leishmaniose tegumentar americana, em uma área endêmica do sul da bahia, brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. 701–708, 9 2000. ISSN 0102-311X. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2000000300018&lng=pt&tlng=pt.

SANTOS, T. T.; MARTINS, V. T.; LAGE, D. P.; COSTA, L. E.; SALLES, B. C.; CARVALHO, A. M.; DIAS, D. S.; RIBEIRO, P. A.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; ÁVILA, R. A. Machado-de *et al.* Probing the efficacy of a heterologous leishmania/l. viannia braziliensis recombinant enolase as a candidate vaccine to restrict the development of l. infantum in balb/c mice. **Acta Tropica**, Elsevier, v. 171, p. 8–16, 2017.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, MDPI AG, v. 18, 6 2017. ISSN 14220067.

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, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, Nature Publishing Group, v. 16, p. 581–592, 9 2016. ISSN 1474-1733. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nri.2016.72>.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu. Rev. Immunol.**, Annual Reviews, v. 23, p. 197–223, 2005.

SERRA, V.; ZGLINICKI, T. von; LORENZ, M.; SARETZKI, G. Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. **Journal of Biological Chemistry**, ASBMB, v. 278, n. 9, p. 6824–6830, 2003.

SHEIKH, S.; AMIR, A.; AMIR, B. Leishmaniasis. In: _____. [S. l.: s. n.], 2020. ISBN 978-1-78985-901-0.

SHEIKH, S. S.; AMIR, A. A.; AMIR, B. A.; AMIR, A. A. **Leishmaniasis**. IntechOpen, 2020. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/parasitology-and-microbiology-research/leishmaniasis>.

SOUSA, A. Q.; POMPEU, M. M. L.; PEARSON, R. D. Disseminated cutaneous leishmaniasis, a patient with 178 lesions cured with fluconazole. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, American Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 94, p. 1–2, 1 2016. ISSN 0002-9637. Disponível em: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.15-0211>.

SOUZA, A. S.; GIUDICE, A.; PEREIRA, J. M.; GUIMARÃES, L. H.; JESUS, A. R. de; MOURA, T. R. de; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P. Resistance of leishmania (viannia) braziliensis to nitric oxide: correlation with antimony therapy and tnf- α production. **BMC infectious diseases**, Springer, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2010.

SOUZA, A. S.; GIUDICE, A.; PEREIRA, J. M.; GUIMARÃES, L. H.; JESUS, A. R. de; MOURA, T. R. de; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P. Resistance of leishmania (viannia) braziliensis to nitric oxide: Correlation with antimony therapy and tnf-production. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, 7 2010. ISSN 14712334.

STAMLER, J. S.; SINGEL, D. J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 258, n. 5090, p. 1898–1902, 1992.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; RAI, M.; PRAJAPATI, V. K.; SINGH, A. K.; OSTYN, B.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J.-C.; CHAKRAVARTY, J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in india after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, p. 543–550, 8 2012. ISSN 1058-4838. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cis474>.

TEIXEIRA, M. J.; TEIXEIRA, C. R.; ANDRADE, B. B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Chemokines in host–parasiteinteractions in leishmaniasis. **Trends in parasitology**, Elsevier, v. 22, n. 1, p. 32–40, 2006.

TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; DIAS, A. de C.; ABBAS, M.; ALBERTON, D.; SANTOS, D. R. dos. Luz e galinhas como fatores de atração de nyssomyia whitmani em ambiente rural, paraná, brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, p. 383–388, 6 2007. ISSN 0034-8910. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102007000300009&lng=pt&tln=pt.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, Faculty of 1000 Ltd, v. 6, p. 750, 5 2017. ISSN 2046-1402. Disponível em: <https://f1000research.com/articles/6-750/v1>.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of leishmania: implications for intracellular survival. **Trends in parasitology**, Elsevier, v. 28, n. 8, p. 335–344, 2012.

UZONNA, J. E.; JOYCE, K. L.; SCOTT, P. Low dose leishmania major promotes a transient t helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon γ -producing cd8+ t cells. **The Journal of experimental medicine**, Rockefeller University Press, v. 199, n. 11, p. 1559–1566, 2004.

VIEIRA, V.; AZEVEDO, A.; ALVES, J.; GUIMARÃES, A.; AGUIAR, G. Ecological aspects of phlebotomine sand flies (diptera, psychodidae, phlebotominae) in areas of american cutaneous leishmaniasis, in the municipality of paraty, rio de janeiro, brazil. i-index of abundance by location and type of capture. **Journal of medical entomology**, Oxford University Press, v. 52, n. 5, p. 886–895, 2015.

VINCENDEAU, P.; GOBERT, A. P.; DAULOUÈDE, S.; MOYNET, D.; MOSSALAYI, M. D. Arginases in parasitic diseases. **Trends in parasitology**, Elsevier, v. 19, n. 1, p. 9–12, 2003.

WHO, . **Leishmaniasis**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acessado em 07/11/2021.

WONG, K. L.; YEAP, W. H.; TAI, J. J. Y.; ONG, S. M.; DANG, T. M.; WONG, S. C. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. **Immunologic research**, Springer, v. 53, p. 41–57, 2012.

ZANDBERGEN, G. van; 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**, Am Assoc Immnol, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 2004.